202300527

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202300527 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：111109016 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/30 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
G01N33/68 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/03/11 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/080142
2022/02/16 世界智慧財產權組織 PCT/CN2022/076516

(71)申請人：上海交通大學 (中國大陸) SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY (CN)
中國大陸
中國大陸商蘇州創勝醫藥集團有限公司 (中國大陸) SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：朱 鶴 ZHU, HE (US)；錢 雪明 QIAN, XUEMING (US)；高維強 GAO, WEIQIANG (CN)；程姹萍 CHENG, CHAPING (CN)；王金名 WANG, JINMING (CN)；孫迪 SUN, DI (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：77 項 圖式數：19 共 246 頁

(54)名稱

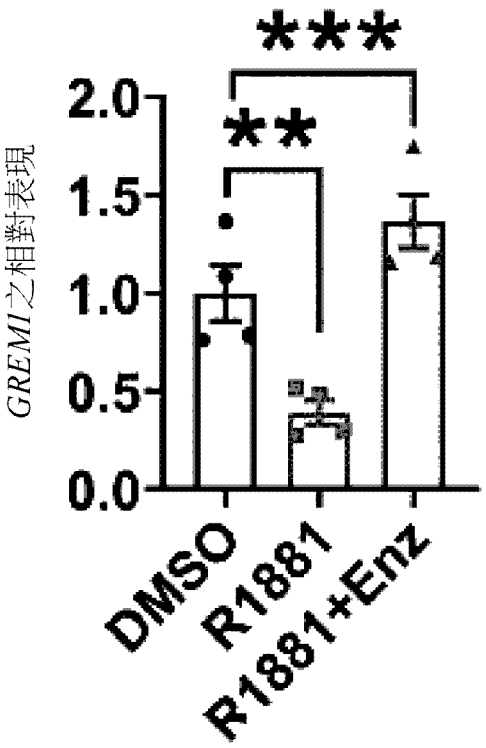
使用ＧＲＥＭ１拮抗劑治療疾病的方法

(57)摘要

本發明在此提供了用於特徵在於 PTEN 及/或 p53 缺乏之 GREM1 相關疾病或病症的治療方法。本發明亦提供了去勢抵抗性前列腺癌之治療方法。

The present disclosure provides herein treatment methods for GREM1-related disease or condition characterized in deficient in PTEN and/or p53. Also provided by the present disclosure are treatment methods for castration-resistant prostate cancers.

指定代表圖：



【圖1D】

20230927
20230927
專利案號：111109016

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用GREM1拮抗劑治療疾病的方法

【英文發明名稱】

METHOD OF TREATING DISEASES USING GREMLIN1 ANTAGONISTS

【中文】

本發明在此提供了用於特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症的治療方法。本發明亦提供了去勢抵抗性前列腺癌之治療方法。

【英文】

The present disclosure provides herein treatment methods for GREM1-related disease or condition characterized in deficient in PTEN and/or p53. Also provided by the present disclosure are treatment methods for castration-resistant prostate cancers.

【指定代表圖】

圖1D

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用GREM1拮抗劑治療疾病的方法

【英文發明名稱】

METHOD OF TREATING DISEASES USING GREMLIN1 ANTAGONISTS

【技術領域】

【0001】 本發明一般係關於一種使用GREM1拮抗劑治療GREM1相關疾病之新方法。

【先前技術】

【0002】 Gremlin1係BMP拮抗劑DAN家族中高度保守的分泌蛋白。據報導，其可以與BMP-2、BMP-4或BMP-7結合形成異二聚體，阻止BMP配體與相應的BMP受體相互作用，進而抑制BMP信號傳導之活化。Gremlin1為胚胎發生過程中之關鍵蛋白，與組織纖維化病變以及膠質瘤及結腸癌密切相關。然而，作為一種分泌蛋白，我們對Gremlin1之瞭解還遠遠不夠深入。除了BMP信號傳導通路外，Gremlin1是否藉由非BMP機制發揮作用尚未明確。

【0003】 因此，有必要探索Gremlin1靶向劑之新醫療用途。

【發明內容】

【0004】 在整個本發明中，冠詞「一(a/an)」及「該(the)」在本文中用於指一個(種)或多於一個(種) (亦即，至少一個(種))該冠詞之語法對象。舉例而言，「一抗體」意指一種抗體或多於一種抗體。

【0005】 一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療表現

GREM1之疾病或病症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中疾病或病症之特徵在於減弱的或被抑制的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0006】 在某些實施方式中，受試者正在接受或已經接受AR抑制劑。在某些實施方式中，疾病或病症對AR抑制劑具有抵抗性。

【0007】 在某些實施方式中，疾病或病症為AR相關之癌症(諸如前列腺癌、乳癌、膠質母細胞瘤、黑色素瘤、膀胱癌、腎細胞癌、胰臟癌、肝細胞癌、卵巢癌、子宮內膜癌、套細胞淋巴瘤或唾液腺癌)，或AR相關之非癌病症(諸如脫髮、痤瘡、多毛症、卵巢囊腫、多囊卵巢疾病、性早熟、脊髓及延髓肌肉萎縮或年齡相關黃斑變性)。

【0008】 一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療表現GREM1之癌症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中癌症之特徵在於減弱的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0009】 在一些實施方式中，癌症為表現AR之癌症或為AR陰性癌症。

【0010】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、睾丸癌、子宮內膜癌、卵巢癌及皮膚癌。

【0011】 在一些實施方式中，受試者正在接受或已經接受雄激素剝奪療法或耐雄激素剝奪療法。

【0012】 在一些實施方式中，癌症進一步確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0013】 在一些實施方式中，癌症為轉移性的。在一些實施方式中，癌症為轉移性前列腺癌。

【0014】 在一些實施方式中，癌症為癌症之肺轉移。在一些實施方式中，癌症為前列腺癌肺轉移。

【0015】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌。在一些實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0016】 在一些實施方式中，癌症之特徵在於GREM1過表現。

【0017】 一方面，本發明提供了一種在受試者中提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法敏感性的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【0018】 一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症或在有需要之受試者中抑制FGFR1活化或在有需要之受試者中抑制MAPK信號傳導之方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【0019】 在一些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於不存在功能性PTEN及/或p53。

【0020】 在一些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於在PTEN及/或p53中存在失活突變。

【0021】 在一些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於不存在PTEN及/或p53表現。

【0022】 在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症之特徵在於GREM1表現或過表現。

【0023】 在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。

【0024】 在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症為癌症。

【0025】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌、膠質瘤、脂質肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【0026】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌。

【0027】 在一些實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0028】 在一些實施方式中，癌症為乳癌。

【0029】 在一些實施方式中，乳癌為三陰性乳癌。

【0030】 在一些實施方式中，纖維化疾病為肺纖維化、皮膚纖維化、糖尿病性腎病或缺血性腎損傷。

【0031】 在一些實施方式中，GREM1拮抗劑降低GREM1水準或GREM1活性。

【0032】 在一些實施方式中，GREM1拮抗劑選擇性地降低癌細胞中而不是非癌細胞中之GREM1活性。

【0033】 在一些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗GREM1抗體或

其抗原結合片段、抑制性GREM1模擬肽、靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸、編碼抑制性核酸之多核苷酸、抑制gremlin及BMP之間相互作用的化合物、抑制GREM1活性之化合物。

【0034】在一些實施方式中，靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸包括短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA或反義寡核苷酸。

【0035】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑包括GREM1-FGFR1軸抑制劑。

【0036】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑抑制GREM1依賴性FGFR1信號傳導。

【0037】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑阻斷GREM1及FGFR1之間的結合。

【0038】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑包括FGFR1結合抑制劑。

【0039】在一些實施方式中，FGFR1結合抑制劑與FGFR1之胞外域2結合，並且視情況在包括殘基Glu 160之表位處與FGFR1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：75所示。

【0040】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑在包括殘基Lys 123及/或殘基Lys 124之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示；或者阻斷FGFR1與hGREM1之殘基Lys 123及/或殘基Lys 124結合。

【0041】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑或GREM1-FGFR1軸抑制劑包括抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段。

【0042】在一些實施方式中，抗體包括以下特徵中之至少一者：a)能夠在癌細胞中而不是非癌細胞中選擇性地降低對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性；b)在非癌細胞中表現出對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性不超過50%的降低；c)能夠與包括SEQ ID NO：68所示胺基酸序列之嵌合hGREM1結合；d)能夠與hGREM1結合，但不與小鼠gremlin1特異性結合；e)在包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示，或與包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之hGREM1片段結合，視情況hGREM1片段具有至少3 (例如，4、5、6、7、8、9或10)個胺基酸殘基之長度；f)能夠降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之活化；及/或g)能夠根據Fortebio所量測的在不超過1 nM之KD處結合hGREM1。

【0043】在一些實施方式中，抗體包括線性表位或構象表位。

【0044】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中重鏈可變區包括：a)重鏈互補決定區1 (HCDR 1)包括選自由SEQ ID NO：1、11、21及31組成之群的序列，b) HCDR2包括選自由SEQ ID NO：2、12、22及32組成之群的序列，以及c) HCDR3包括選自由SEQ ID NO：3、13、23及33組成之群的序列，及/或其中輕鏈可變區包括：d)輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包括選自由SEQ ID NO：4、14、24及34組成之群的序列，e) LCDR2包括選自由SEQ ID NO：5、15、25及35組成之群的序列，以及f) LCDR3包括選自由SEQ ID NO：6、16、26及36組成之群的序列。

【0045】在一些實施方式中，重鏈可變區選自由以下組成之群：a)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ

ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；b)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；c)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；以及d)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3。

【0046】 在一些實施方式中，輕鏈可變區選自由以下組成之群：a)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；b)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；c)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；以及d)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0047】 在一些實施方式中，a)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；b)重鏈可變區包括：包括SEQ ID

NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；c)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；或者d)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0048】 在一些實施方式中，重鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：45、SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0049】 在一些實施方式中，輕鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：47、SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0050】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段包括：a)包括SEQ ID NO：7所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：8所示序列之輕鏈可變區；或b)包括SEQ ID NO：17所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：18所示序列之輕鏈可變區；或c)包括SEQ ID NO：27所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：28所示序列之輕鏈可變區；或d)包括SEQ ID NO：37所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：38所示序列之輕鏈可變區；或e)包括選自由SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43及SEQ ID NO：45組成之群的序列之重鏈可變區，及包括選自由SEQ ID NO：47及SEQ ID NO：49組成之群的序列之輕鏈可變區；或f)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：41/47、41/49、43/47、43/49、45/47及45/49組成之群；或g)重鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57組成之群的序列，以及輕鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61組成之群的序列；或h)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：51/59、51/61、53/59、53/61、55/59、55/61、57/59及57/61組成之群。

【0051】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段進一步包括一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留對GREM1之特異性結合特異性或親和力。

【0052】在一些實施方式中，至少一個取代或修飾為在CDR序列中之一或多者及/或VH或VL序列之非CDR區中之一或多者。

【0053】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段進一步包括免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或視情況人IgG之恆

定區。

【0054】 在一些實施方式中，恆定區包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【0055】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【0056】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩定化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0057】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙特異性的。

【0058】 一方面，本發明提供了一種抗體或其抗原結合片段，其能夠特異性結合gremlin之第一及第二表位或者能夠特異性結合hGREM1及第二抗原兩者。

【0059】 一方面，本發明提供了一種其抗原結合片段，其中第二抗原包括免疫相關靶標。

【0060】 一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中第二抗原包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、

IL-21、CD3、CD16或CD83。

【0061】 一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中第二抗原包括腫瘤抗原。

【0062】 一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中腫瘤抗原包括腫瘤特異性抗原或腫瘤相關抗原。

【0063】 一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中腫瘤抗原包括前列腺特異性抗原(PSA)、CA-125、神經節苷酯G(D2)、G(M2)及G(D3)、CD20、CD52、CD33、Ep-CAM、CEA、鈴蟾素樣肽類、HER2/neu、表皮生長因子受體(EGFR)、erbB2、erbB3/HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、癌相關黏蛋白、VEGF、VEGFR (例如VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)、雌激素受體、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受體、EGFα、c-Kit受體、轉鐵蛋白受體、密封蛋白18.2、GPC-3、Nectin-4、ROR1、間皮素、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2或LIV-1。

【0064】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係不與鼠GREM1交叉反應的。

【0065】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係與小鼠GREM1交叉反應的。

【0066】 在一些實施方式中，方法亦包括投與治療有效量之第二治療劑。

【0067】 在一些實施方式中，第二治療劑包括抗癌療法，視情況抗癌療法選自化療劑、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑(例如VEGFR

(諸如VEGFR-1、VEGFR-2及VEGFR-3)之拮抗劑)、靶向治療劑、細胞治療劑、基因治療劑、激素治療劑、細胞介素、安寧療護、用於治療癌症(例如腫瘤切除術)之手術、一或多種止吐藥、用於由化療引起之併發症之治療，或用於癌症患者之飲食補充劑(例如吲哚-3-甲醇)。

【0068】 在一些實施方式中，抗癌療法包括抗前列腺癌藥物，視情況雄激素剝奪療法。

【0069】 在一些實施方式中，抗前列腺癌藥物包括：雄激素軸抑制劑；雄激素合成抑制劑；PARP抑制劑；或其組合。

【0070】 在一些實施方式中，雄激素軸抑制劑選自由促黃體激素釋放激素(LHRH)促效劑、LHRH拮抗劑及雄激素受體拮抗劑組成之群。

【0071】 在一些實施方式中，雄激素軸抑制劑為地加瑞克、比卡魯胺、氟他胺、尼魯米特、阿帕魯胺、達洛魯胺、恩雜魯胺或阿比特龍。

【0072】 在一些實施方式中，抗前列腺癌藥物選自由以下組成之群：醋酸阿比特龍酯、阿帕魯胺、比卡魯胺、卡巴他賽、康士得(比卡魯胺)、達洛魯胺、地加瑞克、多西他賽、Eligard (醋酸亮丙瑞林)、恩雜魯胺、厄利達(阿帕魯胺)、費蒙格(地加瑞克)、氟他胺、醋酸戈舍瑞林、組胺瑞林(Vantas)、Jevtana (卡巴他賽)、醋酸亮丙瑞林、立普安(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot (醋酸亮丙瑞林)、利普卓(奧拉帕利)、酮康唑(里素勞)、鹽酸米托蒽醌、Nilandron (尼魯米特)、尼魯米特、Nubeqa (達洛魯胺)、奧拉帕尼、普列威(Sipuleucel-T)、鐳223二氯化物、瑞格列克(Orgovyx)、Rubraca (瑞卡帕布樟腦磺酸鹽)、瑞卡帕布樟腦磺酸鹽、Sipuleucel-T、泰素帝(多西他賽)、曲普瑞林(Trelstar)、多菲戈(鐳223二氯化物)、安可坦(恩雜魯胺)、諾雷得(醋酸戈舍瑞林)及Zytiga (醋酸阿比

特龍酯)。

【0073】 一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有癌症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性之方法，包括：(a)偵測來自受試者之生物樣品中之雄激素受體(AR)表現或信號傳導，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的AR表現或信號傳導來確定回應之可能性。

【0074】 在一些實施方式中，受試者當偵測到受試者不存在AR表現或信號傳導或者被偵測為具有相對於參考水準降低之AR表現或信號傳導時確定為具有對GRME1拮抗劑回應之可能性。

【0075】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測來自受試者之生物樣品中之GREM1表現。

【0076】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現時，確定受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0077】 一方面，本發明提供了一種偵測經確定為不存在AR表現或經確定為具有減弱的雄激素受體(AR)信號傳導之樣品中GREM1存在或含量的方法，包括使樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定樣品中之GREM1之存在或含量。

【0078】 一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有疾病或病症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性之方法，包括：(a)偵測來自受試者之生物樣品中之PTEN及/或p53之缺乏，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的PTEN及/或p53之缺乏來確定回應之可能性。

【0079】 在一些實施方式中，當偵測到受試者缺乏PTEN及/或p53時，確定受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0080】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測GREM1在來自受試

者之生物樣品中之表現。

【0081】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現時，確定受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0082】 一方面，本發明提供了一種偵測經確定為缺乏PTEN及/或p53之樣品中之GREM1之存在或含量的方法，包括使樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定樣品中之GREM1之存在或含量。

【0083】 在一些實施方式中，樣品係自患有或疑似患有GREM1相關疾病或病症之受試者獲得的。

【0084】 在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症為癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓或骨關節炎(OA)。

【0085】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌、神經膠質瘤、脂質體肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【0086】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌或乳癌，其中前列腺癌為：a)抗雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，及/或b)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)之水準。

【0087】 在一些實施方式中，方法亦包括向經確定為具有回應之可能性的受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【圖式簡單說明】

【0088】

圖1顯示在雄激素敏感性PCa (HSPC) (n=474)及去勢抵抗性前列腺癌(CRPC) (n=60)中Gremlin1之免疫組織化學染色圖像。示出了具有代表性之圖像。比例尺=100 μm。

圖1B顯示CRPC中GREM1染色強度顯著高於HSPC。採用Aperio ScanScope軟體分析細胞質H評分。

圖1C顯示在CRPC中PSA及Gremlin1免疫組織化學染色圖像。比例尺=200 μm。

圖1D顯示在LNCaP細胞中藉由由R1881 (1 nM)活化AR下調*GREM1* mRNA轉錄，並且由恩雜魯胺(10 μg/ml)抑制AR顯著升高該轉錄。

圖1E顯示在LNCaP細胞中藉由由R1881 (1 nM)活化AR下調Gremlin1蛋白水準，並且由恩雜魯胺(10 μg/ml)抑制AR顯著升高該水準。

圖1F顯示在LNCaP細胞中藉由由R1881 (1 nM)活化AR下調*GREM1*啟動子驅動之螢光素酶活性，並且由恩雜魯胺(10 μg/ml)抑制AR顯著提高該活性。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖1G顯示染色質免疫沈澱(ChIP)偵測結果，表明經R1881或恩雜魯胺處理後，在LNCaP細胞中針對Gremlin1啟動子之AR富集水準。Enz：恩雜魯胺。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖1H顯示Gremlin1表現較高之PCa患者總生存期較短(p<0.05)。

圖1I顯示與Pbsn-Cre4；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$小鼠(n=3)之其他器官相比，在前列腺癌組織中GREM1表現水準最高。

圖2A顯示與親本LNCaP細胞相比，LNCaP去勢抵抗性細胞(LNCaP-

R)中Gremlin1之表現水準較高。

圖2B顯示在*AR*過表現LNCaP細胞中*GREM1*表現之免疫墨點分析。

圖2C顯示在*AR*過表現LNCaP細胞中*GREM1*表現之q-PCR分析。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖2D顯示在*AR*敲除LNCaP細胞中*GREM1*表現之免疫墨點分析。

圖2E顯示在*AR*敲除LNCaP細胞中*GREM1*表現之q-PCR分析。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖3A顯示免疫墨點證實了在PC3細胞中*GREM1*敲除或*GREM1*過表現之效能。

圖3B顯示在PC3細胞中*GREM1*敲除導致抑制球形成能力，而*GREM1*過表現或添加外源的Gremlin1蛋白則表現出促進作用。實驗重複三次進行。

圖3C顯示在PC3細胞中*GREM1*敲除導致抑制細胞增殖，而*GREM1*過表現或添加外源的Gremlin1蛋白則表現出促進作用。實驗重複三次進行。

圖3D顯示*GREM1*敲除增加PC3細胞中之細胞凋亡。

圖3E顯示在體內*GREM1*敲除抑制PC3異源移植體之生長。

圖3F顯示在體內*GREM1*過表現促進PC3異源移植體之形成發生率及腫瘤之生長。比例尺=1 cm。

圖3G顯示免疫墨點法證實在Himyc小鼠PCa衍生之類器官中*Grem1*過表現。

圖3H顯示Gremlin1促進Himyc PCa類器官中類器官之形成及雄激素

剝奪療法(ADT)之耐受性。(採用雙尾學生t檢驗及雙向ANOVA分析進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖4A顯示免疫墨點證實了在LNCaP細胞中*GREM1*敲除及過表現之效能。

圖4B顯示在LNCaP細胞中*GREM1*敲除抑制球形成能力，而過表現*GREM1*或外源添加Gremlin1蛋白則有相反的作用。

圖4C顯示在雄激素剝奪療法、ADT、雄激素阻斷療法下Gremlin1促進LNCaP PCa細胞之生長。實驗重複三次進行。

圖4D顯示在雄激素剝奪療法中*GREM1*敲除增加LNCaP細胞中之細胞凋亡。在經ADT治療之LNCaP細胞中，*GREM1*表現及添加外源的Gremlin1蛋白抑制LNCaP細胞中之細胞凋亡。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖5A顯示免疫墨點證實了在LAPC4細胞中*GREM1*過表現之效能。

圖5B顯示Gremlin1增強LAPC4之球形成。

圖5C顯示在ADT治療下Gremlin1促進LAPC4細胞之生長。

圖5D顯示在恩雜魯胺治療下*GREM1*過表現防止細胞死亡，上述恩雜魯胺治療之特徵在於降低的膜聯蛋白V/PI染色。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖6A顯示RNA-seq資料之基因集富集分析表明FGFR1及MAPK信號傳導通路為在*GREM1*過表現LNCaP亞系中最豐富的信號傳導通路。

圖6B顯示RNA-seq資料之基因集富集分析表明FGFR1及MAPK信號傳導通路為在*GREM1*過表現LNCaP亞系中最豐富的信號傳導通路。

圖6C顯示FGFR/MEK/ERK信號傳導通路被PC3細胞及LNCaP耐藥細胞中Gremlin1蛋白活化並呈劑量依賴關係。FGF (20 ng/ml)用作刺激FGFR之陽性對照。

圖6D顯示由Gremlin1對MEK/ERK信號傳導通路之活化不依賴於BMP4。在存在BMP4 (20 ng/ml)或不存在BMP4之情況下用Gremlin1蛋白處理PC3細胞及LNCaP耐藥細胞。

圖6E顯示在PC3細胞中，與FGF (20 ng/ml)相比，Gremlin1 (100 ng/ml)處理導致FGFR/MEK/ERK信號傳導活化之延長刺激。

圖6F顯示在LNCaP細胞中，與FGF (20 ng/ml)相比，Gremlin1 (100 ng/ml)處理導致對FGFR/MEK/ERK信號傳導活化之延長刺激。

圖6G顯示由CRISPR/Cas9介導之*FGFR1*敲除取消FGFR/MEK/ERK信號傳導通路之活化。

圖6H顯示Gremlin1藉由FGFR活化MEK/ERK信號傳導通路，其中如此圖所示用Gremlin1 (100 ng/ml)、FGF1 (20 ng/ml)或FGFR1/2/3抑制劑BGJ398 (1 μM)處理PC3及LNCaP耐藥細胞。

圖6I顯示Gremlin1對MEK/ERK信號傳導通路之活化不依賴於EGFR，其中如此圖所示用Gremlin1 (100 ng/ml)、EGF (20 ng/ml)或EGFR抑制劑厄洛替尼(1 μM)處理PC3及lncap耐藥細胞。

圖7A顯示與親本AR依賴性LNCaP細胞相比，LNCaP去勢抵抗性細胞(LNCaP R)表現出對FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之強烈活化。

圖7B顯示與對照之類器官相比，在*GREM1*過表現鼠*HiMyc* PCa類器

官中FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路上調。

圖8A顯示Gremlin1蛋白對LNCaP細胞增殖(n=6)之促進作用被FGFR1或MEK抑制劑消除，但不受添加BMP4之影響，其中BGJ398為一種FGFR1抑制劑，且曲美替尼為一種MEK抑制劑。

圖8B顯示Gremlin1蛋白對球形成之促進作用(n=3)被FGFR1或MEK抑制劑消除，但不受添加BMP4之影響，其中BGJ398為一種FGFR1抑制劑，且曲美替尼為一種MEK抑制劑。

圖8C顯示LNCaP細胞中*FGFR1*敲除效能之免疫墨點結果。

圖8D顯示*FGFR1*敲除顯著減弱Gremlin1對LNCaP細胞增殖之積極作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖8E顯示*FGFR1*敲除顯著減弱了Gremlin1對球形成之積極作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖9A顯示FGFR1與固定在鏈黴親和素感測器(ForBio)上之Gremlin1-生物素結合(Kd=1.06E-8M)。

圖9B顯示Z-dock模擬之Gremlin1及FGFR1胞外域之蛋白結構預測相互作用(http://zdock.umassmed.edu/)。蛋白結構由PDB生成(http://www.rcsb.org/)。Gremlin1:5AEJ；FGFR1:3ojv。

圖9C顯示採用flag標記之Gremlin1及HA標記之FGFR1表現質體轉染之293T細胞及LNCaP耐藥細胞中Gremlin1與FGFR1免疫共沈澱。

圖9D顯示LNCaP耐藥細胞中內源性Gremlin1與FGFR1免疫共沈澱。

圖9E顯示藉由酶聯免疫吸附測定法(ELISA)量測，Gremlin 1而非

Gremlin 2或DAN蛋白家族之其他成員與FGFR1結合。

圖9F顯示純化後的Gremlin1與可溶性FGFR1蛋白之相互作用係藉由下拉實驗證明的。

圖9G顯示可溶性FGFR1競爭性地抑制PC3中Gremlin1對FGFR1/MEK/ERK信號傳導之活化。

圖9H顯示BiFC測定表明在LNCaP耐藥細胞中Gremlin1及FGFR1之間的共定位。

圖9I顯示LNCaP-R細胞中Gremlin1及FGFR1之免疫螢光染色圖像。用Gremlin1 (100 ng/ml)或PBS在37℃下處理細胞10分鐘。

圖9J顯示經截短之FGFR1之圖。

圖9K顯示經截短之FGFR1及Gremlin1 (左圖)或FGF1 (右圖)之Co-IP測定結果。

圖9L顯示Gremlin1之誘變策略。點突變以粗體及下劃線表示。

圖9M顯示Gremlin1 K123A-K124A突變體破壞Gremlin1及FGFR1之間的免疫共沈澱，其中編號對應於SEQ ID NO：69。

圖9N顯示FGFR1突變之示意圖。點突變以粗體及下劃線表示。

圖9O顯示FGFR1及Gremlin1之共免疫沈澱受到FGFR1 E160A突變之損害。

圖9P顯示FGFR1突變之示意圖。

圖9Q顯示FGFR1-C176G或FGFR1-R248Q突變消除FGF1及FGFR1之間的共免疫沈澱(左圖)，但不影響Gremlin1及FGFR1之間蛋白複合物之形成(右圖)。

圖9R至圖9U顯示添加FGF1不會影響Gremlin1及FGFR1之間的結

合，反之亦然，此係藉由Fortebio (R)、共免疫染色(S)及下拉(T、U)測定發現的。

圖9V顯示對接模組，該模組突出了Gremlin1及FGFR1之間結合袋中之關鍵胺基酸殘基。

圖10A顯示酶聯免疫吸附測定法驗證了抗鼠Gremlin1抗體對Gremlin1之結合特異性。在此圖中Ab為抗鼠Gremlin1。

圖10B顯示Gremlin1在去勢的*Pbsn-Cre4*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$鼠PCa模型中高度表現。示出了具有代表性的Gremlin1免疫染色圖像。

圖10C顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PCa之生長具有顯著的抑制作用。總的腫瘤外觀上發現有顯著抑制性。

圖10D顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PCa之生長具有顯著的抑制作用。腫瘤總重量上發現有顯著抑制性。

圖10E顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PCa之生長具有顯著的抑制作用。PCNA陽性細胞數目顯著減少，發現有顯著抑制性。

圖10F顯示抗Gremlin1治療顯著抑制去勢的*Pbsn-Cre4*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$小鼠中侵入性PCa之進展。

圖10G及圖10H顯示基因集富集分析表明抗Gremlin1治療組前列腺中FGFR信號傳導通路受到顯著抑制。

圖10I及圖10J顯示免疫染色及免疫墨點分析表明抗Gremlin1抗體對*Pbsn-Cre*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$小鼠前列腺中FGFR1/MAPK信號傳導通路具有抑制作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，$P<0.05$；**，$P<0.01$；***，$P<0.001$。資料以平均值±SEM表示。)

圖10K顯示抗Gremlin1抗體(100 ng/ml)促進藉由恩雜魯胺(10 μg/ml)

對體外細胞增殖之抑制(n=3)。

圖10L顯示抗Gremlin1療法抑制LNCaP-R細胞球形成能力(n=3)。

圖10M顯示LNCaP-R細胞中FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化被Gremlin1抗體抑制。

圖10N顯示膜聯蛋白-V/DAPI染色證明抗Gremlin1抗體表現出與恩雜魯胺誘導細胞死亡之協同效應。Ab：抗人Gremlin1。ADT：採用恩雜魯胺10 μg/ml治療。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖10O顯示對*Pbsn-Cre4*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$ GEMM治療之示意圖。在2個月時去勢的小鼠接受抗Gremlin1抗體(腹腔內，10 mg/kg)或IgG，如本文所示，每週三次，持續2個月。

圖11A顯示在去勢的*Pbsn-Cre*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$ PCa中，Gremlin主要由上皮細胞表現。ECAD：E鈣黏附素；VIM：波形蛋白。

圖11B顯示當向小鼠(10 mg/kg，每週兩次)全身投與時，Gremlin1抗體治療不會引起嚴重的副作用。在接受抗體治療之小鼠中，外周血細胞計數未發現明顯變化。Ab：抗mGREM1抗體。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖11C顯示當向小鼠(10 mg/kg，每週兩次)全身投與藥時，Gremlin1抗體治療不會引起嚴重的副作用。在接受抗體治療的小鼠之主要器官未偵測到明顯的改變。Ab：抗mGREM1抗體。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖12A顯示藉由酶聯免疫吸附測定法驗證了抗人Gremlin1 (14E3)對Gremlin1之結合特異性。在此圖中Ab為抗人Gremlin1。

圖12B顯示抗人Gremlin1抗體(10 ug/ml)抑制PC3細胞之細胞增殖。

圖12C顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PC3細胞之球形成具有抑制作用。

圖12D顯示Gremlin1抗體以劑量依賴之方式中和PC3細胞中Gremlin1蛋白對FGFR1/MEK/ERK信號傳導之活化。

圖12E及圖12F顯示在一系列傳代實驗中抗Gremlin1治療顯著阻礙PC3腫瘤異源移植體之體內生長。在指定的時間點(見箭頭)以10 mg/kg腹腔內注射抗體。

圖13顯示使用14E3之治療減小PC3 CRPC模型之腫瘤體積並且提高生存率。

圖14A顯示抗Gremlin1抗體(100 ng/ml)促進藉由恩雜魯胺(1 ug/ml)對體外細胞增殖之抑制。

圖14B顯示抗Gremlin1治療抑制LNCaP細胞球形成能力。

圖14C顯示LNCaP細胞中FGFR1/MEK/ERK信號傳導之活化被Gremlin1抗體抑制。

圖14D顯示膜聯蛋白-V/DAPI染色證明抗Gremlin1抗體表現出與恩雜魯胺誘導細胞死亡之協同效應。Ab：抗人Gremlin1 14E3。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，$P<0.05$；**，$P<0.01$；***，$P<0.001$。資料以平均值±SEM表示。)

圖15顯示14E3降低了對癌細胞遷移之GREM1介導之促進作用。

圖16A至圖16C顯示14E3降低了GREM1介導之低PSA群體百分比之

增加，而不依賴於BMP結合環區。

圖17A顯示免疫墨點證實了在LNCaP細胞中BMPRII敲除之效能。

圖17B及圖17C顯示*BMPRII*敲除對Gremlin1抗體對LNCaP細胞增殖及球形成之抑制作用沒有顯著影響。Ab：抗人Gremlin1 14E3。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖18A顯示AMCAR及DAPI之免疫螢光染色表明患者來源之類器官之腫瘤來源。

圖18B及圖18C顯示類器官尺寸及數目之減少表明抗Gremlin1 14E3抗體對PDO之形成及生長具有抑制作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖18D顯示該患者來源之類器類實驗中使用的患者樣品之詳細資訊。

圖19A顯示分別來自對照組(mIgG2a)及實驗組(14E3)之每隻小鼠模型的腫瘤熱圖圖像。對照組及實驗組各16隻小鼠。

圖19B顯示在PCa轉移小鼠模型研究中，抗Gremlin1之抗體(例如14E3)對體重沒有明顯影響。

圖19C顯示在PCa轉移小鼠模型研究中，使用Gremlin1抗體治療後平均輻射強度降低。

圖19D顯示肺組織切片圖像，箭頭表示肺中之轉移位點。

圖19E顯示在PCa轉移小鼠模型研究中，肺中之微轉移數的統計資訊。

【實施方式】

【0089】 以下對本發明之描述僅旨在說明本發明之各種實施方式。因此，所論述的具體修改不應解釋為對本發明範疇之限制。對熟習此項技術者將顯而易見的是，可以在不脫離本發明範疇的情況下作出各種等效物、變化及修改，並且應理解，此等等效實施方式將包含在本文中。本文引用之所有參考文獻，包含出版物、專利及專利申請，均以全文引用之方式併入本文中。

【0090】

定義

在本發明上下文中使用之術語「一(a)」、「一個(an)」、「該(the)」以及類似術語(特別是在申請專利範圍之上下文中)，除非本文中另有說明或與上下文明顯矛盾，否則應解釋為包括單數及複數。

【0091】 關於本文提供之生物標誌物(諸如AR、PTEN及/或p53)使用的術語「失活突變」指突變或轉錄後修飾，其導致生物標誌物(諸如AR、PTEN及/或p53)之基因或基因產物之功能或活性的至少部分(或完全的)損失，或者導致沒有功能的基因或基因產物。例如，生物標誌物之受影響的基因或基因產物之活性將顯著低於野生型對應物，或甚至被消除。失活突變可以為易位、基因內染色體斷裂、倒置、缺失(例如，雙對偶基因缺失、雜合或純合拷貝數缺失)、微拷貝數改變、插入、替換、異常剪接或其任何組合，這降低生物標誌物之生物活性。在某些實施方式中，多核苷酸序列之插入或刪除可能導致讀框移位，從而改變密碼子之閱讀框架，並導致轉譯後之基因產物與原基因完全不同。此經常會產生截短蛋白，該截短蛋白導致功能喪失。

【0092】 如本文所用，術語「缺失」，當用作一種生物標誌物之失

活突變時，指一種突變，其中自一個多核苷酸序列丟失或刪除一或多個核鹼基對，或其中自多肽序列中刪除一或多個胺基酸殘基。例如，其可以指生物標誌物之整個編碼區或其一部分之刪除、丟失或移除。

【0093】 如本文所用，「取代」指在多核苷酸序列中將一個核鹼基替換為另一個核鹼基，或在多肽序列中將一個胺基酸殘基替換為另一個胺基酸殘基之突變。在多核苷酸序列中之取代可以：1)將一個密碼子修改為一個編碼不同胺基酸殘基之密碼子，因此會導致產生的蛋白之胺基酸序列之變化，或2)修改為一個編碼相同的胺基酸殘基之密碼子，由此造成產生的蛋白沒有變化；或者3)將一個胺基酸編碼密碼子修改為一個單一的「終止」密碼子，並且導致不完全蛋白(不完全蛋白通常係無功能的)。

【0094】 如本文所用，「插入」為一種突變，其中一或多個額外的鹼基對插入到一個多核苷酸序列之某個位置，或其中一或多個胺基酸殘基插入到一個多肽序列。

【0095】 如本文所用，「易位」指由於兩個非同源染色體之間的遺傳物質交換導致的一種染色體異常。易位可為平衡的或不平衡的；平衡的易位導致沒有物質之增加或損失，而不平衡的易位可以導致特定染色體片段之三體或單體。染色體易位通常出現在白血病中，如例如急性髓性白血病。

【0096】 關於生物標誌物(諸如AR、PTEN及/或p53)之術語「水準」指樣品中存在的相關生物標誌物之量或數目。該量或數目可以用絕對值表示，亦即生物標誌物在樣品中之總數目，或者以相對值表示，亦即生物標誌物在樣品中之濃度或百分比。可以在DNA水準(例如，以在染色體區域中基因之量或數目或拷貝數表示)、在RNA水準(例如，以mRNA量或

數目表示)，或在蛋白水準(例如，以蛋白或蛋白複合物之量或數目)量測生物標誌物之水準。

【0097】 如本文所用，關於生物標誌物之術語「參考水準」指允許比較的基準水準。參考水準可以由熟習此項技術者根據所需目的來選擇。確定適當參考水準之方法對熟習此項技術者而言係已知的，例如，參考水準可以根據經驗、現有知識或自臨床研究中收集之資料來確定。

【0098】 如本文所用，關於生物標誌物之術語「陰性」指生物標誌物在偵測樣品中呈陰性或不存在。例如，在測試樣品中呈陰性的生物標誌物可以與缺乏此種生物標誌物之樣品中之陰性對照水準具有可比的或不可區分的水準，或者，可以具有低於定義存在或陽性結果之臨限值水準的水準。

【0099】 如本文所用，關於受試者對治療產生反應之「可能性」及「可能」為對治療反應發生在受試者身上之可能性的量測。其可以與「概率」互換使用。可能性指一種大於猜測但小於確定性的概率。因此，若一個理性的人利用常識、訓練或經驗得出結論：在給定的情況下，治療反應係可能的，則治療反應係可能發生的。

【0100】 術語「受益於」或「反應性」，正如在療法之上下文中所使用的(例如，使用GREM1拮抗劑治療)，指對療法有益或有利的反應，而非不利的反應亦即不良事件。

【0101】 如本文所使用之術語「抗體」包含與特異性抗原結合之任何免疫球蛋白、單株抗體、多株抗體、多價抗體、二價抗體、單價抗體、多特異性抗體或雙抗體。天然完整抗體包括兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈。哺乳動物重鏈分為α、δ、ε、γ及μ，每個重鏈由一個可變區(V_H)及第一、

第二及第三恆定區(分別地C_{H1}、C_{H2}、C_{H3})組成；哺乳動物輕鏈分為λ及κ，每個輕鏈由可變區(V_L)及恆定區組成。抗體呈「Y」形，其中Y之主幹由藉由二硫鍵結合在一起的兩條重鏈之第二及第三恆定區組成。Y之每個臂包含與單條輕鏈之可變區及恆定區結合的單條重鏈之可變區及第一恆定區。輕鏈及重鏈之可變區負責抗原結合。兩條鏈之可變區通常含有三個高度可變的環區，稱為互補決定區(CDR) (輕鏈CDR包含LCDR1、LCDR2及LCDR3，重鏈CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文所揭示之用於抗體及抗原結合域之CDR邊界可以藉由Kabat、IMGT、AbM、Chothia或Al-Lazikani之約定來定義或確定(Al-Lazikani, B.、Chothia, C.、Lesk, A. M.之《分子生物學雜誌(J. Mol. Biol.)》，273(4), 927 (1997)；Chothia, C.等人之《分子生物學雜誌》，12月5日；186(3):651-63 (1985)；Chothia, C.及Lesk, A.M.之《分子生物學雜誌》，196,901 (1987)；N. R. Whitelegg等人之《蛋白工程(Protein Engineering)》，v13(12), 819-824 (2000)；Chothia, C.等人之《自然(Nature)》，12月21日-28日；342(6252):877-83 (1989)；Kabat E.A.等人，馬里蘭州貝塞斯達國立衛生研究院(1991)；Marie-Paule Lefranc等人之《發育與比較免疫學(Developmental and Comparative Immunology)》，27: 55-77 (2003)；Marie-Paule Lefranc等人之《免疫組研究(Immunome Research)》，1(3), (2005)；Marie-Paule Lefranc之《B細胞分子生物學(Molecular Biology of B cells)》(第二期)，第26章481-514, (2015))。三個CDR在稱為框架區(FR)之側翼延段之間插入，框架區與CDR相比更高度保守，並且形成支撐高變環區之支架。重鏈及輕鏈之恆定區不參與與抗原結合，但表現出各種效應子功能。基於抗體重鏈恆定區之胺基酸序列，將抗體分類。抗體之

五種主要類別或同種型為IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其特徵在於分別存在α、δ、ε、γ及μ重鏈。將幾個主要抗體類別劃分為亞類，諸如IgG1 (γ1重鏈)、IgG2 (γ2重鏈)、IgG3 (γ3重鏈)、IgG4 (γ4重鏈)、IgA1 (α1重鏈)或IgA2 (α2重鏈)。在某些實施方式中，本文提供之抗體涵蓋其任何抗原結合片段。

【0102】 如本文所用，術語「抗原結合片段」指由包括一或多個CDR之抗體片段或任何其他與抗原結合但不包括完整的天然抗體結構之抗體部分形成之抗體片段。抗原結合片段之實例包含但不限於雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩定化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。抗原結合片段能夠與親本抗體所結合之相同抗原結合。在某些實施方式中，抗原結合片段可以包括來自特定親本抗體之一或多個CDR。

【0103】 關於抗體之「Fab」指抗體之單價抗原結合片段，該抗體由單條輕鏈(可變區及恆定區兩者)藉由二硫鍵與單條重鏈之可變區及第一恆定區結合而形成。Fab可以藉由木瓜蛋白酶消化在接近鉸鏈區之重鏈之間二硫鍵的N端之殘基處的抗體獲得。

【0104】 「Fab'」指包含鉸鏈區一部分之Fab片段，其可以藉由胃蛋白酶消化在接近鉸鏈區重鏈之間的二硫鍵C端之殘基的抗體獲得，因此其在鉸鏈區少數殘基(包含一或多個半胱胺酸)中與Fab不同。

【0105】 「$F(ab')_2$」指Fab'之二聚體，包括兩條輕鏈及部分之兩條重鏈。

【0106】 關於抗體之「Fv」指最小的帶有完整抗原結合位點之抗體片段。Fv片段由結合於單條重鏈之可變區的單條輕鏈之可變區組成。「dsFv」指二硫穩定化Fv片段，其中在單條輕鏈之可變區與單條重鏈之可變區之間的鍵為二硫鍵。

【0107】 「單鏈Fv抗體」或「scFv」指一種由一個輕鏈可變區及一個重鏈可變區直接相互連接或藉由肽連接序列連接(Huston JS等人之《美國國家科學院院刊(*Proc Natl Acad Sci USA*)》，85:5879(1988))之工程化抗體。「scFv二聚體」指包括具有連接子的兩個重鏈可變區及兩個輕鏈可變區之單鏈。在某些實施方式中，「scFv二聚體」為一種二價雙抗體或二價scFv (BsFv)，包括V_H-V_L (由肽連接子連接)與另一個V_H-V_L部分二聚化，以至一部分的V_H與另一部分的V_L配位並形成可以靶向同一抗原(或表位)或不同抗原(或表位)的兩個結合位點。在其他實施方式中，「scFv二聚體」為雙特異性雙抗體，其包括V_{H1}-V_{L2} (由肽連接子連接)與V_{L1}-V_{H2} (亦由肽連接子連接)結合，使得V_{H1}與V_{L1}配位且V_{H2}與V_{L2}配位並且每個配位對具有不同的抗原特異性。

【0108】 「單鏈Fv-Fc抗體」或「scFv-Fc」指由連接至抗體Fc區之scFv組成的工程化抗體。

【0109】 「駱駝化單域抗體」、「重鏈抗體」、「奈米體」或「HCAb」指含有兩個V_H域而沒有輕鏈之抗體(Riechmann L.及Muyldermans S.之《免疫學方法雜誌(J Immunol Methods)》，12月10日；231(1-2):25-38 (1999)；Muyldermans S.之《生物技術雜誌(J Biotechnol)》，6月；74(4):277-302 (2001)；WO94/04678；WO94/25591；美國專利號6,005,079)。重鏈抗體最初係自*駱駝科*(駱駝、

單峰駝及美洲駝)獲得的。儘管缺乏輕鏈，但駱駝化抗體具有真實的抗原結合庫(Hamers-Casterman C.等人之《自然》，6月3日；363(6428):446-8 (1993)；Nguyen VK等人之「駱駝科之重鏈抗體；進化創新案例(Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation)」，《免疫遺傳學(Immunogenetics)》，4月；54(1):39-47 (2002)；Nguyen VK.等人之《免疫學(*Immunology*)》，5月；109(1):93-101 (2003))。重鏈抗體之可變域(VHH域)表示由適應性免疫反應生成之已知最小的抗原結合單位(Koch-Nolte F.等人之《FASEB雜誌(*FASEB J.*)》，11月；21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007))。「雙抗體」包含具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，其中該片段包括與單條多肽鏈上之V_L域連接之一個V_H域(V_H-V_L或V_L-V_H) (參見例如Holliger P.等人之《美國國家科學院院刊》，7月15日；90(14):6444-8 (1993)；EP404097；WO93/11161)。由於連接子太短，因此同一條鏈上之兩個域無法配對，因此，迫使該域與另一條鏈之互補域配對，從而產生兩個抗原結合位點。該抗原結合位點可以靶向相同的不同抗原(或表位)。

【0110】「域抗體」指僅含重鏈之可變區或輕鏈之可變區的抗體片段。在某些實施方式中，兩個或更多個V_H域藉由肽連接子共價接合以形成二價或多價域抗體。二價域抗體之兩個V_H域可靶向相同或不同的抗原。

【0111】在某些實施方式中，「$(dsFv)_2$」包括三個肽鏈：由肽連接子連接之兩個V_H域，及與由二硫橋結合至兩個V_L部分之兩個V_H域。

【0112】在某些實施方式中，「雙特異性ds雙抗體」包括V_{H1}-V_{L2}(由肽連接子連接)與V_{L1}-V_{H2} (亦由肽連接子連接)藉由V_{H1}與V_{L1}之間的二

硫橋結合。

【0113】 在某些實施方式中，「雙特異性dsFv」或「dsFv-dsFv'」包括三個肽鏈：V_{H1}-V_{H2}部分，其中重鏈由肽連接子(例如，長柔性連接子)結合並且藉由二硫橋分別與V_{L1}及V_{L2}部分結合。每個二硫配對的重鏈及輕鏈具有不同的抗原特異性。

【0114】 如本文所用，術語「人源化」指抗體或抗原結合片段包括來源於非人類動物之CDR、來源於人類之FR區及(當適用時)來源於人類之恆定區。在某些實施方式中，替換人源化gremlin抗體可變區框架之胺基酸殘基進行序列最佳化。在某些實施方式中，人源化gremlin抗體鏈之可變區框架序列至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%與相應的人類可變區框架序列相同。

【0115】 如本文所用，術語「嵌合」指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於一個物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同的物種之抗體或抗原結合片段。在一說明性實施例中，嵌合抗體可以包括來源於人類之恆定區及來源於非人類物種(諸如小鼠)之可變區。

【0116】 術語「生殖系序列」指編碼可變區胺基酸序列或子序列之核酸序列，與所有其他已知的由生殖系免疫球蛋白可變區序列編碼之可變區胺基酸序列相比，該序列與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高的確定胺基酸序列同一性。生殖系序列亦可以指與所有其他評估之可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高胺基酸序列同一性之可變區胺基酸序列或子序列。生殖系序列可以為僅框架區、僅互補決定區、框架及互補決定區、可變片段(如上文所定義)或包括可變區之序列或子序列之其他組合。序列同一性可以使用本文之方法確定，例如，使

用BLAST、ALIGN或此項技術中已知的另一種比對演算法比對兩個序列。生殖系核酸或胺基酸序列與參考可變區核酸或胺基酸序列可以具有至少 約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列一致性。例如，可以藉由可公開獲得的國際ImMunoGeneTics資料庫(IMGT)及V-base確定生殖系序列。

【0117】 如本文互換使用之「抗人gremlin1抗體」、「抗hGREM1抗體」或「抗人gremlin1抗體」指能夠特異性結合人gremlin1並具有足夠的特異性及/或親和力之抗體，例如，用於治療用途。

【0118】 如本文所用，術語「親和力」指免疫球蛋白分子(亦即抗體)或其片段與抗原之間的非共價相互作用之強度。

【0119】 如本文所用，術語「特異性結合(specific binding或specifically binds)」指兩個分子之間，諸如抗體與抗原之間的非隨機結合反應。在某些實施方式中，本文提供之抗體或抗原結合片段特異性結合至人類及/或非人類gremlin1之結合親和力(KD)≤10^{-6} M (例如，≤5×10^{-7} M、≤2×10^{-7} M、≤10^{-7} M、≤5×10^{-8} M、≤2×10^{-8} M、≤10^{-8} M、≤5×10^{-9} M、≤4×10^{-9}M、≤3×10^{-9}M、≤2×10^{-9} M或≤10^{-9} M)。本文使用之K_D指解離速率相對於締合速率之比率($k_{開}/k_{合}$)，其可藉由使用此項技術中已知之任何習知方法來確定，上述方法包含但不限於表面等離激元共振方法、微尺度熱泳方法、HPLC-MS方法及流式細胞量測術(諸如FACS)方法。在某些實施方式中，K_D值可以藉由使用流式細胞術法適當地確定。可以使用各種免疫測定格式來選擇與特定蛋白特異性免疫反應之抗體。例如，固相ELISA免疫測定常用於選擇與蛋白特異性免疫反應之抗體(關於可用於確定特異性免疫反應性之免疫測定格式及條件之描述，參見例如Harlow及

Lane之《使用抗體，實驗室手冊(Using Antibodies, A Laboratory Manual)》(1998))。通常，特異性或選擇性結合反應將產生至少兩倍於背景信號，更通常為至少10至100倍於背景信號之信號。

【0120】 如本文所用，術語「胺基酸」指含有胺(-NH_2)及羧基(-COOH)官能基以及每種胺基酸特有之側鏈的有機化合物。胺基酸之名稱在本發明中亦以標準的單字母或三字母代碼表示，其概述如下。

名字	三字母代碼	單字母代碼
丙胺酸	Ala	A
精胺酸	Arg	R
天冬醯胺	Asn	N
天冬胺酸	Asp	D
半胱胺酸	Cys	C
麩胺酸	Glu	E
麩醯胺酸	Gln	Q
甘胺酸	Gly	G
組胺酸	His	H
異白胺酸	Ile	I
白胺酸	Leu	L
離胺酸	Lys	K
甲硫胺酸	Met	M
苯丙胺酸	Phe	F
脯胺酸	Pro	P
絲胺酸	Ser	S
蘇胺酸	Thr	T
色胺酸	Trp	W
酪胺酸	Tyr	Y
纈胺酸	Val	V

【0121】 關於胺基酸序列之「保守取代」指用具有類似生理化學特性之側鏈的不同胺基酸殘基置換胺基酸殘基。例如，保守取代可以：在具有疏水側鏈之胺基酸殘基之間(例如，Met、Ala、Val、Leu及Ile)、在具有親水側鏈之胺基酸殘基之間(例如，Cys、Ser、Thr、Asn及Gln)、在具有酸性側鏈之殘基之間(例如，Asp、Glu)、在具有鹼性側鏈之胺基酸之間(例如，His、Lys及Arg)或在具有芳基側鏈之殘基之間(例如，Trp、Tyr及

Phe)進行。如此項技術中所知，保守取代通常不會引起蛋白構象結構之顯著變化，因此可保留蛋白之生物活性。

【0122】 關於胺基酸序列(或核酸序列)之「序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並在必要時引入空位以實現最大對應性之後，與參考序列中之胺基酸(或核酸)殘基相同的候選序列中之胺基酸(或核酸)殘基之百分比。例如，使用可公開獲得的工具，諸如BLASTN、BLASTp (在美國國家生物技術資訊中心(NCBI)之網站可以獲得)，亦可以參見Altschul S.F.等人之《分子生物學雜誌》，215:403-410 (1990)；Stephen F.等人之《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》，25:3389-3402 (1997))、ClustalW2 (在歐洲生物資訊學研究院網站獲得，亦可以參見Higgins D.G.等人之《酶學方法(Methods in Enzymology)》，266:383-402 (1996)；Larkin M.A.等人之《生物資訊學(Bioinformatics)》，(英格蘭牛津)，23(21): 2947-8 (2007))；及ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體，可以實現為確定胺基酸(或核酸)序列一致性百分比目的之比較。熟習此項技術者可使用該工具提供之預設參數，或可自定義適於比對之參數，諸如例如藉由選擇合適演算法進行。在某些實施方式中，不相同的殘基位置可以藉由保守胺基酸取代而不同。「保守胺基酸取代」指一個胺基酸殘基被另一個具有類似的化學特性(如電荷或疏水性)之側鏈(R基團)之胺基酸殘基取代。通常，保守胺基酸取代基本上不會改變蛋白之功能特性。在兩個或更多個胺基酸序列因保守取代而彼此不同的情況下，類似性百分比或程度可以向上調整以校正取代之保守性質。進行此種調整之方法為熟習此項技術者眾所周知的。參見例如Pearson (1994)之《分子生物學方法》，24: 307-331，其藉由引用合併至本文。

【0123】 如本文所用，「同源序列」指多核苷酸序列(或其互補鏈)或當視情況經比對時，與一個胺基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性之另一個胺基酸序列。

【0124】 「分離的」物質已藉由人工方式自天然狀態改變。若「分離的」組合物或物質存在於自然界中，則其已經自其原始環境改變或移出，或這兩種情況都有。例如，天然地存在於活動物體內之多核苷酸或多肽並非「分離的」，但若相同多核苷酸或多肽與其天然狀態之共存材料充分地分離，由此以基本上純的狀態存在，則該多核苷酸或多肽為「分離的」。經分離「核酸」或「多核苷酸」可互換使用，且指經分離核酸分子之序列。在某些實施方式中，「分離的抗體或其抗原結合片段」指由電泳方法(諸如SDS-PAGE、等電聚焦、毛細管電泳)，或層析法(諸如離子交換層析法或反相HPLC)測定具有至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%之純度的抗體或抗原結合片段。

【0125】 術語「受試者」包含人類及非人類動物。非人類動物包含所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、小鼠、大鼠、貓、兔、羊、狗、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除註明外，術語「患者」或「受試者」在本文中可互換使用。

【0126】 如本文所用，病症之「治療(treating或treatment)」包含預防或減輕病症，減緩病症之發作或發展速率，降低罹患病症之風險，預防或延遲與病症相關之症狀之發展，減少或結束與病症相關之症狀，生成病

症之完全或部分消退，治癒病症或其某一組合。

【0127】 術語「gremlin1」或「GREM1」指gremlin之變體1，並且包括不同物種(諸如人類、小鼠、猴子等)中之gremlin1。GREM1在進化上係保守的，並且人類gremlin1基因(*hGREM*1)已被定位至染色體15q13-q15 (Topol L Z等人之(1997)《分子與細胞生物學(*Mol. Cell Biol.*)》，17: 4801-4810；Topol L Z等人之《細胞發生學與細胞遺傳學(*Cytogenet Cell Genet.*)》，89: 79-84).)。hGREM1之胺基酸序列在GenBank資料庫中以登錄號NP-037504或在Uniprot資料庫中以登錄號O60565可獲得，在本文中提供以SEQ ID NO：66所示之序列。術語「人類gremlin1」及術語「hGREM1」在本發明中可以互換使用。

【0128】 如本文所用，「與gremlin1相關」或「與GREM1相關」之疾病或病症指由GREM1表現或活性增加引起、加重或與之相關的任何疾病或病症。在一些實施方式，與GREM1相關之病症為例如青光眼、癌症、纖維化疾病、血管生成、視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓或骨關節炎(OA)。

【0129】 如本文所用，「癌症」指特徵在於惡性細胞生長或腫瘤、異常增生、浸潤或轉移之任何醫療狀況，可以為良性或惡性的，且包含實體瘤及非實體癌(例如，血液惡性腫瘤)，諸如白血病。如本文所用，「實體瘤」指贅生性及/或惡性細胞之實體塊。

【0130】 術語「醫藥學上可接受的」表示指定的載體、媒劑、稀釋劑、賦形劑及/或鹽通常與構成製劑之其他成分在化學上及/或物理上相容，並與其接受者在生理上相容。

【0131】 術語「治療有效量」或「有效量」意謂在適用於任何治療

之合理益處/風險比下產生一些期望之局部或全身治療效果的藥劑量。當為預防疾病投與時，該量足以避免或延遲疾病之發作。治療有效量或有效量並不需要具有治癒性或防止疾病或病症之發生。在某些實施方式中，藥劑之治療有效量將取決於其治療指數、溶解度等。

【0132】 本文中提及「約」一個值或參數包含(並且描述)針對該值或參數本身之實施方式。例如，關於「約X」之描述包含「X」之描述。數值範圍包含定義該範圍之數字。一般而言，術語「約」指變數之指示值以及變數在指示值之實驗誤差範圍內(例如，平均值95%置信區間內)或指示值之10%以內的所有值，以較大的值為準。在術語「約」在一段時間(年、月、週、日等)之上下文中使用時，術語「約」指一段時間加上或減去下一個從屬時間段之時間段(例如，約1年指11-13個月；約6個月表示6個月加上或減去1週；約1週指6-8天等)，或在指示值之10%以內，以較大的值為準。

【0133】 本發明提供了gremlin1 (GREM1)拮抗劑之新的醫療用途。新醫療用途部分基於一個意外的發現，亦即GREM1之轉錄被雄激素受體(AR)抑制並且在雄激素剝奪療法(ADT)中釋放。新醫療用途部分基於一個發現，亦即PTEN及/或p53之缺乏促進GREM1表現。此外，本發明令人驚訝地發現，在包含去勢抵抗性前列腺癌(CRPC)之晚期前列腺癌中顯著上調GREM1，並且與去勢抵抗性之發展及較差之總生存率呈正相關。發明者已經證明GREM1拮抗劑在治療相關病症方面係有用的。

【0134】

採用減弱的雄激素受體信號傳導治療表現GREM1之病症的方法

一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療表現GREM1之

疾病或病症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中疾病或病症之特徵在於減弱的或經抑制的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0135】 在某些實施方式中，受試者正在接受或已經接受AR抑制劑。在某些實施方式中，疾病或病症對AR抑制劑具有抵抗性。本文所用之AR抑制劑指可用於抑制AR活性之治療劑，例如，在雄激素剝奪療法中使用之治療劑。

【0136】 在某些實施方式中，疾病或病症為AR相關之癌症(諸如前列腺癌、乳癌、膠質母細胞瘤、黑色素瘤、膀胱癌、腎細胞癌、胰臟癌、肝細胞癌、卵巢癌、子宮內膜癌、套細胞淋巴瘤或唾液腺癌)，或AR相關之非癌病症(諸如脫髮、痤瘡、多毛症、卵巢囊腫、多囊卵巢疾病、性早熟、脊髓及延髓肌肉萎縮或年齡相關黃斑變性)。

【0137】 一方面，本發明提供了在有需要之受試者中治療表現GREM1之癌症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中癌症之特徵在於減弱的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0138】

減弱的雄激素受體(AR)信號傳導

雄激素受體(AR)為類固醇及核受體超家族成員之一，主要在雄激素靶組織中表現，諸如前列腺、骨骼肌、肝臟及中樞神經系統(CNS)，在前列腺、腎上腺及附睾中觀察到最高表現水準。

【0139】 AR為用作胞內轉錄因子的一種可溶性蛋白。在與雄激素結合及被雄激素活化後，AR介導調節前列腺上皮細胞生長及分化之靶標基因之轉錄。AR信號傳導對包含前列腺在內的男性生殖器官之發育及維護至關重要。

【0140】 如本文所用，術語「減弱的雄激素受體(AR)信號傳導」指水準顯著低於AR信號傳導正常或基線水準(例如，健康細胞或組織樣品中之AR信號傳導水準，或一般癌症患者群體中或特定的相關癌症患者群體中或具有AR依賴性前列腺癌患者群體中之AR信號傳導之平均水準)的AR信號傳導。

【0141】 具有減弱的雄激素受體(AR)信號傳導之癌症可為表現AR之癌症，其中例如，由於治療(例如，藥物治療或手術治療)，或由於AR表現水準降低，或由於AR之某些失活突變，AR信號傳導受到抑制。或者，具有減弱的AR信號傳導之癌症在AR表現上可為陰性的，特別是對於通常表現AR之癌症(諸如前列腺癌)。

【0142】 在某一實施方式中，癌症為表現AR之癌症。已知不同類型之癌症表現AR。表現AR之癌症的實例包含但不限於前列腺癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、睾丸癌、子宮內膜癌、卵巢癌及皮膚癌。在某些實施方式中，表現AR之癌症為前列腺癌或乳癌。

【0143】 在某一實施方式中，受試者正在接受或已經接受雄激素剝奪療法(ADT)。如本文所用，術語「雄激素剝奪療法」或「ADT」指藉由降低雄激素水準或抑制雄激素之生物功能諸如抑制AR信號傳導來抑制雄激素之療法。體內主要的雄激素為睾酮及雙氫睾酮(DHT)。

【0144】 ADT可以藉由手術治療(諸如手術去勢)或藥物治療來實現。ADT藥物之實例包含但不限於LHRH促效劑(諸如亮丙瑞林(立普安、Eligard)、戈舍瑞林(諾雷得)、曲普瑞林(Trelstar)及組胺瑞林(Vantas))、LHRH拮抗劑(諸如地加瑞克(費蒙格)、瑞格列克(Orgovyx))、降低腎上腺雄激素水準之藥物(諸如阿比特龍(Zytiga)、酮康唑(里素勞))、雄激素受體

拮抗劑(諸如氟他胺(Eulexin)、比卡魯胺(康士得)、尼魯米特(Nilandron))及其他抗雄激素製劑(諸如恩雜魯胺(安可坦)、阿帕魯胺(厄利達)及達洛魯胺(Nubeqa))。

【0145】 在某一實施方式中，受試者或癌症對ADT具有耐藥性。所謂「耐藥性」指該疾病對ADT沒有或具有降低的反應性或敏感性。藉由例如需要增加劑量才能達到一定的療效，可以表明降低之反應性。在某些實施方式中，疾病可為對ADT無反應性的。例如，儘管進行ADT治療但是癌細胞或腫瘤尺寸增大了，或者疾病回歸到其以前的狀態，例如，部分恢復之後以前的症狀又回歸了。對ADT之抗性可為新生的，亦可為習得的。

【0146】 在某一實施方式中，受試者或癌症具有降低的AR表現水準或AR具有一或多個失活突變。在雄激素不敏感症候群及前列腺癌患者中，已發現超過800種不同的AR突變。在AR基因中，已經偵測到四種不同類型的突變來滅活AR，包含：a)導致胺基酸取代或過早終止密碼子之單點突變；b)核苷酸插入或缺失導致讀框移位及早熟反芻；c)基因完全或部分缺失；及d)導致選擇性剪接之內含子突變(詳情參見K. Eisermann等人之《泌尿男科轉化醫學雜誌(Transl Androl, Urol.)》，2013年9月；2(3): 137-147)。

【0147】 在一些實施方式中，癌症對雄激素受體(AR)表現為陰性，亦即AR陰性癌症。如本文所用，AR陰性癌症指原本表現AR但變成AR陰性的癌症。在某些實施方式中，AR陰性癌症為前列腺癌或乳癌。已知一些前列腺癌細胞株為AR陰性，諸如PC3細胞株。AR陰性癌症可以被偵測到AR表現或AR信號傳導陰性(或偵測不至)，或可以具有與已知的AR陰性前列腺癌細胞相當的偵測到之AR表現水準。

【0148】 在一些實施方式中，前列腺癌或乳癌對雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均呈陰性。前列腺癌中之NE分化為一種公認的表型變化，藉此前列腺癌細胞轉分化成NE樣細胞。NE樣細胞缺乏雄激素受體及前列腺特異性抗原之表現，並且對治療有耐藥性。NE分化可以藉由量測NE標誌物嗜鉻粒蛋白A (CgA)之蛋白水準或mRNA水準、CgA/前列腺特異性抗原(PSA)之比率及/或神經元特異性烯醇酶(NSE)來評估(參見例如Hu等人之《腫瘤學前沿(*Front Oncol*)》，2015;5:90；Berruti等人之《內分泌相關癌症(Endocr Relat Cancer)》，(2005) 12(1):109-17.10.1677/erc.1.00876；Khan等人之《巴基斯坦醫學協會雜誌(J Pak Med Assoc)》，(2011) 61(1):108-11；Taplin等人之《泌尿學(Urology)》，(2005) 66(2):386-91.10.1016/j.urology；Sarkar等人之《癌症生物標誌物(Cancer Biomark)》，(2010) 8(2):81-7.10.3233/CBM-2011-0198；Burgio等人之《內分泌相關癌症》，(2014) 21(3):487-93.10.1530/ERC-14-0071；Conteduca等人之《前列腺(Prostate)》，(2014) 74(16):1691-6.10.1002/pros.22890；Berruti等人之《癌症(Cancer)》，(2000) 88(11):2590-7.10.1002/1097-0142(20000601)88:11；Sasaki等人之《歐洲泌尿學(Eur Urol)》，(2005) 48(2):224-9.10.1016/j.eururo.2005.03.017，其揭示內容藉由整體引用合併於此)。

【0149】 在一些實施方式中，前列腺癌特徵亦在於具有低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準。

【0150】 PSA為AR之典型下游靶標。正常情況下，血液中很少分泌PSA。良性前列腺肥大、前列腺炎或前列腺癌引起之腺體尺寸增大及組織損傷增加可能提高循環的PSA水準。分化較差或未分化晚期前列腺癌細胞

產生較少的PSA，並且伴有低水準之PSA (例如，小於4 ng/ml)。亦可以認為PSA水準低或PSA呈陰性之前列腺癌細胞可以對抗雄激素製劑、化療藥物、促氧化劑或放療具有耐藥性，亦可以具有去勢抵抗性(Skvortsov S.等人之《幹細胞(STEM CELLS)》，第36卷，第10期，1457-1474)。

【0151】 PSA之參考水準可為PSA陽性前列腺癌通常發現之PSA臨限值水準。PSA之參考水準亦可為一般前列腺癌患者群體中或進展至晚期之前列腺癌患者群體中PSA平均水準。血液中PSA之某些參考水準可為例如約2 ng/ml、約4 ng/ml、約6 ng/ml、約8 ng/ml或約10 ng/ml，如使用免疫可偵測之測定法所量測的，例如，Hybritech (加利福尼亞州聖地亞哥)、Tosoh (加利福尼亞州福斯特城)、Bayer Centaur PSA測定套組(紐約州柏油村)或Abbott測定法(伊利諾伊州芝加哥)。參見例如Dan等人之《癌症》，第109卷，第2期，2007，**https://doi.org/10.1002/cncr.22372**；及Oesterling等人之《泌尿學雜誌(*J Urol*)》，1995；154:1090-1095，其揭示內容藉由整體引用合併於此。

【0152】 在某些實施方式中，前列腺癌PSA呈陰性。例如，前列腺癌不表現PSA，或者在PSA測試中呈陰性。

【0153】 在某一實施方式中，前列腺癌為去勢抵抗性的。去勢抵抗性前列腺癌(CRPC)為一種晚期前列腺癌，儘管循環之雄激素水準低，但仍能生長。儘管ADT之後血清睾酮值低於50 ng/dL，但CRPC可能表現為PSA水準之持續升高、原有疾病之進展及/或新轉移之出現(Toshiyuki Kamoto等人之《日本臨床雜誌(Nihon Rinsho)》，2014年12月；72(12):2103-7；Fred Saad等人之《加拿大泌尿外科協會雜誌(Can Urol Assoc J)》，2010年12月；4(6): 380-384)。

【0154】 儘管雄激素減少或降低，但一些CRPC仍然依賴於AR信號傳導。例如，可以藉由擴大AR表現、使AR基因及/或基因編碼輔活化因子/輔阻遏物突變、活化雄激素非依賴性AR通路及/或產生替代雄激素，可以罹患CRPC，由此對用於疾病發展之AR通路保留依懶性(Thenappan等人之《泌尿男科轉化醫學雜誌》，2015年6月；4(3): 365-380)。一些CRPC可以繞過AR信號傳導之要求。

【0155】 在一些實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0156】 在一些實施方式中，癌症進一步確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0157】 在某些實施方式中，癌症為轉移性的。轉移性癌症可以或已經自其原發部位擴散至身體之另一部位。轉移性腫瘤與原發腫瘤為同一類型之癌症。轉移性癌症可以擴散至原發部位附近區域，亦可以擴散至身體之遠距離部分。

【0158】

GREM1過表現

在不願受任何理論約束之情況下，據信AR信號傳導與GREM1表現呈負相關，而且減弱的AR信號傳導則被認為導致GREM1表現增加。

【0159】 在某一實施方式中，AR信號傳導減弱的癌症之特徵亦在於GREM1表現或過表現。GREM1表現或過表現可以發生在疾病細胞或疾病微環境中。

【0160】 如本文所用，關於GREM1之術語「過表現」指相對於參考水準提高的表現水準。參考水準可為在相同組織類型之正常細胞中發現的GREM1表現水準，可以視情況正規化至另一個基因(例如，管家基因)之表現水準。或者，參考水準可為在健康之受試者中發現的GREM1表現水準。基於核酸水準或蛋白水準確定表現水準。在一些實施方式中，表現GREM1之癌症的GREM1表現水準比參考水準至少高10% (例如，至少15%、20%、30%、35%、40%、50%或1倍、2倍、3倍甚至更高)。

【0161】

提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法敏感性的方法

另一方面，本發明進一步提供了提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法(ADT)敏感性的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【0162】 在不願受任何理論約束的情況下，據信ADT降低AR信號傳導可以導致GREM1表現或表現增加，且使用GREM1拮抗劑可以進一步提高表現AR之癌症對ADT之敏感性。

【0163】 關於癌症之術語「敏感性」指癌症對一種治療方法(例如，使用GREM1拮抗劑之治療方法)回應之能力。癌症之敏感性可以藉由例如抑制癌細胞增殖或促進癌細胞死亡來量測。可以根據在相同劑量下增加之效能或根據相似效能劑量減少來確定增強之敏感性。

【0164】 在一些實施方式中，方法包括給受試者投與與ADT聯合使用之GREM1拮抗劑。

【0165】

治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症的方法

在各種實施方式中，本發明提供了治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症的方法。

【0166】

PTEN及/或p53缺乏

PTEN及p53有助於調節前列腺祖細胞及前列腺癌之推定腫瘤起始細胞之自我更新及分化。在本文中提供之術語PTEN及/或p53旨在包含不同的形式，包含mRNA、蛋白及DNA (例如，基因組DNA)。因此，PTEN及/或p53之水準及/或活性及/或突變狀態可以使用RNA (例如，mRNA)、蛋白或DNA (例如，基因組DNA)來量測。

【0167】 術語「TP53」及「p53」在本文可以互換使用。TP53為一種能夠調控多種基因(例如，調控細胞週期及細胞凋亡)之轉錄因子。p53之替代名稱包含例如抗原NY-CO-13、磷蛋白p53、腫瘤抑制蛋白p53及細胞腫瘤抗原p53。如本文所用，p53可以指示TP蛋白以及編碼TP53蛋白之多核苷酸(例如，DNA或RNA)，包含所有的亞型及變體。在某些實施方式中，p53基因在GenBank資料庫中以NCBI參考序列NG_017013.2可獲得，且人p53蛋白之示例性序列在UniProtKB資料庫中以登錄號P04637 (P53-HUMAN)可獲得。在某些實施方式中，p53蛋白包括SEQ ID NO：73所示之胺基酸序列。

【0168】 術語「PTEN」、「Pten」及「PTEN酪胺酸磷酸酶」在本文可互換使用。PTEN亦稱為刪除十號染色體同源缺失性磷酸酶張力蛋白，係作為雙特異性蛋白磷酸酶的一種腫瘤抑制蛋白，藉由其脂質磷酸酶活性對PI3K信號傳導通路起反作用及藉由其蛋白磷酸酶活性負調節MAPK通路(Pezzolesi等人之《人類分子遺傳學(Hum. Molec. Genet.)》，16: 1058-

1071, 2007)。如本文所用，PTEN可以指PTEN蛋白以及DNA (例如編碼基因序列)或編碼PTEN之RNA，包含所有的亞型及變體。人PTEN之示例性序列在UniProtKB資料庫中以登錄號P60484 (PTEN_HUMAN)可獲得，其具有三種亞型：亞型1 (P60484-1)、亞型α (P60484-2)及亞型3 (P60484-3)。PTEN基因之示例性序列在GenBank資料庫中以NCBI參考序列NC_000010.11可獲得。在某些實施方式中，PTEN蛋白包括SEQ ID NO：74所示之胺基酸序列。

【0169】 如本文所用，「缺乏(deficiency或deficient)」指活性或水準不足，可以包含例如低於正常活性或水準，或活性或水準之缺失或不存在。例如，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以導致PTEN及/或p53沒有或低於正常功能，或生物樣品中PTEN及/或p53表現水準之缺失或降低。

【0170】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53之缺乏特徵在於功能性PTEN及/或p53之缺失。

【0171】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以藉由存在PTEN及/或p53失活突變來表示。

【0172】 應當理解，本發明不限於任何特定的PTEN或p53突變。任何PTEN或p53之失活突變在本發明中都係有用的。

【0173】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以藉由生物樣品中PTEN及/或p53之表現水準或拷貝數來表示。因此，為了確定生物樣品中PTEN及/或p53之活性或水準是否存在缺乏，本文提供之方法可以包括確定相對於參考水準生物樣品中PTEN及/或p53之表現水準或拷貝數是否降低的步驟。

【0174】 PTEN及/或p53在DNA或RNA水準上之突變狀態或表現水

準可以藉由此項技術中已知之任何方法來量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或定序測定。PTEN及/或p53在蛋白水準上之突變狀態或表現水準可以藉由此項技術中已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法。

【0175】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於PTEN及/或p53表現之缺失。

【0176】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以藉由表觀遺傳沈默、轉錄抑制或PTEN及/或p53之微小RNA (miRNA)調控來表示。

【0177】 在不願受任何理論約束的情況下，據信p53/PTEN之缺乏例如藉由失活突變導致GREM1之表現增加。在某一實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症之特徵亦在於GREM1表現或過表現。可以使用上述方法確定GREM1表現。

【0178】 在某些實施方式中，受試者為人類。在某些實施方式中，受試者被認為係GREM1表現或過表現，視情況在自受試者獲得之生物樣品中。

【0179】

GREM1相關疾病或病症

在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。

【0180】 在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為癌症。在某些實施方式中，癌症為轉移性癌症。在某些實施方式中，癌症為前列腺

癌、乳癌、神經膠質瘤、脂質體肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【0181】 在某一實施方式中，癌症為前列腺癌。

【0182】 在某一實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0183】 在某一實施方式中，癌症為乳癌。乳癌可為三陰性乳癌。

【0184】 在某一實施方式中，纖維化疾病為肺纖維化、皮膚纖維化、糖尿病性腎病或缺血性腎損傷。

【0185】 方法包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。GREM1相關疾病或病症可為藉由調節GREM1活性(如減少GREM1活性)而受益之疾病或病症。在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症特徵在於GREM1表現或過表現。

【0186】 在一些實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症可以選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。GREM1升高之水準與以下許多此等疾病或病症相關聯，諸如硬皮病、糖尿病性腎病、神經膠質瘤、頭頸癌、前列腺癌及結直腸癌。

【0187】

i. 癌症

在一些實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症為癌症，特別是表現GREM1之癌症。

【0188】 本文提供之治療方法係基於一項令人驚訝的發現，亦即PTEN及/或p53缺乏之癌細胞中GREM1之顯著上調，這在以前係未知的。

【0189】 在某些實施方式中，癌症選自實體瘤或血液腫瘤。在某些實施方式中，實體瘤為腎上腺皮質癌、肛門癌、星形細胞瘤、兒童小腦或大腦基底細胞癌、膽管癌、膀胱癌、骨腫瘤、腦癌、小腦星形細胞瘤、大腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、髓母細胞瘤、幕上原始神經外胚層腫瘤、視覺通路及下丘腦神經膠質瘤、乳癌、伯基特淋巴瘤、子宮頸癌、結腸癌、肺氣腫、子宮內膜癌、食道癌、尤文氏肉瘤、視網膜母細胞瘤、胃(胃部)癌、神經膠質瘤、頭頸癌、心癌、霍奇金淋巴瘤、胰島細胞癌(內分泌胰腺)、卡波西肉瘤、腎癌(腎細胞癌)、喉癌、肝癌、肺癌、神經母細胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰臟癌、咽部癌、前列腺癌、直腸癌、腎細胞癌(腎癌)、視網膜母細胞瘤、尤因家族腫瘤、皮膚癌、胃部癌、睾丸癌、喉癌、甲狀腺癌或陰道癌。

【0190】 在某些實施方式中，血液腫瘤為白血病(諸如急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性髓系白血病(CML))、淋巴瘤(諸如霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(如瓦爾登斯特羅姆巨球蛋白血症(WM)))或骨髓瘤(諸如多發性骨髓瘤(MM))。在某些實施方式中，癌症為多發性骨髓瘤(MM)。發現骨髓(BM)間充質間質細胞亞群大量分泌GREM1，被認為在MM疾病之發展中發揮關鍵作用。藉由定量PCR對人及小鼠BM間質樣品之分析表明與健康對照相比，攜帶MM腫瘤之組中GREM1/Grem1的表現顯著較高。抗GREM1抗體已被

證明可以降低小鼠MM腫瘤負荷(K. Clark等人之《癌症(Cancers)》，2020, 12, 2149)。

【0191】 在某些實施方式中，癌症為前列腺癌、胃食道癌、肺癌(如非小細胞肺癌)、肝癌、胰臟癌、乳癌、支氣管癌、骨癌、肝癌及膽管癌、卵巢癌、睾丸癌、腎癌、膀胱癌、頭頸癌、脊柱癌、腦癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、結腸癌、結直腸癌、直腸癌、肛門癌、胃腸癌、皮膚癌、腦垂體癌、胃部癌、陰道癌、甲狀腺癌、膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生異常症候群、肉瘤、畸胎瘤、神經膠質瘤、腺癌、白血病(諸如急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性髓系白血病(CML))、淋巴瘤(諸如霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(如瓦爾登斯特羅姆巨球蛋白血症(WM)))、骨髓瘤(諸如多發性骨髓瘤(MM))、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌、食道癌、骨肉瘤及胃癌。

【0192】 在某些實施方式中，癌症選自由前列腺癌、胃食道癌、肺癌(如非小細胞肺癌)、肝癌、結腸癌、結直腸癌、神經膠質瘤、胰臟癌、膀胱癌及乳癌組成之群。在某些實施方式中，癌症為三陰性乳癌。在某些實施方式中，癌症為多發性骨髓瘤。

【0193】 在某些實施方式中，癌症為轉移性的。在某些實施方式中，本發明進一步提供了使用本文提供之抗體治療或預防癌症轉移的方法。癌症轉移為癌細胞自其原發部位擴散至體內另一部位之過程。

【0194】 在某些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌或肝癌。在前列腺癌或乳癌中腫瘤抑制蛋白Pten及p53經常丟失。

【0195】 在某些實施方式中，乳癌為三陰性乳癌。術語「三陰性乳

癌」或「TNBC」指經測試雌激素受體、孕激素受體及過量HER2蛋白呈陰性的乳癌。TNBC對激素療法或靶向HER2之藥物可為無反應性。如上文所述，根據章節《藉由減弱雄激素受體信號傳導治療GREM1相關前列腺癌之方法》可以偵測到樣品中之表現。

【0196】與具有正常水準之此等腫瘤抑制蛋白(*Jeff C. L.等人之《EMBO分子醫學(EMBO Mol Med)》，(2014)6:1542-1560*)之其他TNBC相比，PTEN及/或p53缺乏之TNBC具有更差的預後。發現組合之Pten-p53突變加速低密封蛋白之三陰性樣乳癌(TNBC)之形成，其表現出與Pten或p53單突變腫瘤相比超活化之AKI信號傳導及更多間充質特徵。

【0197】在一些實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症為肝癌，例如肝細胞癌(HCC)。在一些實施方式中，肝癌為乙型肝炎病毒(HBV)感染相關之HCC。HCC為世界上癌症相關死亡之第二主要原因。持久性HBV感染為HCC發展之主要風險因素之一，其占世界範圍內HCC之50%以上。藉由CRISPR/Cas9介導之*p53*及*PTEN*基因座之突變HBV感染相關之HCC可以發展，導致PTEN及/或p53缺乏(*Yongzhen L.等人之《科學報告(Scientific Reports)》，(2017) 7: 2796*)。HCC之來源已被認為係肝祖細胞/幹細胞之增強的增殖及成熟停滯，其被證明藉由纖維母細胞分泌阻斷BMP功能之GREM1來促進纖維化(*Guimei M等人之《BMC研究筆記(BMC Res Notes)》，2012；5:390*。)。

【0198】

ii. 纖維化疾病

PTEN及/或p53缺乏之疾病或病症亦可為一種非癌症疾病，只要該疾病之特徵在於PTEN及/或p53缺乏，而該缺乏進一步與GREM1上調相關。

例如，已報導非癌症疾病，諸如肺及皮膚纖維化以及糖尿病性及缺血性腎損傷涉及p53或PTEN之失調，並且已知此等疾病亦與GREM1表現有關(詳情參見*Rohan Samarakoon等人之腎損傷中腫瘤抑制蛋白PTEN表現丟失引發SMAD3及p53依賴性纖維化回應(Loss of Tumour Suppressor PTEN Expression in Renal Injury Initiates SMAD3 and p53 Dependent Fibrotic Responses)，《病理學雜誌(J Pathol)》，2015年8月；236(4): 421-432；Nagaraja M. R.等人之「肺纖維母細胞中之p53表現與肺纖維化重塑之緩解有關(p53 Expression in Lung Fibroblasts Is Linked to Mitigation of Fibrotic Lung Remodeling)」，《美國病理學雜誌(Am J Pathol)》，2018年10月；188(10): 2207-2222*。)。本發明人出乎預料地發現了GREM1及PTEN/p53之間的相關性，因此可以預期，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之非癌症疾病或病症亦可以藉由投與GREM1調節劑，包含GREM1拮抗劑來治療。

【0199】在某一實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症為纖維化疾病。纖維化疾病為一種涉及纖維化之疾病或病症。纖維化為慢性器官損傷之共同特徵的一種瘢痕化過程，例如肺、肝、腎、皮膚、心臟、腸道或肌肉。纖維化之特徵在於轉化生長因子β (TGF-β)活性升高，導致胞外基質及其他纖維化相關蛋白沈積增加及改變。在許多纖維化疾病中均已發現升高的GREM1表現，表明GREM1可為纖維化之重要標誌物(Costello等人之2010年《美國呼吸系統細胞及分子生物學雜誌(Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.)》，42: 517-523；Lappin等人之2002年《腎病透析移植(Nephrol. Dial. Transplant.)》，17: 65-67；Boers等人之2006年《生物化學雜誌(J. Biol. Chem.)》，281 : 16289-

16295)。

【0200】 纖維化疾病可以包含肺、肝、腎、眼睛、皮膚、心臟、腸道或肌肉之纖維化疾病。肺纖維化疾病之實例包含肺纖維化、囊性纖維化、肺高壓、進行性大規模纖維化、閉塞性細支氣管炎、與慢性哮喘相關之氣道重塑或特發性肺纖維化。肝纖維化疾病之實例包含肝硬化或非酒精性脂肪性肝炎。腎纖維化疾病之實例包含諸如腎纖維化、缺血性腎損傷、腎小管間質纖維化、糖尿病性腎病、腎硬化或腎毒性。眼纖維化疾病之實例包含諸如角膜纖維化、視網膜下纖維化。皮膚纖維化疾病之實例包含諸如腎原性全身纖維化、瘢痕疙瘩或硬皮病。心臟纖維化疾病之實例包含心內膜心肌纖維化或陳舊性心肌梗死。

【0201】

iii. 其他疾病

在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為肺動脈高壓(PAH)。術語「肺動脈高壓」(「PAH」)指以肺動脈壓持續升高為特徵的一種進行性肺病。已經發現在缺氧期間小鼠肺內小血管壁中GREM1升高。已經發現抗GREM1抗體可以緩解或改善PAH相關的一或多種症狀，例如，抑制肺動脈增厚，增加每搏量及/或每搏量與收縮末期容量比(「SV/ESV」)，增加右心室心輸出量及/或心臟指數(CI)，改善PAH患者之其他血流動力學量測，諸如例如右心房壓、肺動脈壓、存在呼氣末期壓下肺毛細血管楔壓、全身動脈壓、心跳、肺血管阻力及/或全身血管阻力(詳情參見美國專利申請US20180057580A1)。

【0202】 在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為骨關節炎(OA)。據報導，GREM1為軟骨細胞中一種機械性加載誘導因子，在循環

應變或靜水壓力加載後其被偵測到在軟骨之中層及深層中以高水準存在。據報導，骨關節炎中GREM1上調，且血清及滑膜液中GREM1濃度與膝OA之發作及嚴重程度相關(J. Yi等人之《醫學科學評議雜誌(Med Sci Monit)》，2016；22: 4062-4065)。GREM1活化核因子-κB信號傳導，導致分解代謝酶之隨後誘導。據報導，小鼠關節內投與GREM1抗體或軟骨細胞特異性GREM1缺失減緩了骨關節炎之發展(參見S.H. Chang等人之《自然通訊(Nature Communications)》，(2019) 10: 1442)。

【0203】在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為血管生成。GREM1為主要的促血管生成受體血管內皮生長因子受體2 (VEGFR-2)之促效劑。已證明，已知用於其抗凝作用之硫酸肝素(HS)及肝素、糖胺聚糖(GAG)與GREM1結合。GREM1與肝素結合，並且以一種不依賴BMP之方式活化VEGFR-2 (Chiodelli等人，2011；《動脈硬化、血栓及血管生物學(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.)》，31: e116-e127)。已發現抗GREM1抗體緩解或改善與血管生成或肝素介導之血管生成相關的一或多種症狀(詳情參見美國專利申請US20200157194)。

【0204】在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為青光眼。青光眼可為由眼睛內一或多個BMP家族基因表現改變引起，其導致眼壓升高及/或青光眼視神經病變。已發現在青光眼之小樑網細胞中GREM1表現增加。已發現GREM1拮抗劑緩解或改善與血管生成或青光眼相關的一或多種症狀(詳情參見美國專利US7744873)。

【0205】在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為視網膜疾病。在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為腎臟疾病。

【0206】

GREM1拮抗劑

在某一實施方式中，GREM1拮抗劑降低GREM1水準或GREM1活性。例如，GREM1拮抗劑可以部分抑制，亦即降低GREM1之表現及/或活性，或完全抑制，亦即完全消除GREM1之表現及/或活性。

【0207】 GREM1拮抗劑可以降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%之GREM1水準或活性。

【0208】 可以降低GREM1之任何功能或活性。在某些實施方式中，視情況在癌細胞中，GREM1拮抗劑可以降低GREM1介導的對BMP信號傳導之抑制及/或GREM1介導的MAPK信號傳導之活化。在一些實施方式中，GREM1拮抗劑抑制BMP非依賴性GREM1活性。

【0209】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑選擇性地降低癌細胞中而不是非癌細胞中GREM1之功能或活性。可以使用在存在或不存在GREM1拮抗劑之情況下進行的任何合適之測定來量測GREM1功能或活性或水準之降低。

【0210】 在某一實施方式中，GREM1拮抗劑包括GREM1-FGFR1軸抑制劑。本發明令人驚訝地發現GREM1似乎在MAPK信號傳導之活化中發揮作用，其可以不依賴BMP，並且可能用作FGFR之新配體。因此，本文提供之GREM1-FGFR1軸抑制劑指可以干擾或抑制GREM1依賴性FGFR1信號傳導或阻斷GREM1及FGFR1之間結合的任何抑制劑。

【0211】 在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑包括FGFR1結合抑制劑。

【0212】 在一些實施方式中，FGFR1結合抑制劑與FGFR1之胞外域

2結合，並且視情況在包括殘基Glu 160之表位處與FGFR1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：75所示。

【0213】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑在包括殘基Lys 123及/或殘基Lys 124之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示；或阻斷FGFR1與FGFR1之殘基Lys 123及/或殘基Lys 124結合。

【0214】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑或GREM1-FGFR1軸抑制劑包括本文所提供之抗hGREM1抗體或其抗原結合片段。

【0215】在各種實施方式中，GREM1拮抗劑可為抗GREM1抗體或其抗原結合片段、GREM1模擬肽、靶向gremlin RNA或DNA之核酸、抑制gremlin與BMP相互作用之化合物或抑制GREM1介導之生物活性之化合物。GREM1拮抗劑可包括抗GREM1抗體或其抗原結合片段、抑制性GREM1模擬肽、靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸、抑制gremlin及BMP相互作用之化合物、編碼抑制性核酸之多核苷酸、抑制GREM1活性之化合物。

【0216】在某一實施方式中，靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸包括短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA或反義寡核苷酸。

【0217】在某些實施方式中，靶向gremlin RNA或DNA之核酸為一種非編碼核酸，例如，短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA、反義寡核苷酸或編碼此類之多核苷酸。

【0218】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑可以在mRNA水準或

蛋白水準上降低GREM1水準。例如，GREM1拮抗劑可以在mRNA水準或蛋白水準促進GREM1降解，破壞編碼GREM1之DNA，或減少編碼GREM1之DNA轉錄。這類GREM1拮抗劑可以包含靶向GREM1 mRNA或DNA之非編碼核酸，例如短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA、反義寡核苷酸及編碼此類之多核苷酸。GREM1拮抗劑亦可以包含促進GREM1蛋白降解之藥劑。

【0219】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑可為一種干擾(例如，降低) GREM1與BMP結合之藥劑，諸如BMP2/4/7。例如，GREM1拮抗劑可為抗GREM1抗體、GREM1模擬肽或減少或阻斷GREM1與BMP結合之化合物，從而減少GREM1介導的對BMP信號傳導之抑制。GREM1拮抗劑可以與GREM1競爭以結合BMP，但其亦可以與不同表位或結合位點結合，該表位或結合位點不直接影響GREM1與BMP結合，但仍然減少其由GREM1介導之生物功能。

【0220】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗GREM1抗體、抑制GREM1及BMP相互作用之化合物或抑制GREM1介導之生物活性之化合物(如活化MAPK信號傳導或抑制BMP信號傳導)。

【0221】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑可以包括本文提供之任何抗GREM1抗體，亦可以包括任何現有的抗GREM1抗體，諸如彼等例如 在WO2018/115017、WO2019/158658、WO2019/243801、WO2014159010中揭示之抗體，其揭示內容藉由整體引用合併於此。

【0222】

GREM1抗體

在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或結合至與其他抗GREM1抗體不同之表位的其抗原結合片段。例如，用作GREM1拮抗劑之抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段不與包括SEQ ID NO：63所示之胺基酸序列之BMP結合環區結合。

【0223】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中重鏈可變區選自由以下組成之群：

a)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；

b)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；

c)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；以及

d)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3。

【0224】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中輕鏈可變區選自由以下組成之群：

a)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；

b)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；

c)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；以及

d)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0225】 在一些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中：

a)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；

b)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之

LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；

c)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；或者

d)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0226】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中重鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：45、SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0227】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中輕鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：38、SEQ ID

NO：47、SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：59、SEQ ID NO：61以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0228】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括：

a)包括SEQ ID NO：7所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：8所示序列之輕鏈可變區；或

b)包括SEQ ID NO：17所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：18所示序列之輕鏈可變區；或

c)包括SEQ ID NO：27所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：28所示序列之輕鏈可變區；或

d)包括SEQ ID NO：37所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：38所示序列之輕鏈可變區；或

e)包括選自由SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43及SEQ ID NO：45組成之群的序列之重鏈可變區，及包括選自由SEQ ID NO：47及SEQ ID NO：49組成之群的序列之輕鏈可變區；或

f)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：41/47、41/49、43/47、43/49、45/47及45/49組成之群；或

g)重鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57組成之群的序列，以及輕鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61組成之群的序列；或

h)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：51/59、51/61、53/59、53/61、55/59、55/61、57/59及57/61組成之群。

【0229】 在某些實施方式中，本文提供之抗體包括抗hGREM1抗體

14E3、69H5、22F1、56C11之一或多個(例如，1、2、3、4、5或6) CDR序列。

【0230】 如本文所用，「14E3」指具有SEQ ID NO：7所示重鏈可變區及SEQ ID NO：8所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0231】 如本文所用，「69H5」指具有SEQ ID NO：27所示重鏈可變區及SEQ ID NO：28所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0232】 如本文所用，「22F1」指具有SEQ ID NO：17所示重鏈可變區及SEQ ID NO：18所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0233】 如本文所用，「56C11」指具有SEQ ID NO：37所示重鏈可變區及SEQ ID NO：38所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0234】 表1顯示此等抗hGREM1抗體之CDR序列。重鏈及輕鏈可變區序列亦提供於下表2中。

表1. 抗hGREM1抗體之CDR區域之序列

抗體	區域	CDR1	CDR2	CDR3
14E3	HCDR	**SEQ ID NO：1** TYGMA	**SEQ ID NO：2** WINTLSGEPTYADDFKG	**SEQ ID NO：3** EPMDY
	LCDR	**SEQ ID NO：4** KSSQSLLDSDGKTYLS	**SEQ ID NO：5** LVSKLDS	**SEQ ID NO：6** WQGAHFPLT
22F1	HCDR	**SEQ ID NO：11** DYYMN	**SEQ ID NO：12** DINPKDGDSGYSHKFKG	**SEQ ID NO：13** GFTTVVARGDY
	LCDR	**SEQ ID NO：14** KSSQSLLDSDGKTYLN	**SEQ ID NO：15** LVSKLDS	**SEQ ID NO：16** WQGTHFPYT
69H5	HCDR	**SEQ ID NO：21** DDYMH	**SEQ ID NO：22** WIDPENGDTEYASKFQG	**SEQ ID NO：23** WATVPDFDY
	LCDR	**SEQ ID NO：24** KSSQSLLNRSNQKNYLA	**SEQ ID NO：25** FTSTRES	**SEQ ID NO：26** QQHYSTPFT
56C11	HCDR	**SEQ ID NO：31** DFYMN	**SEQ ID NO：32** DINPNNGGTSYNQKFKG	**SEQ ID NO：33** DPIYYDYDEVAY
	LCDR	**SEQ ID NO：34** RSSQSLVHSNGNTYLH	**SEQ ID NO：35** KVSNRFS	**SEQ ID NO：36** SQSTHVPLT

表2. 小鼠抗體之VH/VL之序列

	VH	VL
14E3	**SEQ ID NO：7** QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGS TFTTYGMAWMKQAPGKGLTWMGWI NTLSGEPTYADDFKGRFAFSLKTSAN TAYLQINNLKNEDAATYFCAREPMD YWGQGTSVIVSS	**SEQ ID NO：8** DVVMTQTPLTLSITIGQPASISCKSS QSLLDSDGKTYLSWLLQRPDQSPK RLISLVSKLDSGVPDRITGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGIYYCWQGAHF PLTFGAGTKLELK
22F1	**SEQ ID NO：17** EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YSFTDYYMNWLKQSHGKSLEWIGDI NPKDGDSGYSHKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSEDSAVYYCASGFTTV VARGDYWGQGTTLTVSS	**SEQ ID NO：18** DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKS SQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSP KRLIYLVSKLDSGFPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGT HFPYTFGGGTKLEIK
69H5	**SEQ ID NO：27** EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASG FNIKDDYMHWVKRRPEQGLEWIGWI DPENGDTEYASKFQGKATITADTSSN TAYLQLSSLTSEDTAVYYCTTWATVP DFDYWGQGTTLTVSS	**SEQ ID NO：28** DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC KSSQSLLNRSNQKNYLAWYQQKP GQSPKLLVHFTSTRESGVPDRFIGS GSGTDFTLTISNLQAEDLADYFCQ QHYSTPFTFGSGTKLEIK
56C11	**SEQ ID NO：37** EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YTFTDFYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSEDSAVYYCARDPIYY DYDEVAYWGQGTLVTVSA	**SEQ ID NO：38** DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCR SSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQST HVPLTFGAGTKLELK

【0235】本文提供之抗hGREM1抗體或其抗原結合片段可為單株抗體、多株抗體、人源抗體、嵌合抗體、重組抗體、雙特異性抗體、經標記之抗體、二價抗體或抗獨特型抗體。重組抗體為使用重組方法在體外而非在動物體內製備之抗體。

表3. 人源化14E3 (Hu14E3)及人源化22F1 (Hu14E3)之序列

抗體鏈	序列
Hu14E3-Ha VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMAWMRQAPGQG LEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGTMVTVSS**(SEQ ID NO：41)**
Hu14E3-Hb VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMAWMRQAPGQG LEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGTMVTVSS**(SEQ ID NO：43)**
Hu14E3-Hc VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGSTFTTYGMAWMKQAPGQG LTWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGTMVTVSS**(SEQ ID NO：45)**

Hu14E3-La VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLQQRPG QSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGAHFPLTFGQGTKLEIK(**SEQ ID NO：47)**
Hu14E3-Lb VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLQQRPG QSPRRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGAHFPLTFGQGTKLEIK(**SEQ ID NO：49)**
Hu22F1-Ha VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWVRQAPGQ GLEWMGDINPKDGDSGYSHKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS(**SEQ ID NO：51)**
Hu22F1-Hb VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWVRQAPGQ GLEWMGDINPKDGDSGYSHKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS**(SEQ ID NO：53)**
Hu22F1-Hc VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWVRQAPGQ GLEWMGDINPKDGDSGYSHKFKGRVTLTVDKSTSTVYMELRSLRS EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS(**SEQ ID NO：55)**
Hu22F1-Hd VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWLRQAPGQ GLEWIGDINPKDGDSGYSHKFKGRATLTVDKSTSTVYMELRSLRSE DTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS(**SEQ ID NO：57)**
Hu22F1-La VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPG QSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGTHFPYTFGGGTKVEIK(**SEQ ID NO：59)**
Hu22F1-Lb VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPG QSPRRLIYLVSKLDSGFPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGTHFPYTFGGGTKVEIK(**SEQ ID NO：61)**

【0236】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人GREM1抗體或其抗原結合片段，其：a)能夠在包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示，及/或b)能夠與包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之hGREM1片段結合，視情況該hGREM1片段具有至少3 (例如，4、5、6、7、8、9或10)個胺基酸殘基之長度；及/或c)能夠選擇性地在癌細胞中而不是非癌細胞中降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之抑制性；及/或d)在非癌細胞中表現出對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性不超過50%的降低；及/或e)能夠與包括SEQ ID NO：68所示胺基酸序列之嵌合hGREM1結合；及/或f)能夠降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之活化；及/或g)能夠根據Fortebio所量測的在不超過1 nM之KD處結合hGREM1。

【0237】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段亦包括一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留對hGREM1之特異性結合特異性或親和力。

【0238】在某些實施方式中，取代或修飾中之至少一者在VH或VL序列之一或多個CDR序列中，及/或在一或多個非CDR區中。

【0239】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段進一步包括免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或者視情況人IgG之恆定區。

【0240】在某些實施方式中，恆定區包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【0241】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【0242】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0243】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙特異性的。如本文所用，術語「雙特異性」包含具有兩種以上特異性之分子及具有兩種以上特異性之分子，亦即多特異性。在某些實施方式中，本文提供之雙特異性抗體及其抗原結合片段能夠特異性地與hGREM1之第一表位及第二表位結合，或能夠特異性地與hGREM1及第二抗原結合。在某些實施方式中，hGREM1之第一表位及第二表位彼此不同或沒有重疊。

在某些實施方式中，雙特異性抗體及其抗原結合片段可以同時與第一表位及第二表位結合。

【0244】在某些實施方式中，第二抗原不同於hGREM1。在某些實施方式中，第二抗原包括免疫相關靶標。在某些實施方式中，第二抗原包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16或CD83。

【0245】在某些實施方式中，腫瘤抗原包括腫瘤特異性抗原或腫瘤相關抗原。在某些實施方式中，腫瘤抗原包括前列腺特異性抗原(PSA)、CA-125、神經節苷酯G(D2)、G(M2)及G(D3)、CD20、CD52、CD33、Ep-CAM、CEA、鈴蟾素樣肽類、HER2/neu、表皮生長因子受體(EGFR)、erbB2、erbB3/HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、癌相關黏蛋白、VEGF、VEGFR (例如VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)、雌激素受體、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受體、EGFα、c-Kit受體、轉鐵蛋白受體、密封蛋白18.2、GPC-3、Nectin-4、ROR1、間皮素、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2或LIV-1。

【0246】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係不與小鼠gremlin1交叉反應的。

【0247】 在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係與小鼠gremlin1交叉反應的。

【0248】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑能夠降低對MAPK信號傳導之GREM1介導之活化。

【0249】

聯合治療方法

本文所提供之治療方法可以進一步包括提供第二治療劑的步驟以及向受試者投與治療有效量之第二治療劑的步驟，從而治療、預防、降低受試者GREM1相關疾病或病症之嚴重程度及/或減緩其進展。在此等實施方式之某些實施方式中，GREM1相關疾病或病症可為特徵在於PTEN及/或p53缺乏，及/或為特徵在於降低的雄激素受體(AR)信號傳導之癌症。

【0250】 在某些實施方式中，如本文所揭示的，與一或多種其他治療劑聯合投與的GREM1拮抗劑可以與一或多種其他治療劑同時投與，且在此等實施方式之某些實施方式中，GREM1拮抗劑及其他治療劑可以作為相同醫藥組合物之一部分經投與。然而，與另一種治療劑「聯合」投與的GREM1拮抗劑不必與該藥劑同時投與，或不必以與該藥劑相同之組分投與。如本文中所使用之片語，在另一種藥劑之前或之後投與GREM1拮抗劑被認為係與該藥劑「聯合」投與，亦即使GREM1拮抗劑及第二種藥劑為藉由不同途徑投與的。在可能的情況下，應根據其他治療劑產品資訊表中列出之時間表或根據2003年之《醫師桌上參考手冊》(醫師桌上參考手冊，第57版；醫療經濟學公司(Medical Economics Company)；ISBN: 1563634457；第57版(2002年11月))或此項技術中眾所周知的方案投與本文所揭示的與GREM1拮抗劑聯合投與之其他治療劑。

【0251】

i). 癌症之聯合治療

在一些實施方式中，可以投與本文揭示之GREM1拮抗劑以用於與第二種抗癌藥物聯合治療癌症，例如，化療劑(如順鉑)、抗癌藥物、放射療法、免疫療法(例如，免疫檢查點抑制劑MPDL-3280A)、抗血管生成劑、靶向療法、細胞療法、基因治療劑、激素治療劑、細胞介素、安寧療護、用於治療癌症(例如腫瘤切除術)之手術、一或多種止吐藥、用於由化療引起之併發症之治療，或用於癌症患者之飲食補充劑。

【0252】 如本文所用，術語「免疫療法」指刺激免疫系統對抗疾病諸如癌症或以一般方式增強免疫系統的一種療法。免疫療法包含被動免疫療法，藉由遞送具有已建立之腫瘤免疫反應性之藥劑(諸如效應細胞)，可以直接或間接介導抗腫瘤作用，並且不一定依賴於完整的宿主免疫系統(諸如抗體療法或CAR-T細胞療法)。免疫療法亦可以包括主動免疫療法，其中治療依賴於體內刺激內源性宿主免疫系統，藉由投與免疫反應調節劑對病變細胞作出反應。

【0253】 免疫療法之實例包含但不限於檢查點調節劑、過繼性細胞轉移、細胞介素、溶瘤病毒及治療性疫苗。

【0254】 檢查點調節劑可以干擾癌細胞避免免疫系統攻擊之能力，並幫助免疫系統對腫瘤做出更強烈的反應。免疫檢查點分子可以介導共刺激信號以增強免疫反應，或者可以介導共抑制信號以抑制免疫反應。檢查點調節劑之實例包含但不限於PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、

ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16及CD83。在某些實施方式中，免疫檢查點調節劑包括PD-1/PD-L1軸抑制劑。

【0255】 過繼性細胞轉移，此係一種試圖增強T細胞對抗癌症之天然能力的治療。在這種治療中，T細胞取自患者，並在體外擴增及活化。在某些實施方式中，T細胞在體外經修飾為CAR-T細胞。在體外大批量培養抗癌最活躍的T細胞或CAR-T細胞2至8週。在此期間，患者將接受諸如化療及放射療法等治療，以降低身體之免疫力。在此等治療後，體外培養之T細胞或CAR-T細胞將被送回患者體內。在某些實施方式中，免疫療法為CAR-T療法。

【0256】 細胞介素療法亦可以用於增強腫瘤抗原向免疫系統之呈遞。用於治療癌症的兩種主要類型之細胞介素為干擾素及白細胞介素。細胞介素療法之實例包含但不限於干擾素(諸如干擾素-α、-β及-γ)、集落刺激因子(諸如巨噬細胞CSF、粒細胞巨噬細胞CSF及粒細胞CSF)、胰島素生長因子(IGF-1)、血管內皮生長因子(VEGF)、轉化生長因子(TGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、白細胞介素(諸如IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11及IL-12)、腫瘤壞死因子(諸如TN-α及TNF-β)或其任何組合。

【0257】 溶瘤病毒為一種可以殺死癌細胞之轉基因病毒。溶瘤病毒可以特異性地感染腫瘤細胞，從而導致腫瘤細胞溶解，隨後釋放大量的腫瘤抗原，觸發免疫系統靶向並消除具有此類腫瘤抗原之癌細胞。溶瘤病毒之實例包含但不限於T-VEC (talimogene laherparepvec)。

【0258】治療性疫苗藉由增強免疫系統對癌細胞之回應來對抗癌症。治療性疫苗可以包括非致病性微生物(例如，牛分枝桿菌卡介苗BCG)、靶向腫瘤細胞之轉基因病毒，或一或多種免疫原性成分。例如，BCG可以用導管直接插入膀胱，並可引起針對膀胱癌細胞之免疫反應。

【0259】抗血管生成劑可以阻斷支持腫瘤生長的血管之生長。一些抗血管生成劑靶向VEGF或其受體VEGFR。抗血管生成劑之實例包含但不限於阿昔替尼、貝伐單抗、卡博替尼、依維莫司、來那度胺、甲磺酸樂伐替尼、帕唑帕尼、雷莫蘆單抗、瑞格非尼、索拉非尼、舒尼替尼、沙利度胺、凡德他尼及阿柏西普。

【0260】「靶向療法」為一種作用於與癌症相關之特定分子的療法，特定分子諸如存在於癌細胞中但不存在於正常細胞中之特定蛋白或癌細胞中含量較多的特定蛋白或有助於癌症生長及生存之癌症微環境中之靶分子。靶向療法將治療劑靶向腫瘤，從而使正常組織免受治療劑之影響。

【0261】靶向療法可以靶向例如酪胺酸激酶受體及核受體。此等受體之實例包含erbB1 (EGFR或HER1)、erbB2 (HER2)、erbB3、erbB4、FGFR、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、胰島素樣生長因子-1受體(IGF-1R)、雄激素受體(AR)、雌激素受體(ER)、核受體(NR)及PR。

【0262】靶向療法可以靶向酪胺酸激酶或核受體信號傳導級聯中之分子，諸如Erk及PI3K/Akt、AP-2α、AP-2β、AP-2γ、絲裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PTEN、p53、p19ARF、Rb、Apaf-1、CD-95/Fas、TRAIL-R1/R2、半胱胺酸蛋白酶8、Forkhead、Box 03A、MDM2、IAP、NF-kB、Myc、P13K、Ras、FLIP、調節蛋白(HRG) (亦稱為gp30)、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bak、Bad、Bok、Bik、Blk、Hrk、BNIP3、BimL、Bid

及EGL-1。

【0263】 靶向療法亦可以靶向腫瘤相關之配體，諸如雌激素、雌二醇(E2)、孕酮、雌甾激素、雄激素、糖皮質激素、催乳素、甲狀腺激素、胰島素、P70 S6激酶蛋白(PS6)、生存素、纖維母細胞生長因子(FGF)、EGF、Neu分化因子(NDF)、轉化生長因子α (TGF-α)、IL-1A、TGF-β、IGF-1、IGF-II、IGFBP、IGFBP蛋白酶及IL-10。

【0264】 在一些實施方式中，本文揭示之GREM1拮抗劑可以用於與第二種抗癌藥物聯合投與以治療前列腺癌。在某些實施方式中，抗癌藥物包括抗前列腺癌藥物。在一些實施方式中，抗前列腺癌藥物包括雄激素軸抑制劑；雄激素合成抑制劑；ADP-核糖聚合酶(PARP)抑制劑；或者其結合。

【0265】 在某些實施方式中，雄激素軸抑制劑選自由促黃體激素釋放激素(LHRH)促效劑、LHRH拮抗劑及雄激素受體拮抗劑組成之群。

【0266】 在某些實施方式中，雄激素軸抑制劑為地加瑞克、比卡魯胺、氟他胺、尼魯米特、阿帕魯胺、達洛魯胺、恩雜魯胺或阿比特龍。

【0267】 在某些實施方式中，雄激素合成抑制劑為醋酸阿比特龍酯或酮康唑。

【0268】 在某些實施方式中，PARP抑制劑為奧拉帕尼或盧卡帕尼。

【0269】 在某些實施方式中，抗前列腺癌藥物選自由以下組成之群：醋酸阿比特龍酯、阿帕魯胺、比卡魯胺、卡巴他賽、康士得(比卡魯胺)、達洛魯胺、地加瑞克、多西他賽、Eligard (醋酸亮丙瑞林)、恩雜魯胺、厄利達(阿帕魯胺)、費蒙格(地加瑞克)、氟他胺、醋酸戈舍瑞林、

Jevtana (卡巴他賽)、醋酸亮丙瑞林、立普安(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot (醋酸亮丙瑞林)、利普卓(奧拉帕利)、鹽酸米托蒽醌、Nilandron (尼魯米特)、尼魯米特、Nubeqa (達洛魯胺)、奧拉帕尼、普列威(Sipuleucel-T)、鐳223二氯化物、Rubraca (瑞卡帕布樟腦磺酸鹽)、瑞卡帕布樟腦磺酸鹽、Sipuleucel-T、泰素帝(多西他賽)、多菲戈(鐳223二氯化物)、安可坦(恩雜魯胺)、諾雷得(醋酸戈舍瑞林)及Zytiga (醋酸阿比特龍酯)。

【0270】 在某些實施方式中，癌症患者之飲食補充劑可為一種具有抗癌保護作用的適當補充劑。在某些實施方式中，飲食補充劑包括吲哚-3-甲醇或包括攝入後產生吲哚-3-甲醇之其衍生物。吲哚-3-甲醇被認為對抗癌有保護作用，亦可能對癌前病症有預防作用。

【0271】 在某些實施方式中，本文揭示之抗體或抗原結合片段可以與吲哚-3-甲醇或攝入後可產生吲哚-3-甲醇之其衍生物聯合投與。在某些實施方式中，此種組合對治療gremlin相關疾病係有用的。在某些實施方式中，此種組合對治療癌症係有用的，例如，乳癌、肝細胞癌及結直腸癌。在某些實施方式中，此種組合對治療乳癌係有用的，例如，三陰性乳癌。

【0272】

ii) 非癌症疾病之聯合治療

在一些實施方式中，可以投與第二治療劑以管理或治療至少一種與非癌症疾病(如纖維化)或癌症相關之併發症。

【0273】 在某些實施方式中，第二治療劑為抗纖維化劑(諸如吡非尼酮)、抗炎藥、NSAID、皮質類固醇(諸如普賴蘇)、營養補充劑、血管內

皮生長因子(VEGF)拮抗劑[例如，「VEGF-Trap」，諸如美國專利號7,087,411列出之阿柏西普或其他抑制VEGF之融合蛋白，或者抗VEGF抗體或其抗原結合片段(如貝伐單抗或雷珠單抗)]、針對細胞介素抗體(諸如IL-1、IL-6、IL-13、IL-4、IL-17、IL-25、IL-33或TGF-β)及任何其他有助於改善與纖維化相關病症或癌症相關之至少一個症狀的安寧療法。在某一實施方式中，第二治療劑為抗整合素抑制劑。

【0274】 另一方面，本發明提供了包括本文所提供之GREM1拮抗劑及第二治療劑的套組或醫藥組合物，該組合物可以以一種組合物調配，亦可以以不同的組合物調配。可以進一步包含使用說明或適應症，以提供有關如何進行聯合療法之資訊。

【0275】 在某些實施方式中，癌症患者之飲食補充劑可為一種具有抗癌保護作用的適當補充劑。在某些實施方式中，飲食補充劑包括吲哚-3-甲醇或包括攝入後產生吲哚-3-甲醇之其衍生物。吲哚-3-甲醇被認為對抗癌有保護作用，亦可能對癌前病症有預防作用。

【0276】 在某些實施方式中，本文揭示之抗體或抗原結合片段可以與吲哚-3-甲醇或攝入後可產生吲哚-3-甲醇之其衍生物聯合投與。在某些實施方式中，此種組合對治療gremlin相關疾病係有用的。在某些實施方式中，此種組合對治療癌症係有用的，例如，乳癌、肝細胞癌及結直腸癌。在某些實施方式中，此種組合對治療乳癌係有用的，例如，三陰性乳癌。

【0277】

投與途徑及劑量方案

本文提供之GREM1拮抗劑可以按治療有效劑量投與。如本文所提供

之抗體或抗原結合片段之治療有效量將取決於此項技術中已知之各種因素，諸如例如受試者之體重、年齡、既往病史、目前的藥物治療、健康狀況及交叉反應之可能性、過敏性、敏感性及不良副作用，以及投與途徑及疾病發展之程度。如由此等及其他情況或要求所指示的，一般熟習此項技術者(例如，醫師或獸醫)可按比例減少或增加劑量。

【0278】 在某些實施方式中，本文提供之GREM1拮抗劑(如抗體或抗原結合片段)可以以約0.01 mg/kg至約100 mg/kg之治療有效劑量投與。在某些實施方式中，投與劑量可在治療過程中改變。在某些實施方式中，取決於受試者之反應，投與劑量可在治療過程中改變。

【0279】 可以調整劑量方案以提供最佳的期望反應(如治療反應)。例如，可投與單次劑量，或可隨時間推移投與若干分次劑量。

【0280】 本文揭示之GREM1拮抗劑(如抗體及抗原結合片段)可以藉由目前此項技術中已知之任何途徑投與，諸如例如腸外(如皮下、腹腔內、靜脈，包含靜脈滴注、肌肉注射或皮內注射)或非腸外(如口服、鼻內、眼內、舌下、直腸或局部)途徑。

【0281】

偵測及/或診斷之方法

AR表現或信號傳導測定

一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有癌症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性的方法，包括：(a)偵測來自受試者之生物樣品中之雄激素受體(AR)表現或信號傳導，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的AR表現或信號傳導來確定回應之可能性。

【0282】 如本發明所用，術語「可能性」及「可能」表示治療反應

發生之可能性之百分比。在一些實施方式中，具有一種疾病或病症(如癌症)之受試者被確認為「可能反應」指具有一種疾病或病症之受試者具有超過30%之幾率、超過40%之幾率、超過50%之幾率、超過60%之幾率、超過70%之幾率、超過80%之幾率、超過90%之幾率對使用本文提供之GREM1拮抗劑的治療回應。

【0283】 對患者而言，有益的反應可以用許多臨床參數來表示，包含腫瘤偵測缺失(完全緩解)、腫瘤尺寸及/或腫瘤細胞數目減少(部分緩解)、腫瘤生長停滯(疾病穩定)、抗腫瘤免疫反應增強、可能導致腫瘤消退或排斥反應、在一定程度上減輕與腫瘤有關之一或多種症狀、增加治療後之生存時間及/或降低治療後某一特定時間點之死亡率。

【0284】 AR表現可以用此項技術中已知之任何合適之方法偵測。在一些實施方式中，本文所提供之方法涉及使用能夠偵測生物樣品中AR表現存在或AR表現水準之藥劑接觸生物樣品。偵測AR表現可以基於AR表現之存在或不存在，其中AR表現不存在表明該樣品為AR陰性。

【0285】 AR信號傳導可以使用此項技術中已知之任何合適之方法偵測或確定，包含但不限於藉由量測AR敏感基因產物，諸如PSA。可以確定AR敏感基因產物之水準，並與參考水準進行比較，其中偵測到的水準顯著低於參考水準表明AR信號傳導減弱。AR信號傳導之參考水準可以自已經確定在可比較之受試者中具有AR信號傳導參考水準之一或多個參考樣品獲得(例如自資料庫獲得之樣品)，其包含一組資料、標準或來自一或多個參考樣品之水準。在一些實施方式中，這一組資料、標準或水準為正規化的。

【0286】 減弱的AR信號傳導亦可以基於雄激素剝奪療法治療或AR

失活突變來測定。AR在DNA或RNA水準上之突變狀態或表現水準可以藉由此項技術已知之任何方法量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或者定序測定。AR在蛋白水準上之突變狀態或表現水準可以用此項技術已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法。

【0287】 在一些實施方式中，受試者當偵測到受試者不存在AR表現或信號傳導或者經偵測為具有相對於參考水準降低的AR表現或信號傳導時確定為具有對GRME1拮抗劑回應之可能性。

【0288】 在一些實施方式中，方法亦包括當偵測到受試者不存在AR表現或信號傳導，或者偵測到相對於參考水準降低的AR表現或信號傳導時，向受試者推薦測試GREM1表現。

【0289】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測來自受試者之生物樣品中GREM1表現。

【0290】 GREM1表現可以使用此項技術已知之任何合適方法來偵測。在一些實施方式中，本文所提供之方法涉及使用能夠偵測生物樣品中GREM1表現存在或水準之藥劑接觸生物樣品。偵測GREM1表現可以基於GREM1表現之存在或不存在，其中存在GREM1表現表明樣品為GREM1陽性。

【0291】 或者，可以根據GREM1表現之水準進行偵測，其中偵測水準高於參考水準表明GREM1陽性。參考水準可以自一或多個參考樣品中獲得(例如，來自健康受試者、健康組織甚至腫瘤患者之癌前組織中獲得的樣品)。偵測GREM1表現可以在參考樣品及相關生物樣品中平行地進行。參考水準亦可以自資料庫中獲得，其包含一組資料、標準或來自一或多個參考樣品之水準。在一些實施方式中，這一組資料、標準或水準為正

規化的。

【0292】 在一些實施方式中，當在生物樣品中沒有偵測到GREM1表現時，方法亦包括監測一段時間後受試者體中GREM1表現，例如，一個月後、兩個月後、三個月後等。

【0293】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現或相對於參考水準提高的GREM1表現時，受試者經確定為具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0294】 另一方面，本發明提供了一種偵測經確定為AR表現缺失或經確定為雄激素受體(AR)信號傳導減弱的樣品中GREM1存在或數目的方法，包括用GREM1之偵測試劑接觸樣品，及確定樣品中GREM1之存在或數目。

【0295】 在一些實施方式中，如本文所揭示的，自患有或疑似患有癌症之受試者獲得樣品。

【0296】 在一些實施方式中，方法亦包括向確定對GREM1拮抗劑具有回應可能性之受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑(例如，本文提供之任何抗GREM1抗體或其抗原結合片段)。

【0297】

PTEN/p53偵測

另一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有疾病或病症之受試者中對GREM1拮抗劑回應可能性的方法，包括：(a)偵測來自該受試者之生物樣品中之PTEN及/或p53之缺乏，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的PTEN及/或p53之缺乏來確定回應之可能性。

【0298】 PTEN及/或p53之活性或水準之缺乏可以導致PTEN及/或

p53沒有或低於正常功能，或生物樣品中功能性PTEN及/或p53表現水準缺失或降低。

【0299】 在一些實施方式中，方法亦包括使用此項技術已知之任何合適之方法偵測功能性PTEN及/或p53之表現水準，例如但不限於，擴增測定、雜交測定、定序測定或免疫測定法。在一些實施方式中，本文所提供之方法涉及使用能夠偵測生物樣品中功能性PTEN及/或p53存在或水準之藥劑接觸生物樣品。偵測功能性PTEN及/或p53表現可以基於功能性PTEN及/或p53之存在或不存在或水準，其中功能性PTEN及/或p53缺失或降低之水準表明樣品中PTEN及/或p53之活性或水準缺乏。在一些實施方式中，方法亦包括偵測PTEN及/或p53之突變狀態，例如，在DNA或RNA水準。

【0300】 在一些實施方式中，當偵測到受試者PTEN及/或p53缺乏時，受試者經確定為對GREM1拮抗劑具有回應之可能性。

【0301】 在一些實施方式中，方法亦包括當偵測到受試者PTEN及/或p53缺乏時，向受試者推薦測試GREM1表現。

【0302】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測來自受試者之生物樣品中GREM1表現。相似地，使用上文描述之任何相似的方法偵測及確定GREM1表現。

【0303】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現時，受試者經確定為對GREM1拮抗劑具有回應之可能性。

【0304】 在一些實施方式中，當在生物樣品中沒有偵測到GREM1表現，方法亦包括監測一段時間後受試者體中GREM1表現，例如，一個月後、兩個月後、三個月後等。

【0305】 一方面，本發明提供了一種偵測經確定為缺乏PTEN及/或p53之樣品中之GREM1之存在或含量的方法，包括使樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定樣品中之GREM1之存在或含量。

【0306】 在一些實施方式中，如本文所揭示的，樣品係自患有或疑似患有GREM1相關疾病或病症之受試者獲得的。

【0307】 在一些實施方式中，方法亦包括向確定對GREM1拮抗劑具有回應可能性之受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑(例如，本文提供之任何抗GREM1抗體或其抗原結合片段)。

【0308】

生物樣品

可以使用自受試者獲得的合適之生物樣品確定生物標誌物(例如，AR、PTEN、p53及/或GREM1)之存在及/或表現水準及/或突變狀態。

【0309】 在一些實施方式中，生物樣品含有或疑似含有癌細胞。在一些實施方式中，自癌症微環境中獲得生物樣品。在一些實施方式中，生物樣品可以自受試者獲得或源自受試者，例如，福爾馬林固定石蠟包埋(FFPE)組織、新鮮活檢、血液(疑似含有循環腫瘤細胞)或其他體液。在一些實施方式中，可以自生物樣品中分離出癌細胞、間質細胞及/或胞外基質。在某些實施方式中，可以對生物樣品進行進一步處理以例如分離分析物(諸如核酸或蛋白)。

【0310】 在某些實施方式中，生物樣品包括癌細胞、間質細胞、間質或纖維化細胞。

【0311】

偵測及/或測定

如本文所用，術語「測定」、「量測」及「偵測」可以互換使用，並且指定量測定及半定量測定。

【0312】 本文提供之生物標誌物AR、PTEN、p53及/或GREM1旨在包括不同的形式，包含mRNA、蛋白及DNA (例如，基因組DNA)。因此，此等生物標誌物之水準及/或活性可以藉由相應生物標誌物之RNA (例如，mRNA)、蛋白或DNA (例如，基因組DNA)來量測。類似地，生物標誌物之突變狀態亦可以藉由DNA (例如，基因組DNA)、RNA (例如，mRNA)或蛋白(例如，藉由量測突變基因編碼之改變的蛋白產物)來量測。

【0313】 生物標誌物在DNA或RNA水準之表現水準可以藉由此項技術已知之任何方法量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或定序測定，使用之技術包含但不限於：RNA定序(RNA-seq)及RNAscope (Wang, Z.、Gerstein, M.及Snyder, M. (2009)之「RNA-seq：轉錄組學之革命性工具(RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics)」，《自然綜述：遺傳學(Nature Reviews Genetics)》，10(1), 57-63；Wang等人之「RNAscope：福爾馬林固定石蠟包埋組織之新型原位RNA分析平台(RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues)」，《分子診斷學雜誌(J Mol Diagn)》，2012 年1月；14(1): 22-9。)。生物標誌物在蛋白水準上之表現水準可以藉由此項技術已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法(諸如蛋白免疫墨點、酶聯免疫吸附測定(ELISA)、酶免疫測定(EIA)、放射免疫測定(RIA)、夾心測定、競爭性測定、免疫螢光染色及成像、免疫組化(IHC)及螢光活化細胞分選(FACS))。

【0314】 生物標誌物在DNA或RNA水準上之突變狀態可以藉由此項

技術已知之任何方法來量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或定序測定。蛋白水準上之突變狀態可以用此項技術已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法。

【0315】 生物標誌物之活性水準可以藉由此項技術已知的合適之功能性測定來量測。

【0316】 此等方法在此項技術中為眾所周知的，下面將作為示例詳細描述。

【0317】

i. ***擴增測定***

核酸擴增測定涉及複製靶標核酸(如DNA或RNA)，由此增加擴增之核酸序列之拷貝數。擴增可以係指數型或線性的。示例性之核酸擴增方法包含但不限於使用聚合酶鏈反應(「PCR」，參見美國專利4,683,195及4,683,202；PCR方案：方法及應用指南(PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications) (Innis等編輯，1990))、逆轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)、定量即時PCR (qRT-PCR)；定量PCR (諸如TaqMan®、巢式PCR)連接酶鏈反應(參見Abravaya, K等人之《核酸研究》，23:675-682，(1995)，分支DNA信號擴增(參見Urdea, M. S.等人之(艾滋病(AIDS))，7(增刊2)：S11-S14, (1993)、擴增RNA報告基因、Q-β複製(參見Lizardi等人之《生物技術(Biotechnology)》，(1988)6:1197)、基於轉錄之擴增(參見Kwoh等人之《美國國家科學院院刊》，(1989) 86:1173-1177)、回旋鏢DNA擴增、鏈置換活化、循環探針技術、自我維持之序列複製(Guatelli等人之《美國國家科學院院刊》，(1990) 87:1874-1878)、滾環複製(美國專利號5,854,033)、等溫依賴核酸序列擴增(NASBA)及基因表現

系列分析(SAGE)之擴增。

【0318】

雜交測定

核酸雜交測定使用探針與靶標核酸雜交，從而允許偵測靶標核酸。雜交測定之非限制性實例包含北方墨點、南方墨點、原位雜交、微陣列分析及基於多重雜交之測定。

【0319】 在某些實施方式中，用於雜交測定之探針為可偵測標記的。在某些實施方式中，用於雜交測定的基於核酸之探針為未標記的。此種未標記之探針可以固定在固體支持物諸如微陣列上，並且可以與經可偵測標記之靶標核酸分子雜交。

【0320】 在一些實施方式中，雜交測定可以在微陣列上進行。

【0321】

定序方法

定序方法允許測定靶標核酸之核酸序列，亦可以對已定序之靶標核酸進行計數，從而量測靶標核酸之水準。定序方法之實例包含但不限於RNA定序、焦磷酸定序及高通量定序。

【0322】 高通量定序涉及邊合成邊定序、邊連接邊定序及超深度定序(諸如Marguiles等人之《自然》，437 (7057): 376-80 (2005)中所述)。邊合成邊定序可以使用折返式PCR及錨定引物在固體表面(或微陣列或晶片)上進行。靶標核酸片段可以藉由與錨定引物雜交附著在固體表面上，並進行橋式擴增。例如，該技術應用於例如在Illumina®定序平台。

【0323】 在某些實施方式中，本文所述之相關生物標誌物之突變及/或野生型狀態之偵測以及水準之偵測係藉由整個轉錄組定序或RNA定序

(例如，RNA-seq)進行的。簡言之，RNA-seq包括將靶標mRNA逆轉錄為cDNA，將cDNA進行片段化並定序，以及分析序列資料以進行mRNA定量；RNAscope包括用螢光探針共軛的一或多個寡核苷酸原位雜交靶標mRNA，以及藉由量測螢光強度偵測mRNA水準。

【0324】

免疫測定法

免疫測定法通常涉及使用特異性結合生物標誌物多肽或蛋白(如本文提供之ATM、ATR、MDM2及/或p53蛋白)之抗體來偵測或量測靶標多肽或蛋白之存在或水準。此類抗體可以使用此項技術已知的方法獲得(參見例如Huse等人之《科學(*Science*)》，(1989) 246:1275-1281；Ward等人之《自然》，(1989) 341 :544-546)或者可以自商業來源獲得。免疫測定法之實例包含但不限於西方墨點、酶聯免疫吸附測定(ELISA)、酶免疫測定(EIA)、放射免疫測定(RIA)、夾心測定、競爭性測定、免疫螢光染色及成像、免疫組織化學(IHC)及螢光活化細胞分選(FACS)。為了查閱免疫學及免疫測定程序之綜述，參見基礎及臨床免疫學(Basic and Clinical Immunology) (Stites及Terr編輯，第7版，1991)。此外，免疫測定法可以若干組態中之任何一種進行，該組態在《酶免疫測定法(Enzyme Immunoassay)》(Maggio編輯，1980)；以及Harlow及Lane，同上文中廣泛綜述。為了查閱習知之免疫測定法，參見《細胞生物學方法：細胞生物學中之抗體(*Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biolog*)》，第37卷(Asai編輯，1993)；《基礎及臨床免疫學(*Basic and Clinical Immunology*)》(Stites及Terr編輯，第7版，1991)。

【0325】 在某些實施方式中，本發明之方法包含量測AR、PTEN、

p53及/或GREM1之表現水準或基因拷貝數。p53之活性可以藉由偵測p53第15位胺基酸殘基之磷酸化或者藉由偵測p53的下游靶標基因表現水準之變化來量測。由於蛋白質具有發揮多種生物活性之能力，對於一種特定的蛋白質可能存在幾種可接受的生物測定方法。用於量測AR、PTEN、p53及/或GREM1之活性的示例性之功能性測定可以在Lee J-H等人之《生物化學雜誌》，288:12840-12851 (2013)、Loughery J等人之《核酸研究》，42:7666-7680 (2014)、Thompson T等人之《生物化學雜誌》，279:53015-53022 (2004)、Wienken, M 等人之《分子細胞生物學雜誌(*J. Mol. Cell Biol.*)》，2017；**9(1):** 74-80中找到。

【0326】 在某些實施方式中，相對於AR、PTEN及/或p53基因產物之參考水準，AR、PTEN及/或p53各自基因產物之表現水準之降低(例如，至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%降低)表明生物樣品中AR、PTEN及/或p53活性或水準缺乏。

【0327】 在某些實施方式中，AR、PTEN及/或p53之表現水準可以正規化為內部控制值或標準曲線。例如，本文所述之AR、PTEN及/或p53之水準可以正規化為標準標誌物之標準水準。標準標誌物之標準水準可以預先確定、同時確定或在自受試者獲得樣品後確定。標準標誌物可以在同一測定中運行，或者可為先前測定中之已知標準標誌物。在PTEN及/或p53之水準藉由定序測定(如RNA定序)確定的情況下，可以將生物標誌物之水準正規化為定序總讀數。

【0328】 在某些實施方式中，若待量測的是AR、PTEN及/或p53之RNA或DNA水準，方法亦包括自樣品中分離核酸。各種提取方法都適用

於自細胞或組織中分離DNA或RNA，諸如苯酚及氯仿提取以及本文中記載之其他各種方法，如Ausubel等人之《分子生物學實驗室指南(*Current Protocols of Molecular Biology)*》，(1997)，John Wiley & Sons，及Sambrook及Russell之《分子克隆：實驗室手冊(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)》，*第3版*(2001)。

【0329】 可商購套組亦可以用於分離RNA，包含例如NucliSens提取套組(生物梅里埃(Biomerieux)，法國馬西伊特萊爾)、QIAamp™小型血液套組、Agcourt Genfind™、Rneasy®小型柱(凱傑(Qiagen))、PureLink® RNA小型套組(賽默飛世爾科技(Thermo Fisher Scientific))及Eppendorf Phase Lock Gels™。技術人員可以按照製造商之方案容易地提取或分離的RNA或DNA。

【0330】

套組

另一方面，本發明進一步提供了用於本文之方法的套組。

【0331】 在一個實施方式中，套組包括：第一試劑或第一套試劑，用於偵測PTEN/p53中一或多個失活突變之存在或缺失；或一或多種試劑，用於量測PTEN/p53之表現水準。在一個實施方式中，其中套組進一步包括第二試劑，用於偵測GREM1之存在或缺失或表現水準。

【0332】 在一個實施方式中，套組包括：第一試劑，用於量測AR失活突變之表現水準或存在或缺失。在一個實施方式中，套組進一步包括第二試劑，用於偵測GREM1之存在或缺失或表現水準。

【0333】 在某些實施方式中，第一試劑包括針對PTEN或p53或AR之一或多個引物、一或多個探針及/或一或多個抗體。在某些實施方式

中，第二試劑包括針對GREM1之一或多個引物、一或多個探針及/或一或多個抗體。該引物、探針及/或抗體可以進行可偵測之標記或不可以進行可偵測之標記。

【0334】 在某些實施方式中，套組進一步可以包括實施本文記載之方法的其他試劑。在此類應用中，套組可以包含以下任何一項或全部：合適之緩衝液、分離核酸之試劑、擴增核酸之試劑(如聚合酶、dNTP混合物)、核酸雜交試劑、核酸定序試劑、核酸定量試劑(如插層劑、偵測探針)、蛋白分離試劑、蛋白偵測試劑(如第二抗體)。通常，在本文所提供之任何方法中有用的試劑都包含在載體或分隔開的容器中。載體可為一個例如袋、盒、管、架子形式之容器或支持物，且視情況被分隔開。

【0335】 在某些實施方式中，本發明提供了本文中提供之第一試劑的用途，在用於本文提供之診斷方法之診斷試劑的製備中，視情況及第二試劑一起使用。

【0336】 在一些實施方式中，本發明亦提供了GREM1拮抗劑(例如，本文提供之抗體或其抗原結合片段)在製備用於治療或診斷受試者中表現GREM1之癌症之藥物中的用途，其中GREM1相關疾病或病症經確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0337】 在一些實施方式中，本發明亦提供了GREM1拮抗劑(例如，本文提供之抗體或抗原結合片段)在製備用於治療或診斷受試者中與GREM1相關之疾病或病症之藥物中的用途，其中GREM1相關疾病或病症經確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0338】

實施例

雖然本發明已經參照特定實施方式(其中一些為較佳實施方式)具體地呈現及描述，但熟習此項技術者應理解，可以在不背離如本文所揭示的本發明之精神及範疇的情況下在其中進行形式及細節上之各種改變。

【0339】

實施例1：前列腺癌(PCa)中Gremlin1之上調與去勢抵抗性之發展及不良的疾病結果密切相關。

分泌蛋白為用於抗癌藥物開發的一組重要的潛在治療靶標。為了篩選在去勢抵抗前列腺癌(CRPC)中特異性上調之分泌蛋白，我們對已公佈之RNA定序資料集進行了資料挖掘。在激素難治性PCa中，Gremlin1之表現在編碼分泌蛋白之差異表現基因中位居首位(*Best, C.J等人之雄激素消融療法後原發性前列腺癌之分子改變(Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy)，《臨床癌症研究(Clin Cancer Res)》，11, 6823-6834 (2005)*)。對其他PCa資料集之進一步分析表明與未使用激素之PCa相比，在晚期轉移性CRPC中Gremlin1表現水準顯著高於初級PCa或者在激素難治性PCa之表現水準(基於*Yu, Y.P.等人之前列腺癌基因表現之改變預測腫瘤侵入及惡性腫瘤之前期發展(Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy)，《臨床腫瘤學雜誌(J Clin Oncol)》，22, 2790-2799 (2004)；Best, C.J.等人之雄激素消融療法後原發性前列腺癌之分子改變，《臨床癌症研究》，11, 6823-6834 (2005)*之定序資料)。重要的是，根據對前列腺癌(TCGA, Firehose Legacy)之資料分析，*GREM1*擴增與縮短的疾病/無進展生存期相關。然後，我們對上海交通大學醫學院附屬仁濟醫院之一大組139名人PCa患者進行了Gremlin1免

疫組化(IHC)染色。在這139例患者樣本中，60個樣品來自去勢抵抗性前列腺腫瘤患者。對IHC結果之定量研究表明與激素敏感之PCa (HSPC)相比，CRPC樣品中Gremlin1之染色強度顯著增強(圖1A、圖1B)。PCa中Gremlin1表現較高之患者具有顯著較短的總生存期(圖1H)。基於SU2C 2019 PCa資料集之定序資料(*A Robinson等人之《細胞(Cell)》，161(5), 1215-1228 (2015)*)，其亦揭示了*GREM1*轉錄升高的患者顯示出較短的總生存期。總體而言，Gremlin1在CRPC中上調，且與不良的疾病結果密切相關。

【0340】

實施例2：*GREM1*之轉錄受AR抑制，且在ADT後轉錄增加。

AR在PCa中起著核心作用。為了評估Gremlin1及AR信號傳導之間的關係，我們對CRPC樣本切片進一步進行Gremlin1及PSA (AR之典型下游靶標)進行IHC染色。統計學分析表明在具有PSA低染色強度之CRPC中Gremlin1表現明顯上調(圖1C)。此外，我們偵測到與由完整小鼠之異源移植體生成的對照LNCaP細胞株相比，來源於植入去勢小鼠中之異源移植體LNCaP腫瘤的去勢抵抗性LNCaP細胞株(稱為LNCaP R)中之GREM1顯著增加(圖2A)。然後，我們詢問GREM1之表現是否受到AR信號傳導之調控。我們利用AR表現慢病毒或CRISPR/Cas9方法以在LNCaP PCa細胞株中實現*AR*上調(圖2B)或敲除(圖2D)。免疫墨點及q-PCR實驗共同表明AR抑制了*GREM1*之轉錄(圖2B至圖2E)。該結論得到了AR促效劑R1881及拮抗劑恩雜魯胺治療實驗之支持(圖1D、圖1E)。

【0341】 此外，我們進行了螢光素酶報告蛋白測定。*GREM1*啟動子驅動之螢光素酶活性被R1881之治療極大地抑制，而被添加的恩雜魯胺增

強(圖1F)。ChIP實驗結果進一步表明AR與*GREM1*之啟動子區域結合(圖1G)。此等結果共同表明GREM1在CRPC中升高，並且受到AR之負調控。

【0342】

實施例3：雄激素剝奪時GREM1促進PCa細胞增殖及腫瘤生長。

轉移性前列腺癌為一種毀滅性的疾病，並且在藉由使用雄激素受體拮抗劑或化療之系列治療時大多數癌症發展。抵抗此等治療之關鍵細胞類型之一為具有幹細胞類似性質之細胞，該性質在懸浮培養中具有形成腫瘤球之能力。為了探索GREM1在CRPC進展中之作用，我們利用AR非依賴性CRPC細胞株PC3，以及AR依賴性PCa細胞株LNCaP及LAPC4。我們生成了GREM1表現缺失或增加的細胞亞系(圖3A、圖4A及圖5A)。PC3中*GREM1*敲除抑制了細胞之球形成能力、細胞生長及存活，然而與相應對照亞系相比，在培養基中GREM1過表現或添加100 ng/ml之GREM1蛋白導致顯著升高的細胞球形成能力及增殖能力(圖3B、圖3C、圖3D及圖4B)。此外，我們發現，在體內*GREM1*之敲除顯著地抑制了PC3腫瘤之生長，而在限制性稀釋測定中，*GREM1*過表現則促進了腫瘤之生長及腫瘤形成之發生率(圖3E、圖3F)。

【0343】 此外，在*Hi-Myc*小鼠(一種用於PCa之基因工程化小鼠模型(GEMM))中生成的PCa類器官中之GREM1外源表現促進了雄激素剝奪條件下之類器官生長(圖3G及圖3H)。*GREM1*敲除極大地增強了恩雜魯胺對AR依賴性LNCaP及LAPC4細胞之抑制作用，同時*GREM1*過表現或添加的GREM1蛋白導致LNCaP及LAPC4細胞中對恩雜魯胺治療之回應受到影響(圖4A至圖4D及圖5A至圖5D)。此等資料共同表明GREM1在PCa及去勢

抵抗性之發展中具有促進腫瘤的作用。

【0344】

實施例4：GREM1在PCa中之致瘤作用依賴於FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化。

為了闡明GREM1致瘤作用之潛在機制，我們進行RNA定序以比較*GREM1*過表現LNCaP亞系及其對照細胞之間的轉錄差異。我們在圖6A中列出了表現差異最顯著的基因集。在上調的信號傳導通路中FGFR及MAPK信號傳導最為活躍。進一步之基因集富集分析(GSEA)表明在用表現GREM1之慢病毒轉染的LNCaP細胞中，存在FGFR1信號傳導之富集及MAPK活性之活化(圖6B)。此外，除GREM1之上調之外(圖2A)，我們亦發現與未使用激素之LNCaP細胞相比，在去勢抵抗性LNCaP細胞中MAPK及FGFR1均被活化(圖7A)。鑒於最近的發現，FGF信號之活化對於AR非依賴性CRPC生長為必需的，這一點尤其相關。

【0345】 為了測試Gremlin1是否促進FGFR-MAPK信號傳導，我們首先對CRPC患者中四種FGFR之表現水準進行分析。基於SU2C CRPC群組之定序資料(*Robinson等人之《細胞》，161(5), 1215-1228 (2015)*)，*FGFR1*為CRPC中表現最豐富的FGFR。因此，我們主要檢查了GREM1治療後FGFR1之活化情況。我們用不同濃度(1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)之GREM1處理LNCaP及PC3，並檢查FGFR1、MEK及ERK之磷酸化水準。我們使用已知的FGFR1配體FGF1作為陽性對照。如圖6C所示，GREM1治療導致p-FGFR1、p-MEK1/2及p-ERK1/2以劑量依賴之方式增加。我們進一步發現GREM1對FGFR1-MAPK軸之活化係不依賴於BMP的，因為添加BMP4沒有改變GREM1刺激後FGFR1、MEK1/2及ERK1/2

之磷酸化水準(圖6D)。有趣的是，我們發現GREM1比FGF1誘導更長的MAPK信號傳導之活化。在加入GREM1達1小時後，回應於GREM1治療之MAPK之活化保持在較高水準，而在FGF1刺激後10分鐘內MAPK信號傳導被高度活化並且之後快速減小(圖6E、圖6F)。此外，GREM1之外源表現導致源自*Hi-myc*小鼠PCa模型之PCa類器官中的MAPK/FGFR1信號傳導軸之活化(圖7B)。

【0346】 MAPK信號傳導可以藉由FGFR及很多膜受體活化。為了偵測由GREM1之MAPK通路之活化是否藉由FGFR，我們藉由CRISPR/Cas9方法構築了*FGFR1*敲除之LNCaP亞系。如圖6G所示，經GREM1處理之ERK1/2及MEK1/2磷酸化可以藉由*FGFR1*之敲除而消除。此外，藉由*FGFR1*之敲除，可以消除GREM1介導的對PCa細胞生長及球形成之促進作用(圖8A至圖8E)。為了進一步測試GREM1之腫瘤促進作用是否藉由FGFR，我們利用了FGFR或EGFR之小分子抑制劑。藉由GREM1活化MAPK/FGFR1信號傳導軸可以被FGFR1抑制劑BGJ398而非EGFR抑制劑厄洛替尼來減弱(圖6H、圖6I)。此外，如8A、B所示，GREM1對PCa增殖及球形成之促進作用可以藉由採用FGFR抑制劑BGJ398或MEK抑制劑曲美替尼處理而顯著地減弱，但添加BMP4則不影響。此等結果表明Gremin1之致瘤作用係歸因於FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化。

【0347】

實施例5：GREM1為PCa中之一種新的FGFR1配體。

接下來，我們探究了GREM1活化FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之機制。我們進行表面電漿共振分析(Fortebio)，以首先評估GREM1是否可

以與FGFR1結合。如圖9A所示，FGFR1以高親和力(KD=1.06E-08 M)與固定在ForteBio感測器晶片上之GREM1結合。電腦模擬模擬了GREM1與FGFR1之胞外域結合作為二聚體(圖9B)。藉由在293T細胞及LNCaP細胞中均使用外源表現的Flag-標記之GREM1及HA標記之FGFR1的免疫共沈澱測定(圖9C)或LNCaP細胞中之內源性蛋白(圖9D)進一步證實了FGFR1及GREM1之間的結合。圖9F所示之下拉實驗支持了FGFR1及GREM1之間的直接締合。圖9E進一步表明藉由酶聯免疫吸附測定(ELISA)量測，Gremlin 1而非Gremlin 2或DAN蛋白家族之其他成員與FGFR1結合。此外，可以藉由添加過量的可溶性FGFR1來減弱FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路上GREM1之活化(圖9G)。

【0348】我們進行雙分子螢光互補(BiFC)測定來測試GREM1及FGFR1之相互作用。將與黃色螢光蛋白(YFP)編碼序列之片段融合的GREM1及FGFR1 cDNA單獨地或同時轉染至293T細胞。如圖9H所示，只有當GREM1及FGFR1質體轉染時，才能偵測到YFP信號。

【0349】與此一致，免疫螢光染色之共聚焦顯微鏡成像顯示在LNCaP-R細胞之膜上Gremlin1及FGFR1共定位(圖9I)。此外，競爭性ELISA實驗(圖9G)揭示了可溶性FGFR1可以競爭結合在Gremlin1及FGFR1之間。藉由施加過量的可溶性FGFR1，Gremlin1引起的FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化可以被減弱(圖9G)。此等資料為Gremlin及FGFR1之間的特異性結合提供了強有力的證據，並支持了這種結合對於FGFR1及其下游MAPK信號傳導之活化係必需的這一概念(圖9G)。

【0350】為了進一步描述Gremlin1/FGFR1相互作用之模式，我們

在截短的FGFR1 (圖9J至圖9K)與Gremlin1或典型的FGFR1配體FGF1之間進行了免疫共沈澱。已明確定義FGFR1之胞外區由域1 (D1)、域2 (D2)及域3 (D3)組成。與之前的報導一致，D2及D3之間的連接子為FGF1及FGFR1之間的關鍵結合區域，我們發現D2或D3之缺失破壞了FGF1及FGFR1之免疫共沈澱。相反，只有D2缺失消除了Gremlin1及FGFR1之間的締合，此表明Gremlin1在D2處與FGFR1結合(圖9J至圖9K)。此外，我們對FGFR1 (C176及R248)與FGF1結合袋中之彼等以前確定的關鍵胺基酸殘基進行突變(圖9P)。正如所預期的那樣，FGFR1-C176G或FGFR1-R248Q確實破壞了FGF1及FGFR1之免疫共沈澱，而此兩種突變並不影響Gremlin1及FGFR1之間的相互作用(圖9P至圖9Q)。此等資料表明FGFR1以不同於其典型配體FGF1之結合模式的一種方式與Gremlin1結合。與此相一致的是，Fortebio測定、免疫螢光共染色及免疫共沈澱實驗共同證明添加Gremlin1並沒有競爭FGF1及FGFR1之締合，反之亦然(圖9R至圖9U)。因此，Gremlin1及FGF1可能結合在FGFR1之不同位點。然後，我們評估了已公佈的RNA-seq資料集中CRPC患者樣品中Gremlin1及各種FGF之表現水準(*Robinson等人之《細胞》，161(5), 1215-1228 (2015)*)。我們觀察到*GREM1*轉錄物高於FGF。此等資料共同表明，Gremlin1用作CRPC中FGFR1之主要配體。

【0351】下一個問題為破解Gremlin1/FGFR1相互作用之結構基礎。我們使用HDOCK平台(http://hdock.phys.hust.edu.cn/)對先前表徵之Gremlin1蛋白結構(PDB :5AEJ) (*Kisonaite等人之Gremlin-1之結構及其與BMP-2之相互作用分析(Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2)，《生物化學雜誌》，473, 1593-1604(2016)*)及

FGFR1胞外區(PDB: 3OJV) (*Beenken等人之纖維母細胞生長因子1 (FGF1) N端與FGF受體相互作用之可塑性為FGF1濫交之基礎(Plasticity in interactions of fibroblast growth factor 1 (FGF1) N terminus with FGF receptors underlies promiscuity of FGF1*，《生物化學雜誌》，*287, 3067-3078 (2012)*)進行對接。如圖9B所示，Gremlin1中兩簇帶正電的胺基酸殘基(相對於SEQ ID NO：69之Lys66-Arg67；R92-Lys123-Lys124-Arg148-Lys150-Arg153)及FGFR1之胞外域2被預測為Gremlin1及FGFR1之間的基本結合區域。然後，我們按照圖9L及圖9N所示進行誘變，以測試蛋白質結合模擬。Gremlin1上之Lys123Lys124突變為Ala123Ala124 (編號相對於SEQ ID NO：69)或FGFR1之E160A突變體嚴重損害了Gremlin1及FGFR1之間的免疫共沈澱(圖9M及圖9O)。對接模組突出顯示Gremlin1及FGFR1之間結合袋中之關鍵胺基酸殘基(圖9V)。因此，Gremlin1之Lys123-Lys124 (編號相對於SEQ ID NO：69)及FGFR1對應的Glu160為形成Gremlin1/FGFR1蛋白複合物之關鍵胺基酸殘基。

【0352】

實施例6：抗GREM1抗體顯著抑制*Pbsn-Cre4；PTEN$^{fl/fl}$；Trp53$^{fl/fl}$* GEMM中去勢抵抗性PCa之發展。

在CRPC中GREM1之上調及致瘤作用使其成為一個有前景的治療靶標。圖10O示出了顯示對*Pbsn-Cre4；PTEN$^{fl/fl}$；Trp53$^{fl/fl}$* GEMM治療之示意圖。如文所示，接受抗鼠Gremlin1抗體(抗m-GREM1抗體) (腹腔內，10 mg/kg)或IgG之小鼠，每週三次持續2個月，在2個月時，小鼠被去勢。為了靶向GREM1，我們開發了一種高親和力的鼠GREM1單株抗體，本發明中亦稱為替代抗體。該替代抗體不與Gremlin2或其他BMP拮抗劑

(諸如COCO及DAN)結合(圖10A)。為了測試抗mGREM1抗體對PCa之作用，我們利用了平均3個月發生自發性侵入性PCa之*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$ GEMM。以前已經證明*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$ PCa係新生的去勢抵抗性的。藉由免疫染色我們定量了完整或去勢的*Pbsn-Cre4；Pten*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$ PCa及野生型前列腺樣品中GREM1之表現水準。如圖10B所示，與野生型前列腺相比，在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤中GREM1高度上調，接下來係完整的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤，且GREM1在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤進一步富集。

【0353】E鈣黏附素及GREM1之免疫共染色表明在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤中，Gremlin主要由腫瘤上皮細胞表現(圖11A)。值得注意的是，對*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠之幾個主要器官中*Grem1*之定量PCR分析表明*Grem1*在前列腺癌組織中的表現最高(圖1I)，這使得Gremlin1成為PCa可信的治療靶標。

【0354】我們將抗mGREM1抗體應用在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠中，並且評估其在CRPC發展之體內作用。兩個月大的PTEN/P53$^{\Delta/\Delta}$小鼠被去勢，並施加抗GREM1抗體或對照IgG2a治療，每週三次，劑量為10 mg/kg，持續8週(圖10C)。去勢兩個月後，動物被處死用於分析。如圖10C、圖10D所示，所有對照IgG2a治療小鼠均罹患惡性CRPC。抗mGREM1抗體對PCa之生長具有明顯的抑制作用，這可以藉由顯著抑制總的腫瘤外觀、腫瘤重量及增殖性PCNA陽性細胞顯著減少得到證明(圖10E)。抗GREM1處理之*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠之前列腺切片的H&E染色大多表現為導管內增生，基底膜完整，這與注射

IgG2a小鼠之侵入性PCa表型形成了鮮明對比(圖10F)。在10 mg/kg劑量下，我們觀察到包含腸、肺、肝、脾、骨髓、腎等之主要器官無明顯差異，兩實驗組間外周血細胞計數亦無變化(圖11B、圖11C)，這表明抗mGREM1抗體具有較強的抗腫瘤作用，且無明顯副作用。

【0355】 為了理解抗mGREM1抗體對小鼠CRPC強效抑制作用之機制，我們對IgG2a或抗mGREM1抗體治療小鼠之前列腺樣品進行了RNA定序。KEGG及GESA分析證明抗mGREM1抗體治療組中FGFR及MAPK信號傳導係變化最顯著的信號傳導通路(圖10G、圖10H)。進一步之免疫染色及免疫墨點實驗證實投與抗mGREM1抗體可以導致FGFR1、MEK及ERK磷酸化水準顯著降低(圖10I、圖10J)。此等結果共同表明藉由抑制FGFR1/MAPK信號傳導通路，抗mGREM1抗體抑制*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠中CRPC之發展。

【0356】

實施例7：靶向GREM1之抗體在人PCa細胞株中具有很強的抗腫瘤作用。

測試14E3以靶向人PCa中之GREM1。該抗體對hGREM1之親和力及特異性藉由ELISA驗證(圖12A)。抗人GREM1抗體14E3對LNCaP及PC3細胞之球形成、增殖及誘導之凋亡具有抑制作用。該抗體增強了恩雜魯胺對AR依賴性LNCaP細胞之抗腫瘤作用(圖12B、圖12C、圖10K、圖10L)。生化分析證明在PC3及LNCaP細胞兩者中，抗GREM1抗體治療對FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路呈劑量依賴性抑制作用(圖12D，圖10M)。

【0357】 為了研究BMP信號傳導是否參與了14E3之抗腫瘤作用，藉

由CRISP/Cas9敲除*BMPRII*，14E3對PCa細胞之抑制作用並沒有消失，這表明BMP信號傳導不依賴於抗GREM1抗體之作用(圖17A、圖17B及圖17C)。

【0358】 為了測試14E3在體內對CRPC之作用，攜帶CRPC細胞株PC3異源移植體之裸小鼠腹腔內注射抗GREM1抗體或IgG2a，每週三次，持續2週(10 mg/kg體重)。14E3極大地抑制了PC3異源移植瘤之生長。在繼發性腫瘤傳代過程中，14E3對腫瘤之抑制作用更加明顯(圖12E、圖12F)。

【0359】 研究了14E3在具有去勢的PC3 CRPC模型中之腫瘤生長抑制活性。簡要地，將PC3細胞皮下移植入Balb/c裸小鼠中，每隻1×10^6個細胞，然後對小鼠進行去勢手術以製成CRPC (去勢抵抗性前列腺癌)模型。當腫瘤體積生長到100 mm^3 (第20天)時，採用同種型對照小鼠IgG2a或14E3雜交瘤抗體(mIgG2a)治療小鼠。每組8隻小鼠，以10 mg/kg腹腔內(i.p.)注射抗體，每週兩次。每週用卡尺(INSIZE)自兩個維度量測兩次腫瘤體積。圖13表明Gremlin抗體14E3降低了PC3腫瘤之生長並且延長荷瘤小鼠之生存期。

【0360】

實施例8：抗Gremlin1抗體在LNCaP PCa細胞中具有很強的抗腫瘤作用。

測試14E3以靶向LNCaP PCa細胞中之GREM1。圖14顯示14E3對AR依賴性LNCaP細胞之球形成及增殖具有抑制作用，並且增強恩雜魯胺之抗腫瘤作用(圖14A、B)。生化分析表明在LNCaP細胞中，14E3治療對FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路具有劑量依賴性的抑制作用(圖14C)。圖

14D及圖10N顯示抗GREM1抗體(如14E3或抗mGREM1抗體)及恩雜魯胺之聯合療法對CRPC腫瘤抑制之協同作用。此等資料表明靶向GREM1之抗體可以作為一種有前景的治療人CRPC患者之方法。

【0361】

實施例9：14E3抑制GREM1介導之腫瘤細胞遷移。

收穫處於對數生長期之PC-3細胞，並將其重新懸浮在細胞培養基(含10% FBS之DMEM培養基)中。細胞未經處理，或用1 μg/ml Gremlin、10 μg/ml 14E3及10 μg/ml對照mIgG2a處理細胞3天。然後，將細胞以10^5個細胞/孔植入6孔細胞培養盤中。在細胞覆蓋孔底100%後，將培養基改為無血清培養基。用200 μl吸頭一次劃傷每個孔。藉由Image J軟體計算劃痕上生長之細胞面積，分析細胞之遷移率。

【0362】 如圖15所示，添加GREM1加速前列腺癌細胞之細胞遷移，並且14E3降低了這種加速，亦即抑制了GREM1介導之腫瘤細胞遷移。

【0363】

實施例10：在LNCaP及PC3懸浮培養中14E3抑制了GREM1誘導之EMT/幹細胞之形成。

為了評估gremlin1在調節腫瘤前列腺細胞生長中之作用，我們在一項涉及前列腺癌細胞LNCaP之測定中測試了本文提供之抗體。採用PSA啟動子驅動之GFP表現慢病毒質體轉染該細胞株。PSA被認為係前列腺細胞之分化標誌物，且PSA水準低之前列腺癌細胞代表分化差或未分化的前列腺癌細胞。此等細胞通常具有類似幹細胞之特性，並且具有更強的生長特性。LNCaP報告蛋白細胞測定簡述如下。

【0364】 LNCaP-PSA細胞以10000/孔植入至24孔盤中，RPMI 1640/10% FBS (GIBCO)、1% P/S (完全培養基)，37℃及5% CO_2孵育過夜。次日，移除培養基，將1 ug/ml之人gremlin (ACRO)或含有連續稀釋之抗體之人gremlin添加至細胞中。每三天更換一次培養基。在第7天自孔中移除培養基，用PBS洗滌兩次，使用FITC通道運行流式細胞儀(Bechman)。如圖16A所示，在對照孔(空白)低PSA的LNCaP群體之百分比為6%左右，並且百分比隨著添加GREM1以劑量依賴之方式增加，這表明GREM1促進前列腺癌細胞之侵入性。如圖16B所示，本文提供之雜交瘤抗體14E3以劑量依賴之方式中和gremlin介導之低PSA LNCAP群體之增加，這表明14E3能夠逆轉GREM1促進之侵入性。

【0365】 圖16C顯示用非BMP結合環區替代BMP結合環區並不影響GREM1介導之前列腺癌細胞(LNCaP)中$PSA^{-/lo}$細胞群體之百分比的增加。這表明GREM1促進癌細胞之侵入性係不依賴於GREM1上之BMP結合環區的。

【0366】

實施例11：抗GREM1抗體抑制源自人CRPC患者之類器官之生長的作用

然後，我們測試抗GREM1抗體是否對來自於患者之類器官(PDO)顯示抑制作用。PDO取自仁濟醫院PCa患者。簡要地，來自於九名CRPC患者之腫瘤組織藉由手術收穫，並且被切成1-5 mm^3，用HBSS洗滌一次，然後，該組織藉由使用膠原酶II+ 10 μM Y-27632在37℃下被消化成單細胞懸液且持續4小時，接下來，使用基礎培養基中和消化。之後，用1 ml TrypLE+10 μM Y-27632在37℃下進一步消化15分鐘，然後用含10%胎牛血清之培養基中和。將得到的細胞重懸在50%基質膠+50%培養基中，並

將50 ul之細胞懸液分散至96孔盤之每孔中。然後，在培養基中加入預溫的PDO培養基(B27、N乙醯半胱胺酸、EGF、Noggin、R-sponsdin 1、A83-1、FGF10、FGF2、前列腺素E2、菸醯胺、SB202190、DHT及Y27632)，並且每2-3天加入新鮮培養基。圖18A、圖18B、圖18C及圖18D顯示14E3以不同程度降低了這9個PDO中之7個類器官之生長，表明了14E3介導之腫瘤生長抑制的潛在機制，並指出了基於gremlin之抑制作用的治療潛力。

【0367】

實施例12：討論

隨著用於PCa之第二代ADT藥物之廣泛應用，AR非依賴性之CRPC數目顯著地增加。在本研究中，我們發現與未使用激素的或新診斷的PCa相比，CRPC中GREM1之表現異常升高。GREM1促進前列腺癌之進展及對雄激素剝奪之耐受。此等作用係藉由直接的GREM1-FGFR結合以活化FGFR/MAPK信號傳導通路來實現的。在GEMM鼠PCa模型、人PCa細胞株、患者來源之類器官及異種移植體中，GREM1阻斷抗體可以有效抑制PCa之去勢抵抗性之生長。此等結果共同強烈支持了GREM1/FGFR1/MAPK信號傳導軸促進PCa之進展，並指出Gremlin為一個重要且有前景的治療靶標。

【0368】 第二代抗雄激素藥物已被證明觸發AR非依賴性CRPC之關鍵驅動因子上調。然而，AR信號傳導調節此等驅動因子之機制仍不完全清楚。我們發現在CRPC患者樣品中，*GREM1*與AR信號傳導通路呈負相關。AR活化或過表現導致了PCa細胞中*GREM1*表現之強烈下降。相反，當AR被恩雜魯胺敲除或抑制時，*GREM1*轉錄顯著地增加。CHIP及螢光

素酶報告蛋白測定資料共同支持GREM1之抑制係藉由在*GREM1*啟動子區域結合AR用於轉錄抑制來實現。此等結果表明*GREM1*之基因表現作為CRPC之一個強有力的驅動因子，在轉錄上受到AR之抑制。PCa去勢抵抗性之發生機制可歸納為兩大類：1)藉由AR擴增、突變或替代剪接重新活化AR信號傳導通路或糖皮質激素受體(GR)之上調；2)活化諸如FGF、PRC1、BCL2等替代信號傳導通路，促進AR非依賴性腫瘤生長及細胞死亡逃逸。我們發現，在GREM1過表現之前列腺癌細胞株中，FGFR/MAPK信號傳導通路被異常活化。鑒於最近發現FGF信號活化為AR非依賴性CRPC的一個重要分子特徵，並且為CRPC之AR非依賴性生長所必需的，這一點尤為相關。FGF-FGFR1信號軸在前列腺癌之骨轉移中之作用亦已有報導。在本研究中，我們發現GREM1以濃度依賴之方式引起FGFR1磷酸化及活化。Gremlin誘導之FGFR1磷酸化比FGF1刺激更持久。此外，根據SU2C PCa群組之定序資料，*GREM1*在CRPC中之RNA轉錄豐度高於其他FGF。因此，我們認為GREM1至少係導致CRPC中FGFR1/MAPK信號異常活化之主要原因之一。重要的是，藉由使用免疫共染色、雙FC、fortebio、co-IP、下拉及電腦模擬方法，我們提供了令人信服的證據，證明GREM1可以直接與FGFR1結合。因此，GREM1誘導的FGFR1之活化為配體-受體直接結合之結果。在PCa中，GREM1用作FGFR1之新配體。

【0369】 以前GREM1被認為係BMP之典型拮抗劑。已報導根據自條件性敲除小鼠模型上之觀察，BMP信號傳導通路及下游靶標基因顯著地影響PCa之進展及轉移。然而，我們發現BMP4對FGFR/MAPK之活化及GREM1對PCa之腫瘤促進作用沒有顯著影響。此外，GREM1阻斷抗體

對PCa細胞之抑制作用不能被*BMPRII*敲除所覆蓋。然而，FGFR1之敲除可以徹底消除GREM1對PCa之積極作用。總體而言，FGFR/MAPK之活化及GREM1之CPRC促進的作用係不依賴於BMP信號傳導通路的。我們目前的工作確定了GREM1的一個全新功能，並且在FGFR配體中添加了一個新成員。更廣泛地說，FGFR信號通路在膀胱癌、胃癌、肺癌及乳癌等其他腫瘤中亦為關鍵的致癌驅動因子。需要進一步的研究來瞭解GREM1/FGFR/MAPK軸是否參與了其他類型癌症之腫瘤發生及進展。

【0370】 我們發現，藉由免疫染色在GEMM及人PCa樣品中腫瘤上皮細胞都表現GREM1。與此相一致，其他獨立實驗室報導了腫瘤細胞或腫瘤幹細胞在結腸癌及神經膠質瘤中高表現GREM1。然而，Julie B. Sneddon等人分析了774例不同腫瘤病例中*GREM1* RNA之表現，發現結腸癌、肺癌、胰臟癌及乳癌中超過50%之腫瘤基質細胞均為GREM1陽性。Michael Quante等人表示在胃癌模型中腫瘤相關纖維母細胞(CAF)中Gremlin顯著地增加。GREM1對CRPC之促進作用可能不僅藉由自分泌之方式作用於腫瘤細胞，還可能藉由調節腫瘤微環境為PCa細胞在惡劣條件(例如，雄激素剝奪)下之生長及逃逸細胞死亡創造一個適宜的生態位。

【0371】 分泌蛋白為一類重要的藥物靶標。在本研究中，我們開發了一種抗GREM1之單株抗體。基於人PCa細胞株、PDO及PDX之實驗以及*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$鼠PCa模型之體內研究，我們證明了抗GREM1抗體具有顯著的抗腫瘤作用。抗GREM1抗體展示出了與ADT對PCa有較強的協同作用。但是，我們不得不考慮到GREM1在其他組織中亦有表現。研究已表明小鼠*GREM1*之習知敲除導致腸道發育異常及造血系統紊亂。在我們的研究中，我們仔細檢查了抗GREM1抗體治療後小鼠

之主要器官，包含腸道。以劑量10 mg/kg腹腔內注射，每週三次，我們未觀察到明顯的毒性作用，而且對主要器官及外周血細胞計數亦無明顯損害。此等觀察結果表明適當的給藥窗口可以避免不必要的副作用。

【0372】 經FDA批准之用於癌症療法之24種抗體藥物中，大多數靶向造血惡性腫瘤中之免疫檢查點蛋白或細胞表面蛋白，少數其他藥物阻斷HER2、EGFR、VEGF或VEGFR以治療少數實體瘤。包括PCa在內的「冷腫瘤」，具有低$CD8^+$細胞毒性T細胞浸潤，對免疫檢查點療法反應差。因此，確認新的抗體藥物治療「冷腫瘤」之新靶標具有重要的臨床意義。我們發現，GREM1/FGFR1/MAPK軸為CRPC之關鍵驅動因子，這不僅為理解去勢抵抗性發展之分子機制提供了見解，而且亦證明了GREM1作為一種新的藥物靶標之直接治療相關性。抗GREM1單株抗體對CRPC之治療具有很大的治療前景。

【0373】

實施例13：14E3可有效減少肺內PCa轉移之形成

為了評估gremlin1抗體對肺內前列腺癌轉移之影響，用組成型表現螢光素酶之質體轉染PC3細胞(ATCC)。自生長之對數階段收集PC3-luc細胞，並與1×10^6細胞懸浮於80ml鹼性培養基(DMEM)中。隨後將細胞懸液心內注射至BALB/C裸鼠心室(上海SLAC實驗動物)。以10mg/kg劑量腹腔注射Gremlin1雜交瘤抗體14E3或同型對照，每週2次，持續3週。每兩天量測一次體重。麻醉小鼠並投與以15mg/kg劑量之D-螢光素(賽默飛世爾(ThermoFisher)，L2916)，持續5min。使用體內成像系統(Caliper IVIS生物發光系統，Caliper LifeScience，美國)採集圖像。如圖19A、圖19B及圖19C之成像所示，14E3對平均輻射強度有明顯抑制作用，但不影響體

重，表明抗Gremlin1之抗體(例如14E3)能顯著降低心內注射之小鼠模型中PCa之轉移。根據圖19D及圖19E中微轉移之統計資訊，14E3可有效減少肺內PCa轉移之形成。

表5. 本申請中提及或使用之序列

SEQ ID NO	序列	註解
1	TYGMA	14E3/Hu14E3-Ha/Hu14E3-Hb/Hu14E3-Hc HCDR1
2	WINTLSGEPTYADDFKG	14E3/Hu14E3-Ha/Hu14E3-Hb/Hu14E3-Hc HCDR2
3	EPMDY	14E3/Hu14E3-Ha/Hu14E3-Hb/Hu14E3-Hc HCDR3
4	KSSQSLLDSDGKTYLS	14E3/Hu14E3-La/Hu14E3-Lb LCDR1
5	LVSKLDS	14E3/Hu14E3-La/Hu14E3-Lb LCDR2
6	WQGAHFPLT	14E3/Hu14E3-La/Hu14E3-Lb LCDR3
7	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGSTFTTYGMAWMKQAPGKGLTWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLKTSANTAYLQINNLKNEDAATYFCAREPMDYWGQGTSVIVSS	14E3 VH
8	DVVMTQTPLTLSITIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLLQRPDQSPKRLISLVSKLDSGVPDRITGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCWQGAHFPLTFGAGTKLELK	14E3 VL
9	CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGACTTCTGGATCTACGTTCACAACCTATGGAATGGCCTGGATGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAACGTGGATGGGCTGGATAAACACCCTCTCTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGAAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACGCGGCTACATATTTCTGTGCACGAGAACCAATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCCTCA	14E3 VHnu
10	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGATTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAATCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAGTTGGTTGTTACAGAGGCCAGACCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTGGTGTCCAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGA	14E3 VLnu

	TCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACAC TGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATTTG GGCATCTATTATTGCTGGCAAGGTGCACATTTTC CGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAG CTGAAA	
11	DYYMN	22F1/Hu22F1-Ha/Hu22F1-Hb/Hu22F1-Hc/Hu22F1-Hd HCDR1
12	DINPKDGDSGYSHKFKG	22F1/Hu22F1-Ha/Hu22F1-Hb/Hu22F1-Hc/Hu22F1-Hd HCDR2
13	GFTTVVARGDY	22F1/Hu22F1-Ha/Hu22F1-Hb/Hu22F1-Hc/Hu22F1-Hd HCDR3
14	KSSQSLLDSDGKTYLN	22F1/Hu22F1-La/Hu22F1-Lb LCDR1
15	LVSKLDS	22F1/Hu22F1-La/Hu22F1-Lb LCDR2
16	WQGTHFPYT	22F1/Hu22F1-La/Hu22F1-Lb LCDR3
17	EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYYM NWLKQSHGKSLEWIGDINPKDGDSGYSHKFKGK ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCASGFTT VVARGDYWGQGTTLTVSS	22F1 VH
18	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGFPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFG GGTKLEIK	22F1 VL
19	GAGGCCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACT GGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTG TAAGGCTTCTGGATACTCGTTCACTGACTACTAC ATGAACTGGCTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAG CCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAAAGAT GGTGATAGTGGTTACAGCCATAAGTTCAAGGGC AAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGC ACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCT GAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGCGGA TTTACCACGGTAGTAGCTAGGGGGGACTACTGG GGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	22F1 VHnu
20	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTG TCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTT GCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG GAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGC CAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATTTGG TGTCTAAACTGGACTCTGGATTCCCTGACAGGT TCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACAC TGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTG GGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTC CGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAA	22F1 VLnu

21	DDYMH	69H5 HCDR1
22	WIDPENGDTEYASKFQG	69H5 HCDR2
23	WATVPDFDY	69H5 HCDR3
24	KSSQSLLNRSNQKNYLA	69H5 LCDR1
25	FTSTRES	69H5 LCDR2
26	QQHYSTPFT	69H5 LCDR3
27	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYM HWVKRRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGK ATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTTWATVP DFDYWGQGTTLTVSS	69H5 VH
28	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNRSN QKNYLAWYQQKPGQSPKLLVHFTSTRESGVPDRF IGSGSGTDFTLTISNLQAEDLADYFCQQHYSTPFT FGSGTKLEIK	69H5 VL
29	GAGGTGCAGCTGCAACAGTCCGGCGCTGAACT GGTGAGGCCTGGAGCCTCCGTGAAGCTGTCCTG CACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACGACTA CATGCACTGGGTGAAGAGGAGGCCTGAGCAGG GCCTGGAGTGGATCGGCTGGATCGACCCCGAGA ACGGCGACACCGAGTACGCCTCCAAGTTCCAG GGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCCTCC AACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCTCCCTGACC TCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCACCACC TGGGCCACCGTGCCCGACTTCGACTACTGGGGA CAGGGCACCACCCTGACCGTGTCCAGC	69H5 VHnu
30	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCTCTCTGG CTATGTCAGTGGGACAGAAAGTGACCATGTCTT GCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGAACAGGTCCA ACCAGAAGAACTACCTGGCTTGGTACCAGCAG AAACCAGGACAGTCTCCTAAGCTGCTGGTGCAT TTTACCTCTACCAGGGAATCCGGAGTGCCAGAT AGATTTATCGGCTCTGGCTCCGGCACAGATTTTA CACTGACCATCTCCAATCTGCAGGCAGAAGATC TGGCTGACTACTTTTGCCAGCAGCACTACTCCA CCCCTTTTACCTTTGGCTCCGGCACCAAGCTGG AGATCAAG	69H5 VLnu
31	DFYMN	56C11 HCDR1
32	DINPNNGGTSYNQKFKG	56C11 HCDR2
33	DPIYYDYDEVAY	56C11 HCDR3
34	RSSQSLVHSNGNTYLH	56C11 LCDR1
35	KVSNRFS	56C11 LCDR2
36	SQSTHVPLT	56C11 LCDR3
37	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDFYM NWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFKGK ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDPIY YDYDEVAYWGQGTLVTVSA	56C11 VH
38	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGN TYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFG	56C11 VL

	AGTKLELK	
39	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGAGCT GGTGAAGCCTGGAGCCTCCGTGAAGATCTCCTG TAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTTCTA CATGAACTGGGTGAAGCAGTCCCACGGCAAGT CCCTGGAGTGGATCGGCGACATCAATCCCAACA ACGGCGGCACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAG GGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGTCCTC CAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGGTCCCTGAC CTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGACCCCATCTACTACGACTACGACGAGGTGGC CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACAGTGT CCGCC	56C11 VHnu
40	GATGTGGTGATGACACAGACACCTCTGTCTCTG CCAGTGTCTCTCGGAGATCAGGCTTCTATCTCTT GCAGATCCTCTCAGTCTCTGGTGCATTCCAACG GAAACACCTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAAC CAGGACAGTCTCCTAAGCTGCTGATCTACAAGG TGTCCAACAGGTTCTCCGGAGTGCCAGATAGAT TTTCCGGATCTGGATCTGGCACCGATTTTACCCT GAAGATCTCTAGAGTGGAAGCAGAGGATCTGG GAGTGTACTTTTGTAGCCAGTCTACCCACGTGC CTCTGACATTTGGAGCAGGAACAAAGCTGGAG CTGAAG	56C11 VLnu
41	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYG MAWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFK GRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREP MDYWGQGTMVTVSS	Hu14E3-Ha VH
42	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGAGCT GAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCACCTACG GCATGGCCTGGATGAGGCAGGCTCCTGGCCAGG GACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCCTGT CCGGCGAACCCACCTACGCCGACGACTTCAAG GGCAGGTTCGTGTTCTCCCTGGACACCAGCGTG TCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGAGCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAT GGTGACCGTGTCCTCC	Hu14E3-Ha VHnu
43	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGM AWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFKG RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREPM DYWGQGTMVTVSS	Hu14E3-Hb VH
44	CAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCT GAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACG GCATGGCCTGGATGAGGCAGGCTCCTGGACAG GGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCCTG TCCGGCGAGCCTACCTACGCCGACGACTTCAAG GGCAGGTTCGCCTTCTCCCTGGACACCTCCGTG	Hu14E3-Hb VHnu

	AGCACCGCCTACCTGCAGATCTCCAGCCTGAAG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGAGCCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAT GGTGACCGTGTCCAGC	
45	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGSTFTTYGM AWMKQAPGQGLTWMGWINTLSGEPTYADDFKG RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREPM DYWGQGTMVTVSS	Hu14E3-Hc VH
46	CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCAGCGAGCTC AAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGAAGGTGTCCTG CAAGGCCAGCGGCTCCACCTTCACCACATACGG CATGGCCTGGATGAAGCAGGCTCCTGGCCAGGG CCTGACCTGGATGGGATGGATCAACACCCTGTC CGGCGAGCCTACCTACGCCGATGACTTCAAGGG CAGGTTCGCCTTCTCCCTGGACACCTCCGTGTC CACCGCTTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGG AGCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCATGG TGACCGTGTCCTCC	Hu14E3-Hc VHnu
47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLSWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGAHFPLTFG QGTKLEIK	Hu14E3-La VL
48	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTATCTGTCTTGGCTGCAGCAGAGA CCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTACCTG GTGTCCAAGCTGGATTCTGGAGTGCCAGATAGA TTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGATTTCACC CTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGT GGGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAGCTCACTT CCCTCTGACATTTGGACAGGGAACAAAGCTGG AGATCAAG	Hu14E3-La VLnu
49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLSWLQQRPGQSPRRLISLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGAHFPLTFG QGTKLEIK	Hu14E3-Lb VL
50	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTATCTGTCTTGGCTGCAGCAGAGA CCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTCCCTG GTGTCTAAGCTGGATTCCGGAGTGCCAGATAGA TTTTCCGGATCTGGATCTGGCACCGATTTTACCC TGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGTG GGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAGCTCACTTC CCTCTGACATTTGGACAGGGAACAAAGCTGGA GATCAAG	Hu14E3-Lb VLnu
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGDSGYSHKFK	Hu22F1-Ha VH

	GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASG FTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	
52	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCTT GTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGATTACTA CATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGTCAAG GTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACCCCAAG GACGGCGACTCCGGCTATTCCCACAAGTTCAAG GGTCGTGTGACCATGACCAGGGACACGTCCACC AGCACCGTGTACATGGAGCTGTCCTCTTTAAGG TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGC GGATTCACCACCGTGGTGGCTAGGGGCGACTAT TGGGGCCAAGGTACCACCGTGACAGTGTCCAG C	Hu22F1-Ha VHnu
53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGDSGYSHKFK GRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASG FTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hb VH
54	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCTT GTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGATTACTA CATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGTCAAG GTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACCCCAAG GACGGCGACTCCGGCTATTCCCACAAGTTCAAG GGTCGTGTGACCATGACCGTGGACAAGTCCACC AGCACCGTGTACATGGAGCTGTCCTCTTTAAGG TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGC GGATTCACCACCGTGGTGGCTAGGGGCGACTAT TGGGGCCAAGGTACCACCGTGACAGTGTCCAG C	Hu22F1-Hb VHnu
55	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGDSGYSHKFK GRVTLTVDKSTSTVYMELRSLRSEDTAVYYCASG FTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hc VH
56	CAAGCTCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGT GAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTT GTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGACTACT ACATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGTCAA GGTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACCCCAA GGACGGCGACAGCGGCTACTCCCACAAGTTCA AGGGTCGTGTGACTTTAACCGTGGACAAGTCCA CCTCCACCGTCTACATGGAGCTGAGGTCTTTAA GGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCTA GCGGCTTCACCACCGTGGTGGCTCGTGGCGATT ACTGGGGACAAGGTACCACCGTGACCGTGTCCT CC	Hu22F1-Hc VHnu
57	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWLRQAPGQGLEWIGDINPKDGDSGYSHKFKG RATLTVDKSTSTVYMELRSLRSEDTAVYYCASGF TTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hd VH
58	CAAGCTCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT	Hu22F1-Hd VHnu

	GAAAAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTTACCGACTACT ACATGAACTGGCTGAGGCAAGCTCCCGGTCAA GGTCTGGAGTGGATCGGCGATATCAACCCCAAG GACGGCGACTCCGGCTACAGCCATAAGTTCAAG GGTCGTGCCACTTTAACCGTGGACAAGTCCACC AGCACCGTGTACATGGAGCTGAGGTCTTTAAGG TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCC GGCTTCACCACAGTGGTGGCTCGTGGCGACTAT TGGGGCCAAGGTACCACCGTGACCGTGAGCTC C	
59	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTF GGGTKVEIK	Hu22F1-La VL
60	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTACCTGAATTGGCTGCAGCAGAG ACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTACCT GGTGTCCAAGCTGGATTCTGGAGTGCCAGATAG ATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGATTTCACC CTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGT GGGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAACCCACTT CCCTTACACATTTGGAGGAGGCACAAAGGTGG AGATCAAG	Hu22F1-La VLnu
61	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGFPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFG GGTKVEIK	Hu22F1-Lb VL
62	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTACCTGAATTGGCTGCAGCAGAG ACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTACCT GGTGTCCAAGCTGGATTCTGGATTCCCAGATAG ATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGATTTCACC CTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGT GGGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAACCCACTT CCCTTACACATTTGGAGGAGGCACAAAGGTGG AGATCAAG	Hu22F1-Lb VLnu
63	NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSF	BMP-結合環區
64	FSYSVPNTFPQSTESLVHCDS	DAN第63-83號胺基酸
65	MGWSCIILFLVATGVHS	信號肽
66	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAIP PPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTA MPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLK QTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEG SFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPELQPPTKKKRV TRVKQCRCISIDLD	人gremlin 1

67	MNRTAYTVGALLLLLGTLLPTAEGKKKGSQGAIP PPDKAQHNDSEQTQSPPQPGSRTRGRGQGRGTA MPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLK QTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEG SFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPELQPPTKKKRV TRVKQCRCISIDLD	小鼠gremlin 1
68	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAIP PPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTA MPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLK QTIHEEGCNSRTIINRFCYGQC FSYSVPNTFPQSTESLVHCDSCKPKKFTTMMVTL NCPELQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD	嵌合hGREM1
69	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNR GRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFY IPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPEL QPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD	不含信號肽之人Gremlin 1序列
70	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPPQPGSRTR GRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFY IPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPEL QPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD	不含信號肽之人鼠Gremlin 1序列
71	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEG	人Gremlin 1信號肽
72	MNRTAYTVGALLLLLGTLLPTAEG	小鼠Gremlin 1信號肽
73	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPL PSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSS SVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPG TRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHE RCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRH SVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVC ACPGRDRRTEEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGR ERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPG GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD	p53蛋白
74	MTAIIKEIVS RNKRRYQEDG FDLDLTYIYP NIIAMGFPAE RLEGVYRNNI DDVVRFLDSK HKNHYKIYNL CAERHYDTAK NCRVAQYPF EDHNPPQLEL IKPFCEDLDQ WLSEDDNHVA AIHCKAGKGR TGVMICAYLL RGKFLKAQE ALDFYGEVRT RDKKGVTIPS RRYVYYYSY LLKNHLDYRP VALLFHKMMF ETIPMFSGGT CNPQFVVCQL KVKIYSSNSG PTRREDKFMY FEFPQPLPVC GDIKVEFFHK NKMLKKDKM FHFWVNTFFI PGPEETSEKV ENGSLCDQEI DSICSIERAD NDKEYLVLTL TKNDLDKANK DKANRYFSPN FKVKLYFTKT VEEPSNPEAS SSTSVTPDVS DNEPDHYRYS DTTDSDPENE	PTEN蛋白亞型1

	PFDEDQHTQI TKV	
75	SWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGA PVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDG VQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSS PSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKE TDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKT VKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYK VRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHT YQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFM CKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQIL KTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAG NSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIY CTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHSQMAV HKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSR LSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGK PLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKM LKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLG ACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEY CYNPSHNPEEQLSSKDLVSCAYQVARGMEYLASK KCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHHI DYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDV WSFGVLLWEIFTLGGSPYPGVPVEELFKLLKEGH RMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQ LVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPDTR SSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGL KRR	人FGFR1

【序列表】

<110> 上海交通大學(SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY)
中國大陸商蘇州創勝醫藥集團有限公司(SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD.)

<120> 使用GREM1拮抗劑治療疾病的方法

<130> 063694-8007WO03

<150> PCT/CN2021/080142
<151> 2021-03-11

<150> PCT/CN2022/076516
<151> 2022-02-16

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 1

Thr Tyr Gly Met Ala
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Leu Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 3

Glu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 5

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 6

Trp Gln Gly Ala His Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 7

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Ser Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Gly Met Ala Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Thr Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Leu Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Lys Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 8

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Arg Pro Asp Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Ala His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 9
cagatccagt tggtacagtc tggacctgaa ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaaga cttctggatc tacgttcaca acctatggaa tggcctggat gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaacgtg gatgggctgg ataaacaccc tctctggaga gccaacatat 180

gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttgaaaa cctctgccaa cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac gcggctacat atttctgtgc acgagaacca 300

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc atcgtctcct ca 342

<210> 10
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 10
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgca aatcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgagttgg 120

ttgttacaga ggccagacca gtctccaaag cgcctaatct ctctggtgtc caaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggat cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgaaga tttgggcatc tattattgct ggcaaggtgc acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 11

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 12

Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 13

Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 15

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 16

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 17

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 18

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 19
gaggcccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata ctcgttcact gactactaca tgaactggct gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aagatggtga tagtggttac 180

agccataagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagcggattt 300

accacggtag tagctagggg ggactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 20
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 20
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atttggtgtc taaactggac 180

tctggattcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 21

Asp Asp Tyr Met His
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 22

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 23

Trp Ala Thr Val Pro Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 24

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 25

Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 26

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 27

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Trp Ala Thr Val Pro Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 28

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Val His Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Asn Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 29
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 29
gaggtgcagc tgcaacagtc cggcgctgaa ctggtgaggc ctggagcctc cgtgaagctg 60

tcctgcaccg ccagcggctt caacatcaag gacgactaca tgcactgggt gaagaggagg 120

cctgagcagg gcctggagtg gatcggctgg atcgaccccg agaacggcga caccgagtac 180

gcctccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca cctcctccaa caccgcctac 240

ctgcagctga gctccctgac ctccgaggac accgccgtgt actattgcac cacctgggcc 300

accgtgcccg acttcgacta ctggggacag ggcaccaccc tgaccgtgtc cagc 354

<210> 30
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 30
gatatcgtga tgacccagtc tccttcctct ctggctatgt cagtgggaca gaaagtgacc 60

atgtcttgca agtcctctca gtctctgctg aacaggtcca accagaagaa ctacctggct 120

tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aagctgctgg tgcattttac ctctaccagg 180

gaatccggag tgccagatag atttatcggc tctggctccg gcacagattt tacactgacc 240

atctccaatc tgcaggcaga agatctggct gactactttt gccagcagca ctactccacc 300

ccttttacct ttggctccgg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 31

Asp Phe Tyr Met Asn
1 5

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 32

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 33

Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 34

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 35

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 36

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 37
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 37

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 38

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 39
gaggtgcagc tgcagcagtc cggccctgag ctggtgaagc ctggagcctc cgtgaagatc 60

tcctgtaagg cctccggcta caccttcacc gacttctaca tgaactgggt gaagcagtcc 120

cacggcaagt ccctggagtg gatcggcgac atcaatccca acaacggcgg cacctcctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg acagtggaca agtcctccag caccgcctac 240

atggagctga ggtccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcgc cagggacccc 300

atctactacg actacgacga ggtggcctac tggggccagg gaaccctggt gacagtgtcc 360

gcc 363

<210> 40
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 40
gatgtggtga tgacacagac acctctgtct ctgccagtgt ctctcggaga tcaggcttct 60

atctcttgca gatcctctca gtctctggtg cattccaacg gaaacaccta cctgcattgg 120

tacctgcaga aaccaggaca gtctcctaag ctgctgatct acaaggtgtc caacaggttc 180

tccggagtgc cagatagatt ttccggatct ggatctggca ccgattttac cctgaagatc 240

tctagagtgg aagcagagga tctgggagtg tacttttgta gccagtctac ccacgtgcct 300

ctgacatttg gagcaggaac aaagctggag ctgaag 336

<210> 41
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 41

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

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

Gly Met Ala Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Leu Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 42
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 42
caggtgcagc tggtgcagtc cggctccgag ctgaagaagc ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc acctacggca tggcctggat gaggcaggct 120

cctggccagg gactggagtg gatgggctgg atcaacaccc tgtccggcga acccacctac 180

gccgacgact tcaagggcag gttcgtgttc tccctggaca ccagcgtgtc caccgcctac 240

ctgcagatct cctccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagccc 300

atggactact ggggccaggg caccatggtg accgtgtcct cc 342

<210> 43
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 43

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Gly Met Ala Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Leu Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 44
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 44
cagatccagc tggtgcagag cggcagcgag ctgaagaagc ccggcgctag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc acctacggca tggcctggat gaggcaggct 120

cctggacagg gcctggagtg gatgggctgg atcaacaccc tgtccggcga gcctacctac 180

gccgacgact tcaagggcag gttcgccttc tccctggaca cctccgtgag caccgcctac 240

ctgcagatct ccagcctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagcct 300

atggactact ggggccaggg caccatggtg accgtgtcca gc 342

<210> 45
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 45

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Gly Met Ala Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Thr Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Leu Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 46
<211> 342

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 46
cagatccagc tggtgcagtc cggcagcgag ctcaagaagc ccggagccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctc caccttcacc acatacggca tggcctggat gaagcaggct 120

cctggccagg gcctgacctg gatgggatgg atcaacaccc tgtccggcga gcctacctac 180

gccgatgact tcaagggcag gttcgccttc tccctggaca cctccgtgtc caccgcttac 240

ctgcagatct cctccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagccc 300

atggactact ggggccaggg caccatggtg accgtgtcct cc 342

<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 47

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Ala His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 48
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 48
gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60

atctcttgca agtcctctca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta tctgtcttgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctcctaga agactgatct acctggtgtc caagctggat 180

tctggagtgc cagatagatt ttccggctcc ggctctggca cagatttcac cctgaagatc 240

tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattgtt ggcagggagc tcacttccct 300

ctgacatttg gacagggaac aaagctggag atcaag 336

<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 49

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Ala His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 50
gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60

atctcttgca agtcctctca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta tctgtcttgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctcctaga agactgatct ccctggtgtc taagctggat 180

tccggagtgc cagatagatt ttccggatct ggatctggca ccgattttac cctgaagatc 240

tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattgtt ggcagggagc tcacttccct 300

ctgacatttg gacagggaac aaagctggag atcaag 336

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 51

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 52
caagttcagc tggtgcagtc cggagccgag gtgaagaagc ccggcgcttc cgtgaaggtg 60

tcttgtaagg cctccggcta ctccttcacc gattactaca tgaactgggt gaggcaagct 120

cccggtcaag gtctggagtg gatgggcgac atcaacccca aggacggcga ctccggctat 180

tcccacaagt tcaagggtcg tgtgaccatg accagggaca cgtccaccag caccgtgtac 240

atggagctgt cctctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagcggattc 300

accaccgtgg tggctagggg cgactattgg ggccaaggta ccaccgtgac agtgtccagc 360

<210> 53
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 53

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 54
caagttcagc tggtgcagtc cggagccgag gtgaagaagc ccggcgcttc cgtgaaggtg 60

tcttgtaagg cctccggcta ctccttcacc gattactaca tgaactgggt gaggcaagct 120

cccggtcaag gtctggagtg gatgggcgac atcaacccca aggacggcga ctccggctat 180

tcccacaagt tcaagggtcg tgtgaccatg accgtggaca agtccaccag caccgtgtac 240

atggagctgt cctctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagcggattc 300

accaccgtgg tggctagggg cgactattgg ggccaaggta ccaccgtgac agtgtccagc 360

<210> 55
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 55

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 56
caagctcagc tggtgcagtc cggcgctgag gtgaaaaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60

tcttgtaagg cctccggcta ctccttcacc gactactaca tgaactgggt gaggcaagct 120

cccggtcaag gtctggagtg gatgggcgac atcaacccca aggacggcga cagcggctac 180

tcccacaagt tcaagggtcg tgtgacttta accgtggaca agtccacctc caccgtctac 240

atggagctga ggtctttaag gtccgaggat accgccgtgt actactgcgc tagcggcttc 300

accaccgtgg tggctcgtgg cgattactgg ggacaaggta ccaccgtgac cgtgtcctcc 360

<210> 57
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 57

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 58
caagctcaac tggtgcagtc cggcgccgag gtgaaaaagc ccggtgcctc cgtgaaggtg 60

agctgcaagg cctccggcta ctcctttacc gactactaca tgaactggct gaggcaagct 120

cccggtcaag gtctggagtg gatcggcgat atcaacccca aggacggcga ctccggctac 180

agccataagt tcaagggtcg tgccacttta accgtggaca agtccaccag caccgtgtac 240

atggagctga ggtctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc ctccggcttc 300

accacagtgg tggctcgtgg cgactattgg ggccaaggta ccaccgtgac cgtgagctcc 360

<210> 59
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 59

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 60
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 60
gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60

atctcttgca agtcctctca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta cctgaattgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctcctaga agactgatct acctggtgtc caagctggat 180

tctggagtgc cagatagatt ttccggctcc ggctctggca cagatttcac cctgaagatc 240

tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattgtt ggcagggaac ccacttccct 300

tacacatttg gaggaggcac aaaggtggag atcaag 336

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 61

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 62
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 62
gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60

atctcttgca agtcctctca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta cctgaattgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctcctaga agactgatct acctggtgtc caagctggat 180

tctggattcc cagatagatt ttccggctcc ggctctggca cagatttcac cctgaagatc 240

tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattgtt ggcagggaac ccacttccct 300

tacacatttg gaggaggcac aaaggtggag atcaag 336

<210> 63
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 63

Asn Ser Phe Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe
1 5 10 15

Gln Ser Cys Ser Phe
20

<210> 64
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 64

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

Val His Cys Asp Ser
20

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 65

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Gly Val His
1 5 10 15

Ser

<210> 66
<211> 184
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 66

Met Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Thr Leu Leu Pro Ala Ala Glu Gly Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala
20 25 30

Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg
50 55 60

Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala
65 70 75 80

Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr
85 90 95

Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr
100 105 110

Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro
115 120 125

Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys
130 135 140

Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu
145 150 155 160

Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys
165 170 175

Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp
180

<210> 67
<211> 184
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Synhtetic

<400> 67

Met Asn Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Thr Leu Leu Pro Thr Ala Glu Gly Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala
20 25 30

Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln
35 40 45

Ser Pro Pro Gln Pro Gly Ser Arg Thr Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg
50 55 60

Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala
65 70 75 80

Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr
85 90 95

Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr
100 105 110

Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro
115 120 125

Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys
130 135 140

Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu
145 150 155 160

Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys
165 170 175

Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp
180

<210> 68
<211> 184
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 68

Met Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Thr Leu Leu Pro Ala Ala Glu Gly Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala
20 25 30

Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg
50 55 60

Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala
65 70 75 80

Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr
85 90 95

Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr
100 105 110

Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Phe Ser Tyr Ser Val Pro
115 120 125

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

Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu
145 150 155 160

Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys
165 170 175

Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp
180

<210> 69
<211> 160
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 69

Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln
1 5 10 15

His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg
20 25 30

Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu
35 40 45

Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr
50 55 60

Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His
65 70 75 80

Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly
85 90 95

Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly
100 105 110

Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met
115 120 125

Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys
130 135 140

Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp
145 150 155 160

<210> 70
<211> 160
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 70

Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln
1 5 10 15

His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln Ser Pro Pro Gln Pro Gly Ser Arg
20 25 30

Thr Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu
35 40 45

Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr
50 55 60

Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His
65 70 75 80

Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly
85 90 95

Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly
100 105 110

Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met
115 120 125

Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys
130 135 140

Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp
145 150 155 160

<210> 71
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 71

Met Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Thr Leu Leu Pro Ala Ala Glu Gly
20

<210> 72
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 72

Met Asn Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Thr Leu Leu Pro Thr Ala Glu Gly
20

<210> 73
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 73

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 74
<211> 399
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 74

```
Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1               5                  10                  15

Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
            20                  25                  30

Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
        35                  40                  45

Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His
    50                  55                  60

Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys
65                  70                  75                  80

Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln
                85                  90                  95

Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser
            100                 105                 110

Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly
        115                 120                 125

Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu Arg Gly Lys Phe Leu
    130                 135                 140

Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp
145                 150                 155                 160

Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser
                165                 170                 175

Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe
            180                 185                 190

His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys
        195                 200                 205
```

Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser
210 215 220

Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe
225 230 235 240

Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His
245 250 255

Lys Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val Asn
260 265 270

Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn
275 280 285

Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg
290 295 300

Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp
305 310 315 320

Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn
325 330 335

Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn
340 345 350

Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn
355 360 365

Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu
370 375 380

Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val
385 390 395

<210> 75
<211> 820
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

```
Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala Thr Leu
1               5                  10                  15

Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp
            20                  25                  30

Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly Asp Leu
        35                  40                  45

Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile Asn Trp
    50                  55                  60

Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg Ile Thr
65                  70                  75                  80

Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu
                85                  90                  95

Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe
            100                 105                 110

Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp
        115                 120                 125

Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro
    130                 135                 140

Asn Arg Met Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145                 150                 155                 160

Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
                165                 170                 175
```

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
195 200 205

Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
245 250 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu
260 265 270

Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
275 280 285

Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro
290 295 300

Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305 310 315 320

Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu
325 330 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
340 345 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr
355 360 365

Ser Pro Leu Tyr Leu Glu Ile Ile Ile Tyr Cys Thr Gly Ala Phe Leu

370 375 380

Ile Ser Cys Met Val Gly Ser Val Ile Val Tyr Lys Met Lys Ser Gly
385 390 395 400

Thr Lys Lys Ser Asp Phe His Ser Gln Met Ala Val His Lys Leu Ala
405 410 415

Lys Ser Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Asp Ser Ser
420 425 430

Ala Ser Met Asn Ser Gly Val Leu Leu Val Arg Pro Ser Arg Leu Ser
435 440 445

Ser Ser Gly Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro
450 455 460

Glu Asp Pro Arg Trp Glu Leu Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys
465 470 475 480

Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu Ala Ile
485 490 495

Gly Leu Asp Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala Val Lys
500 505 510

Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Ile Ser
515 520 525

Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn
530 535 540

Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu
545 550 555 560

Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala Arg Arg Pro
565 570 575

```
Pro Gly Leu Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro Glu Glu Gln
            580                 585                 590

Leu Ser Ser Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly
        595                 600                 605

Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
    610                 615                 620

Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe
625                 630                 635                 640

Gly Leu Ala Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr
                645                 650                 655

Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp
            660                 665                 670

Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu
        675                 680                 685

Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Pro Val
    690                 695                 700

Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro
705                 710                 715                 720

Ser Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His
                725                 730                 735

Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu
            740                 745                 750

Asp Arg Ile Val Ala Leu Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
        755                 760                 765

Met Pro Leu Asp Gln Tyr Ser Pro Ser Phe Pro Asp Thr Arg Ser Ser
```

770 775 780

Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His Glu Pro Leu Pro
785 790 795 800

Glu Glu Pro Cys Leu Pro Arg His Pro Ala Gln Leu Ala Asn Gly Gly
805 810 815

Leu Lys Arg Arg
820

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種在有需要之受試者中治療表現GREM1之癌症的方法，包括向上述受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中上述癌症之特徵在於減弱的雄激素受體(AR)信號傳導。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中上述癌症為表現AR之癌症或為AR陰性癌症。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中上述癌症為前列腺癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、睾丸癌、子宮內膜癌、卵巢癌及皮膚癌。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之方法，其中上述受試者正在接受或已經接受雄激素剝奪療法或耐雄激素剝奪療法。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之方法，其中上述癌症為轉移性的，視情況，上述癌症為轉移性前列腺癌，進一步視情況，上述癌症為前列腺癌肺轉移。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中上述癌症之特徵在於GREM1過表現。

【請求項7】

一種在受試者中提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法敏感性的方法，包括向上述受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【請求項8】

一種在有需要之受試者中治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症或在有需要之受試者中抑制FGFR1活化或在有需要之受試者中抑制MAPK信號傳導的方法，包括向上述受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中上述PTEN及/或p53缺乏之特徵在於不存在功能性PTEN及/或p53。

【請求項10】

如請求項9之方法，其中上述PTEN及/或p53缺乏之特徵在於在PTEN及/或p53中存在失活突變。

【請求項11】

如請求項8之方法，其中上述PTEN及/或p53缺乏之特徵在於不存在PTEN及/或p53表現。

【請求項12】

如請求項8至11中任一項之方法，其中上述GREM1相關疾病或病症之特徵在於GREM1表現或過表現。

【請求項13】

如請求項8至12中任一項之方法，其中上述GREM1相關疾病或病症選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。

【請求項14】

如請求項13之方法，其中上述GREM1相關疾病或病症為癌症。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中上述癌症為前列腺癌、乳癌、膠質瘤、脂質肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【請求項16】

如請求項1、3至5及14至15中任一項之方法，其中上述癌症為前列腺癌。

【請求項17】

如請求項16之方法，其中上述前列腺癌為：

a)雄激素受體(AR)表現為陰性，

b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，

c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，

d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者

e) a)至d)之任何組合。

【請求項18】

如請求項15之方法，其中上述癌症為乳癌。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中該乳癌為三陰性乳癌。

【請求項20】

如請求項13之方法，其中該纖維化疾病為肺纖維化、皮膚纖維化、糖尿病性腎病或缺血性腎損傷。

【請求項21】

如前述請求項中任一項之方法，其中上述GREM1拮抗劑降低GREM1水準或GREM1活性。

【請求項22】

如請求項21之方法，其中上述GREM1拮抗劑選擇性地降低癌細胞中而不是非癌細胞中之GREM1活性。

【請求項23】

如前述請求項中任一項之方法，其中上述GREM1拮抗劑包括抗GREM1抗體或其抗原結合片段、抑制性GREM1模擬肽、靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸、編碼上述抑制性核酸之多核苷酸、抑制gremlin及BMP之間相互作用之化合物、抑制上述GREM1活性之化合物。

【請求項24】

如請求項23之方法，其中上述靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸包括短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA或反義寡核苷酸。

【請求項25】

如請求項21至24中任一項之方法，其中上述GREM1拮抗劑包括GREM1-FGFR1軸抑制劑。

【請求項26】

如請求項25之方法，其中上述GREM1-FGFR1軸抑制劑抑制GREM1依賴性FGFR1信號傳導。

【請求項27】

如請求項25或26之方法，其中上述GREM1-FGFR1軸抑制劑阻斷

GREM1及FGFR1之間的結合。

【請求項28】

如請求項25至27中任一項之方法，其中上述GREM1-FGFR1軸抑制劑包括FGFR1結合抑制劑。

【請求項29】

如請求項28之方法，其中上述FGFR1結合抑制劑與FGFR1之胞外域2結合，並且視情況在包括殘基Glu 160之表位處與FGFR1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：75所示。

【請求項30】

如請求項25至27中任一項之方法，其中上述GREM1-FGFR1軸抑制劑在包括殘基Lys 123及/或殘基Lys 124之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示；或者阻斷FGFR1與hGREM1之殘基Lys 123及/或殘基Lys 124結合。

【請求項31】

如請求項23至30中任一項之方法，其中上述GREM1拮抗劑或GREM1-FGFR1軸抑制劑包括抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段。

【請求項32】

如請求項31之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段包括以下特徵中之至少一者：

a)能夠在癌細胞中而不是非癌細胞中選擇性地降低對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性；

b)在非癌細胞中表現出對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性不超過50%的降低；

c)能夠與包括SEQ ID NO：68所示胺基酸序列之嵌合hGREM1結合；

d)能夠與hGREM1結合，但不與小鼠gremlin1特異性結合；

e)在包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示，或與包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之hGREM1片段結合，視情況該hGREM1片段具有至少3 (例如，4、5、6、7、8、9或10)個胺基酸殘基之長度；

f) 能夠降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之活化；及/或

g)能夠根據Fortebio所量測的在不超過1 nM之KD處結合hGREM1。

【請求項33】

如請求項32之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段包括線性表位或構象表位。

【請求項34】

如請求項32或33之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中上述重鏈可變區包括：

a)重鏈互補決定區1 (HCDR 1)包括選自由SEQ ID NO：1、11、21及31組成之群的序列，

b)HCDR2包括選自由SEQ ID NO：2、12、22及32組成之群的序列，以及

c)HCDR3包括選自由SEQ ID NO：3、13、23及33組成之群的序列，及/或

其中上述輕鏈可變區包括：

d)輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包括選自由SEQ ID NO：4、14、24及34組成之群的序列，

e)LCDR2包括選自由SEQ ID NO：5、15、25及35組成之群的序列，以及

f) LCDR3包括選自由SEQ ID NO：6、16、26及36組成之群的序列。

【請求項35】

如請求項34之方法，其中上述重鏈可變區選自由以下組成之群：

e)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；

f) 重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；

g)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；以及

h)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3。

【請求項36】

如請求項34或35之方法，其中上述輕鏈可變區選自由以下組成之群：

e)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；

f) 輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；

g)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；以及

h)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【請求項37】

如請求項34至36中任一項之方法，其中：

e)上述重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；並且上述輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；

f) 上述重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；並且上述輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16

所示序列之LCDR3；

g)上述重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；並且上述輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；或者

h)上述重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3；並且上述輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【請求項38】

如請求項34至37中任一項之方法，其中上述重鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：45、SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57以及與其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【請求項39】

如請求項34至38中任一項之方法，其中上述輕鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：47、SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61以及與其具有至少80%之序列同一性且仍保留

對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【請求項40】

如請求項34至39中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段包括：

i) 包括SEQ ID NO：7所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：8所示序列之輕鏈可變區；或

j) 包括SEQ ID NO：17所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：18所示序列之輕鏈可變區；或

k)包括SEQ ID NO：27所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：28所示序列之輕鏈可變區；或

l) 包括SEQ ID NO：37所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：38所示序列之輕鏈可變區；或

m) 包括選自由SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43及SEQ ID NO：45組成之群的序列之重鏈可變區，及包括選自由SEQ ID NO：47及SEQ ID NO：49組成之群的序列之輕鏈可變區；或

n)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：41/47、41/49、43/47、43/49、45/47及45/49組成之群；或

o)重鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57組成之群的序列，以及輕鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61組成之群的序列；或

p)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：51/59、51/61、53/59、53/61、55/59、55/61、57/59及57/61組成之群。

【請求項41】

如請求項34至40中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段進一步包括一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留對GREM1之特異性結合特異性或親和力。

【請求項42】

如請求項41之方法，其中至少一個上述取代或修飾為在上述CDR序列中之一或多者及/或上述VH或VL序列之上述非CDR區中之一或多者。

【請求項43】

如請求項34至42中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段進一步包括免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或視情況人IgG之恆定區。

【請求項44】

如請求項43之方法，其中上述恆定區包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【請求項45】

如請求項32至44中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【請求項46】

如請求項32至45中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段為雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩定化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【請求項47】

如請求項32至46中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段為雙特異性的。

【請求項48】

如請求項32至47中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段能夠特異性結合gremlin之第一及第二表位或者能夠特異性結合hGREM1及第二抗原兩者。

【請求項49】

如請求項48之方法，其中上述第二抗原包括免疫相關靶標。

【請求項50】

如請求項49之方法，其中上述第二抗原包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16或CD83。

【請求項51】

如請求項49之方法，其中上述第二抗原包括腫瘤抗原。

【請求項52】

如請求項51之方法，其中上述腫瘤抗原包括腫瘤特異性抗原或腫瘤相關抗原。

【請求項53】

如請求項51之方法，其中上述腫瘤抗原包括前列腺特異性抗原

(PSA)、CA-125、神經節苷酯G(D2)、G(M2)及G(D3)、CD20、CD52、CD33、Ep-CAM、CEA、鈴蟾素樣肽類、HER2/neu、表皮生長因子受體(EGFR)、erbB2、erbB3/HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、癌相關黏蛋白、VEGF、VEGFR (例如VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)、雌激素受體、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受體、EGFα、c-Kit受體、轉鐵蛋白受體、密封蛋白18.2 (Claudin 18.2)、GPC-3、Nectin-4、ROR1、間皮素 、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pl5、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2或LIV-1。

【請求項54】

如請求項32至53中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段係不與鼠GREM1交叉反應的。

【請求項55】

如請求項32至53中任一項之方法，其中上述抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段係與小鼠GREM1交叉反應的。

【請求項56】

如前述請求項中任一項之方法，亦包括投與治療有效量之第二治療劑。

【請求項57】

如請求項56之方法，其中上述第二治療劑包括抗癌療法，視情況上述抗癌療法選自化療劑、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑(例如VEGFR (諸如VEGFR-1、VEGFR-2及VEGFR-3)之拮抗劑)、靶向治療劑、細胞治療劑、基因治療劑、激素治療劑、細胞介素、安寧療護、用於

治療癌症(例如腫瘤切除術)之手術、一或多種止吐藥、用於由化療引起之併發症之治療，或用於癌症患者之飲食補充劑(例如吲哚-3-甲醇)。

【請求項58】

如請求項57之方法，其中上述抗癌療法包括抗前列腺癌藥物，視情況雄激素剝奪療法。

【請求項59】

如請求項58之方法，其中上述抗前列腺癌藥物包括：雄激素軸抑制劑；雄激素合成抑制劑；PARP抑制劑；或其組合。

【請求項60】

如請求項59之方法，其中上述雄激素軸抑制劑選自由促黃體激素釋放激素(LHRH)促效劑、LHRH拮抗劑及雄激素受體拮抗劑組成之群。

【請求項61】

如請求項59之方法，其中上述雄激素軸抑制劑為地加瑞克、比卡魯胺、氟他胺、尼魯米特、阿帕魯胺、達洛魯胺、恩雜魯胺或阿比特龍。

【請求項62】

如請求項58之方法，其中上述抗前列腺癌藥物選自由以下組成之群：醋酸阿比特龍酯、阿帕魯胺、比卡魯胺、卡巴他賽、康士得(比卡魯胺)、達洛魯胺、地加瑞克、多西他賽、Eligard (醋酸亮丙瑞林)、恩雜魯胺、厄利達(阿帕魯胺)、費蒙格(地加瑞克)、氟他胺、醋酸戈舍瑞林、組胺瑞林(Vantas)、Jevtana (卡巴他賽)、醋酸亮丙瑞林、立普安(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot (醋酸亮丙瑞林)、利普卓(奧拉帕利)、酮康唑(里素勞)、鹽酸米托蒽醌、Nilandron (尼魯米特)、尼魯米特、Nubeqa (達洛魯胺)、奧拉帕尼、普列威(Sipuleucel-T)、鐳223二氯化物、瑞格列克

(Orgovyx)、Rubraca (瑞卡帕布樟腦磺酸鹽)、瑞卡帕布樟腦磺酸鹽、Sipuleucel-T、泰素帝(多西他賽)、曲普瑞林(Trelstar)、多菲戈(鐳223二氯化物)、安可坦(恩雜魯胺)、諾雷得(醋酸戈舍瑞林)及Zytiga (醋酸阿比特龍酯)。

【請求項63】

一種確定對患有或疑似患有癌症之受試者中的GREM1拮抗劑之回應可能性的方法，包括：

(a)　偵測來自上述受試者之生物樣品中之雄激素受體(AR)表現或信號傳導，以及

(b)　基於在步驟(a)中偵測到的AR表現或信號傳導確定回應之可能性。

【請求項64】

如請求項63之方法，其中上述受試者當偵測到上述受試者不存在AR表現或信號傳導或者經偵測為具有相對於參考水準降低之AR表現或信號傳導時確定為具有對GRME1拮抗劑回應之可能性。

【請求項65】

如請求項63或64之方法，其中上述方法亦包括偵測來自上述受試者之生物樣品中之GREM1表現。

【請求項66】

如請求項65之方法，其中當偵測到上述受試者具有GREM1表現時，確定上述受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【請求項67】

一種偵測經確定為不存在AR表現或經確定為具有減弱的雄激素受體

(AR)信號傳導之樣品中GREM1存在或含量的方法，包括使上述樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定上述樣品中之GREM1之存在或含量。

【請求項68】

一種確定在患有或疑似患有疾病或病症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性的方法，包括：

(a)　偵測來自上述受試者之生物樣品中之PTEN及/或p53之缺乏，以及

(b)　基於在步驟(a)中偵測到的PTEN及/或p53之缺乏來確定回應之可能性。

【請求項69】

如請求項68之方法，其中當偵測到上述受試者缺乏PTEN及/或p53時，確定上述受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【請求項70】

如請求項68或69之方法，其中上述方法亦包括偵測GREM1在來自上述受試者之生物樣品中之表現。

【請求項71】

如請求項70之方法，其中當偵測到上述受試者具有GREM1表現時，確定上述受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【請求項72】

一種偵測經確定為缺乏PTEN及/或p53之樣品中的GREM1之存在或含量的方法，包括使上述樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定上述樣品中之GREM1之存在或含量。

【請求項73】

如請求項68至72中任一項之方法，其中上述樣品係自患有或疑似患有GREM1相關疾病或病症之受試者獲得的。

【請求項74】

如請求項73之方法，其中上述GREM1相關疾病或病症為癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓或骨關節炎(OA)。

【請求項75】

如請求項63至67或74中任一項之方法，其中上述癌症為前列腺癌、乳癌、神經膠質瘤、脂質體肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【請求項76】

如請求項75之方法，其中上述癌症為前列腺癌或乳癌，

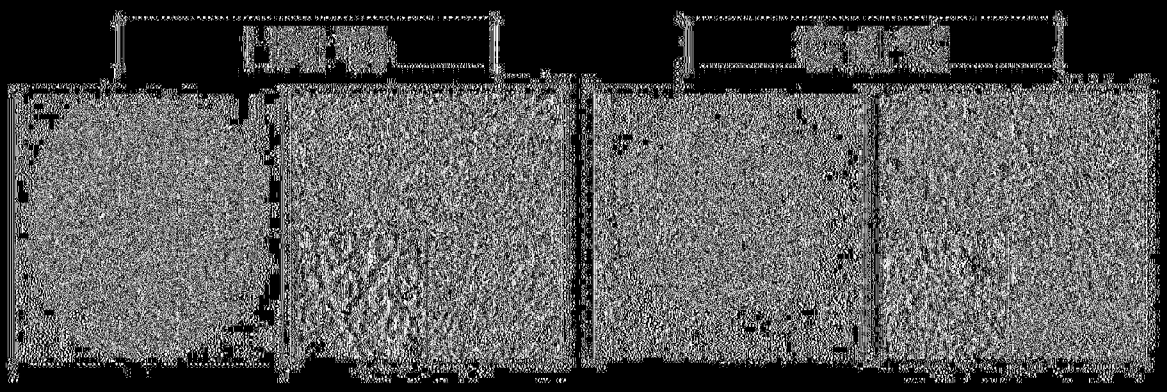
其中上述前列腺癌為：

a)抗雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，及/或

b)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)之水準。

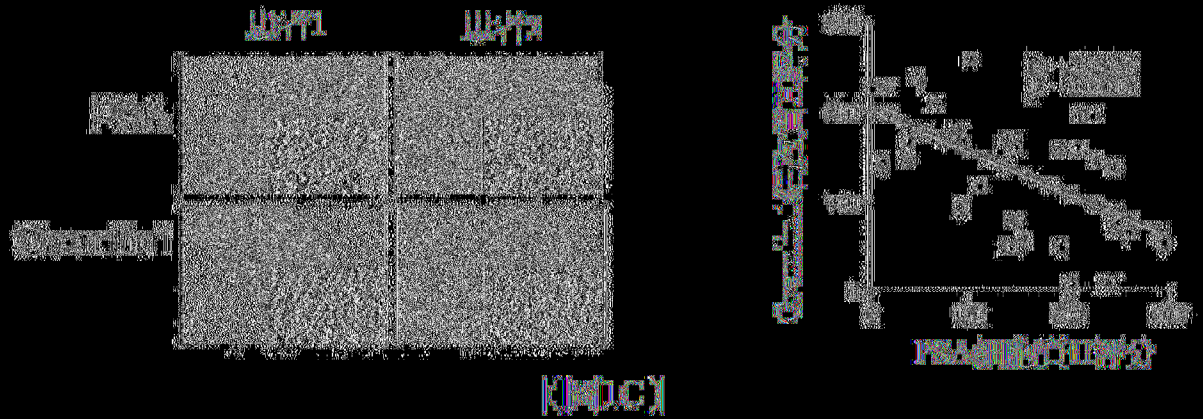
【請求項77】

如請求項63至76中任一項之方法，其中上述方法亦包括向經確定為具有回應之可能性的上述受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。



[圖1A]

(圖1B)



(圖1C)

圖1D

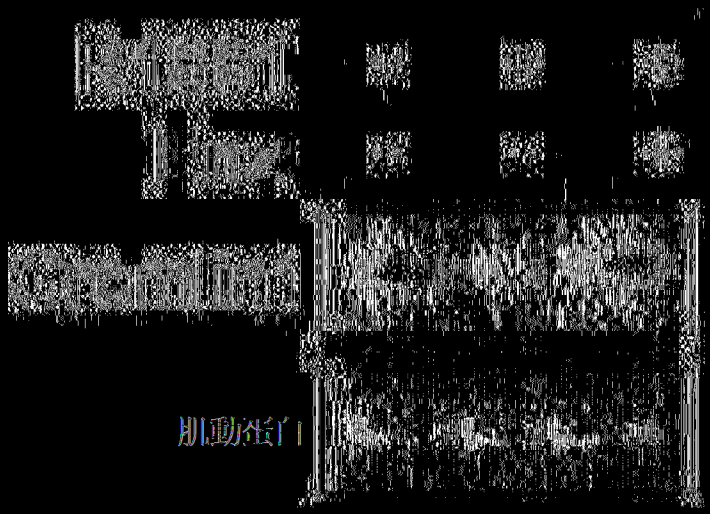
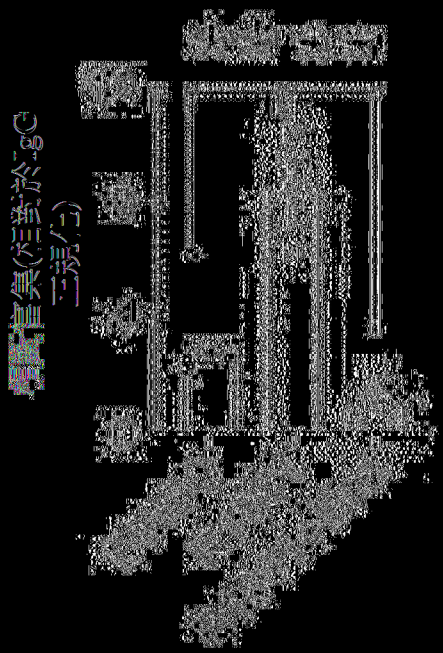


圖1E



Gremlin1高(n=18)
Gremlin1低(n=11)

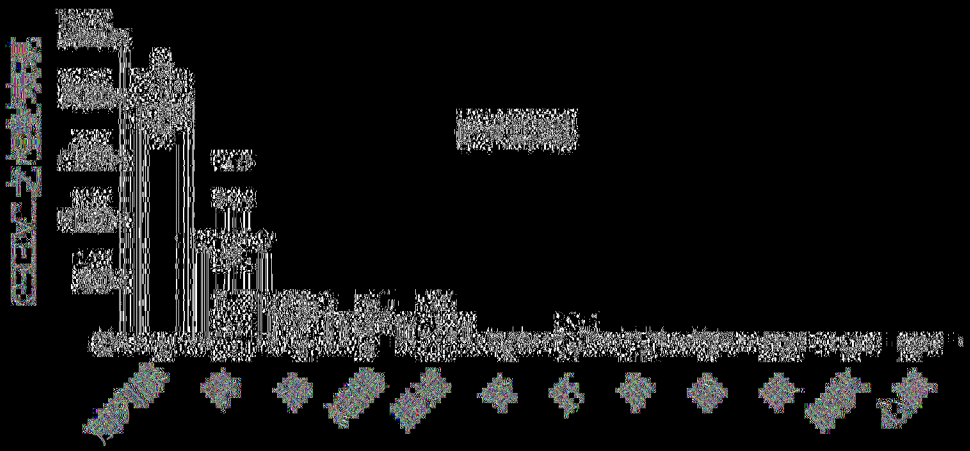


圖1D

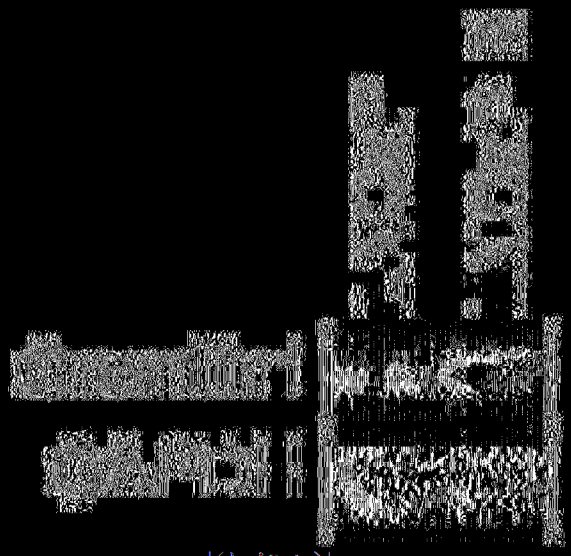
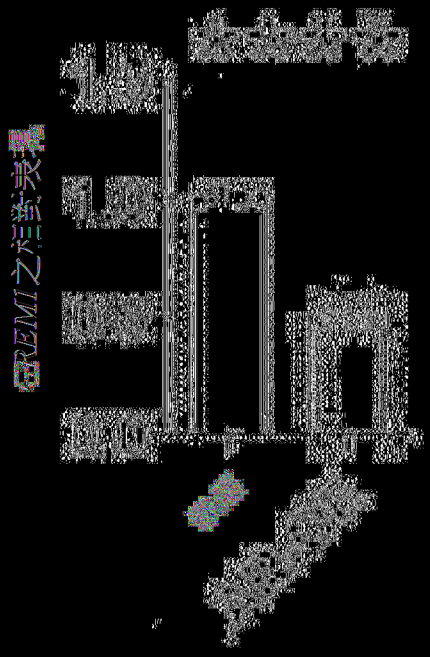


圖2A

圖2B



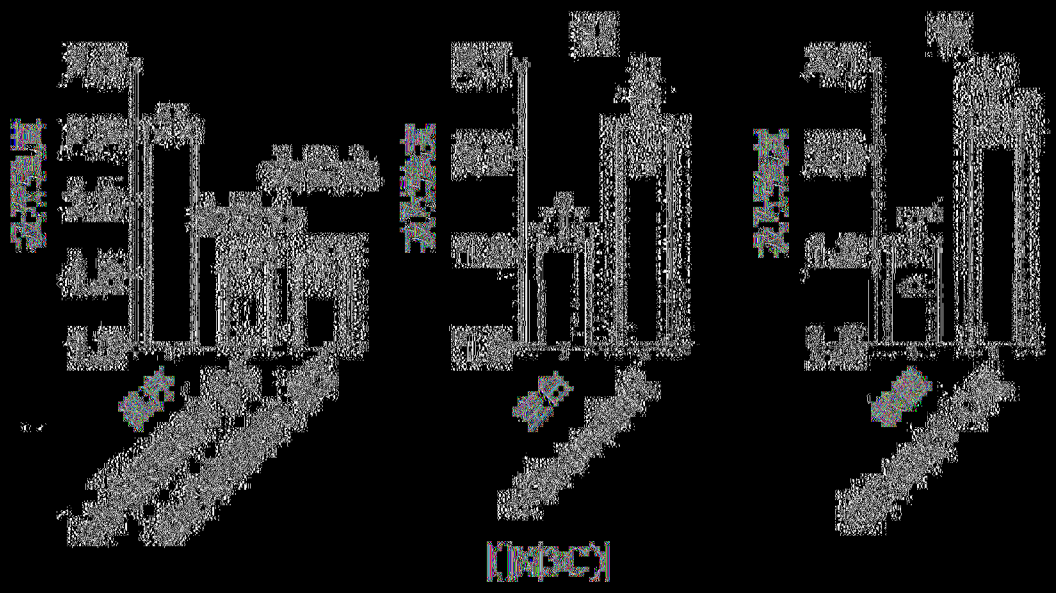
圖(H2C)

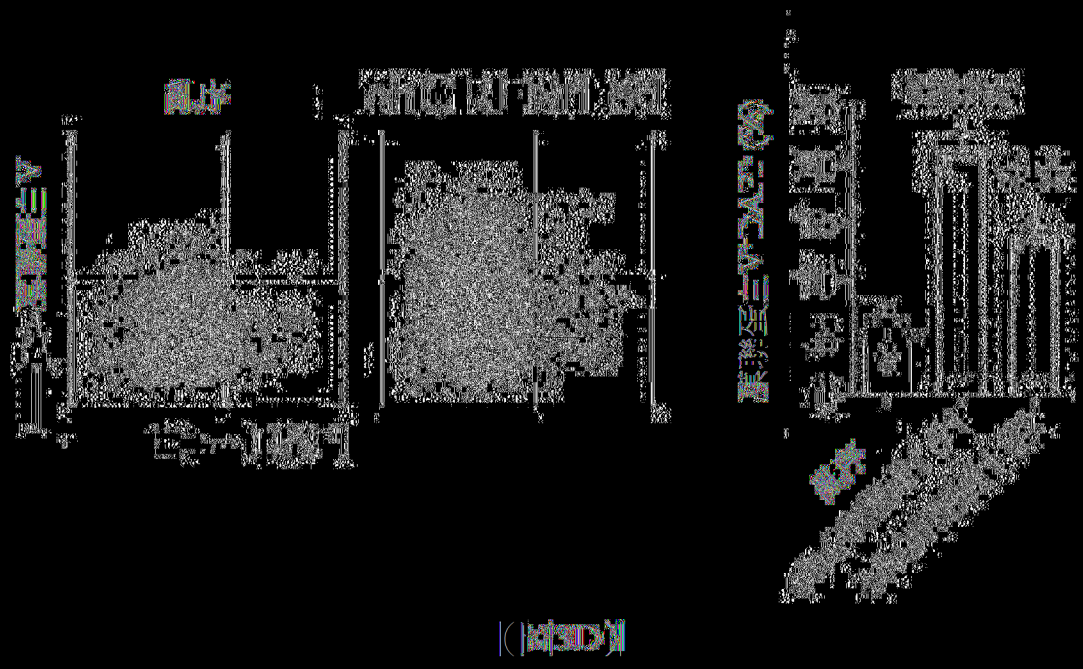
圖(H2D)

GREMI之杰出求助
對象

圖3A

圖3B





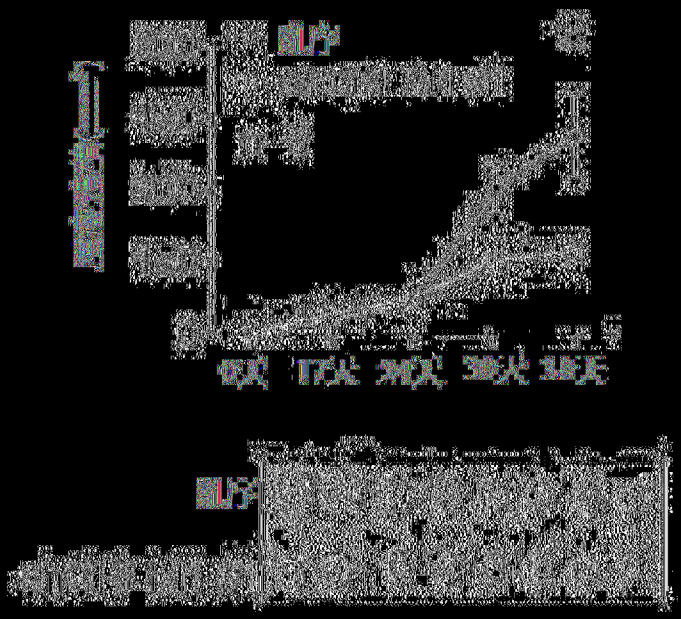


圖3E

圖3F

圖3G

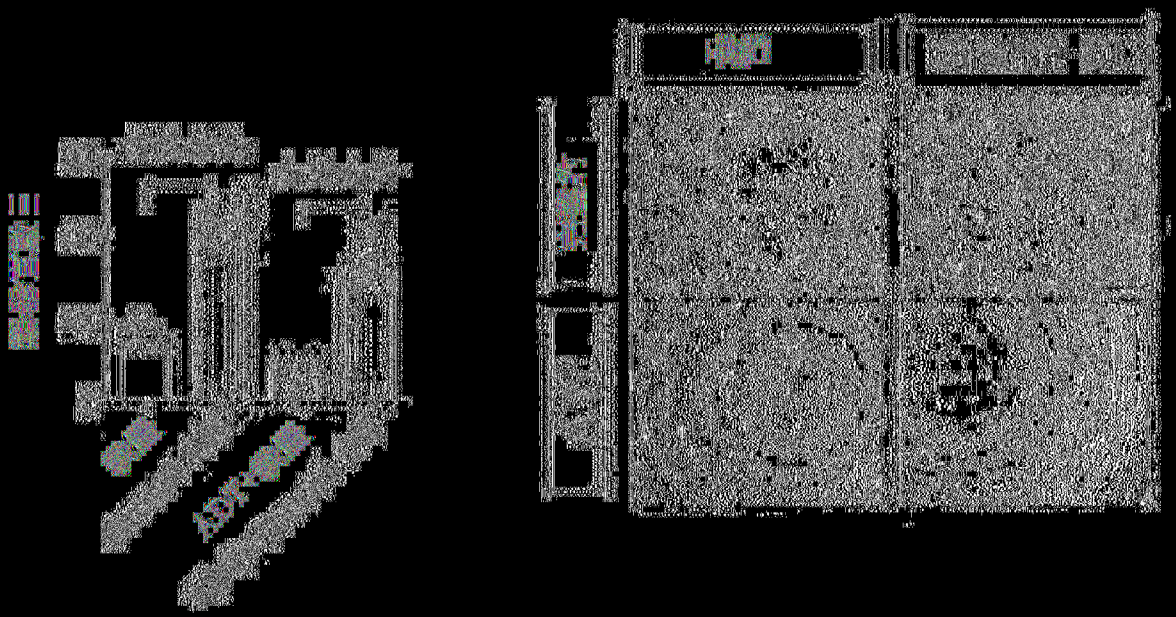


圖3H

圖4A

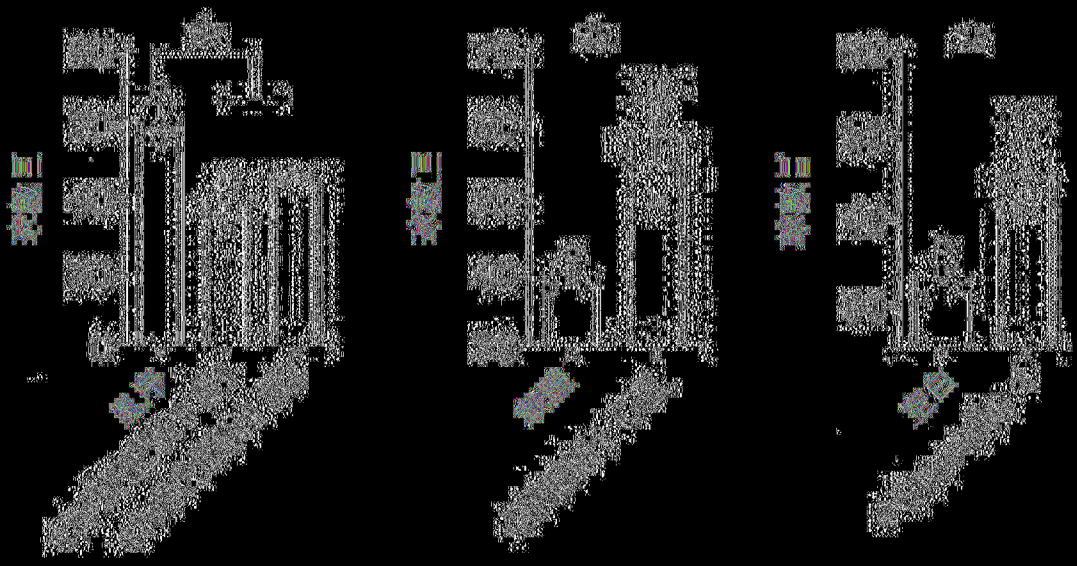
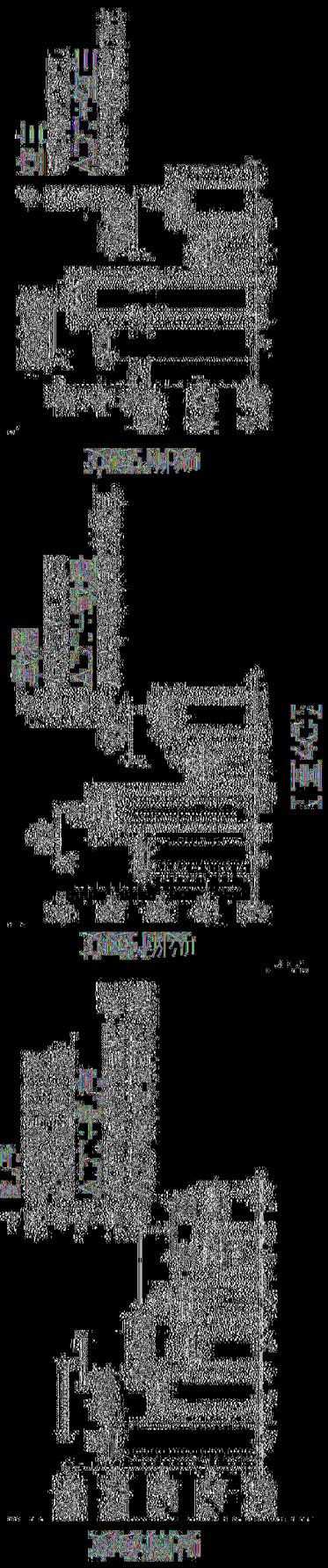
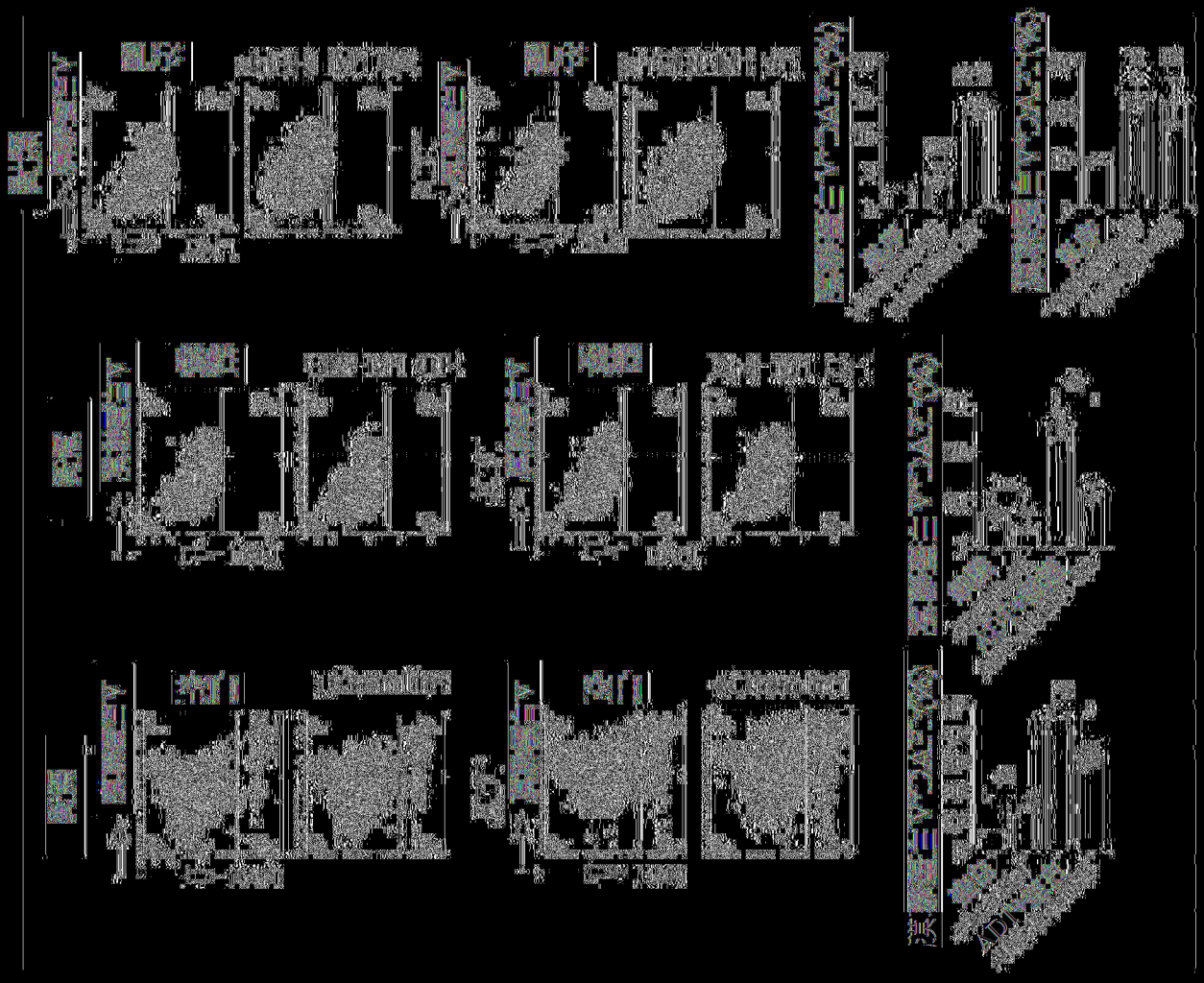


圖4B





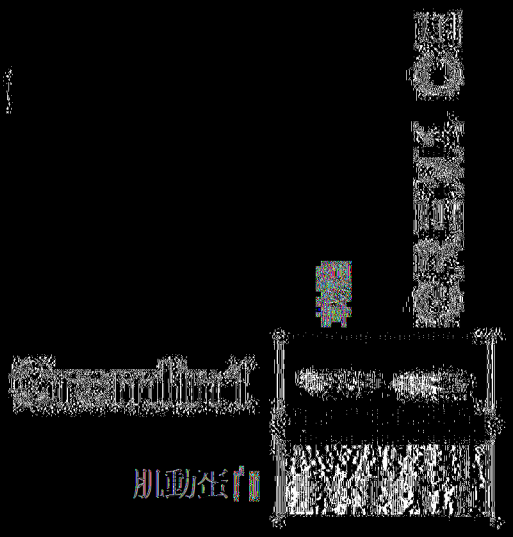


圖5A

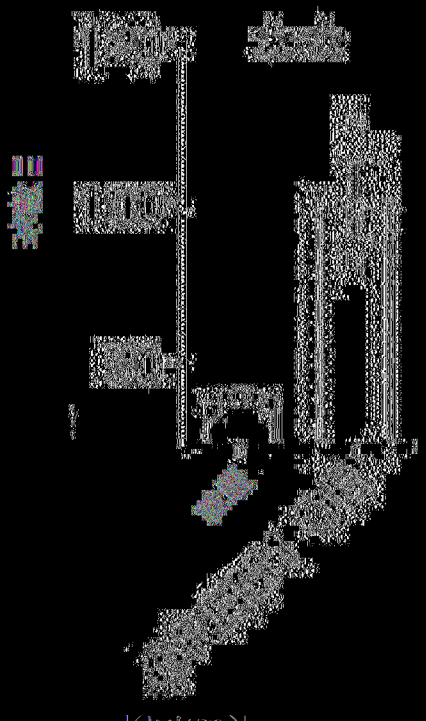
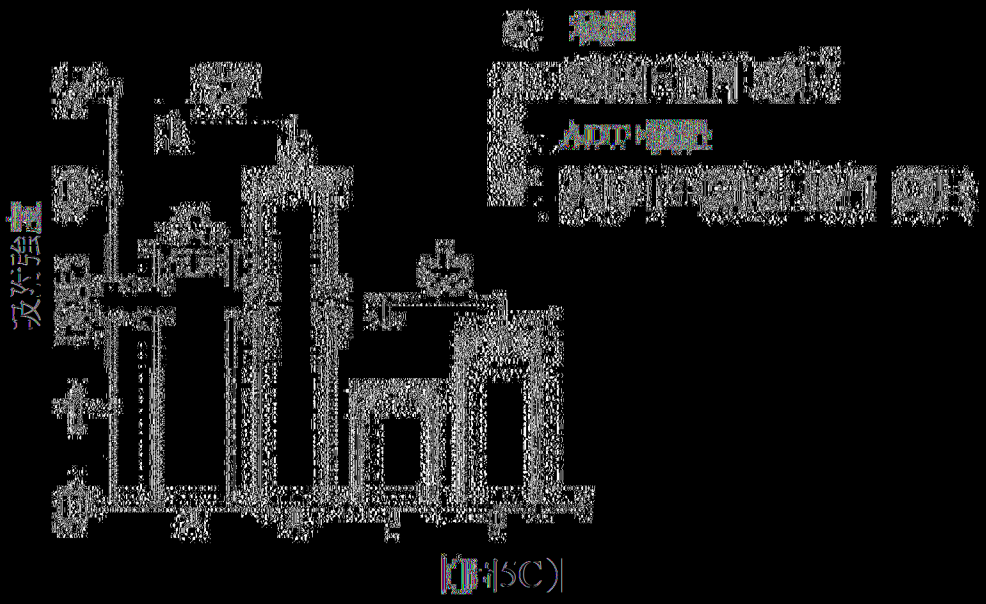


圖5B



FGFR1通路
FGFR通路
VEGF通路
縫隙連接
MAPK通路
JAK STAT通路
Notch通路
緊密連接
WNT通路
BMP通路
PI3K通路
TGF-β通路
正規化的富集評分

圖6A

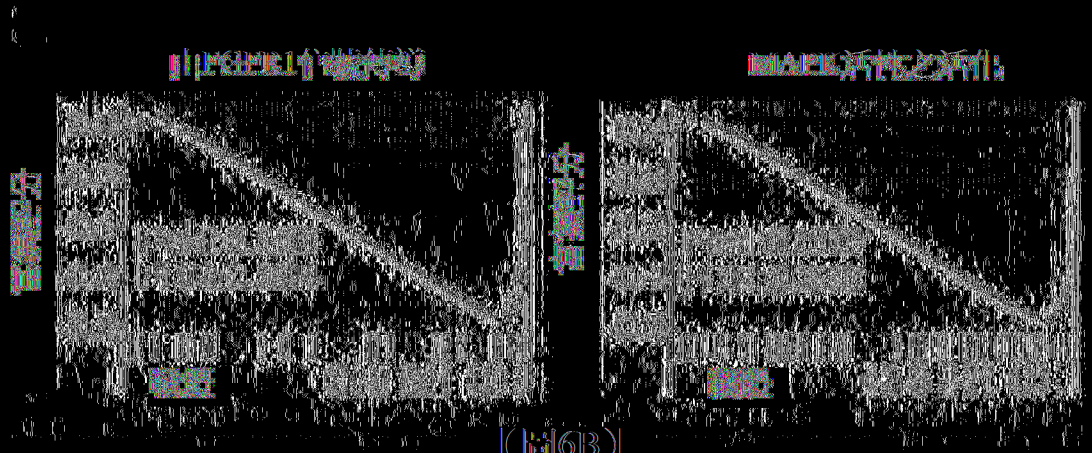
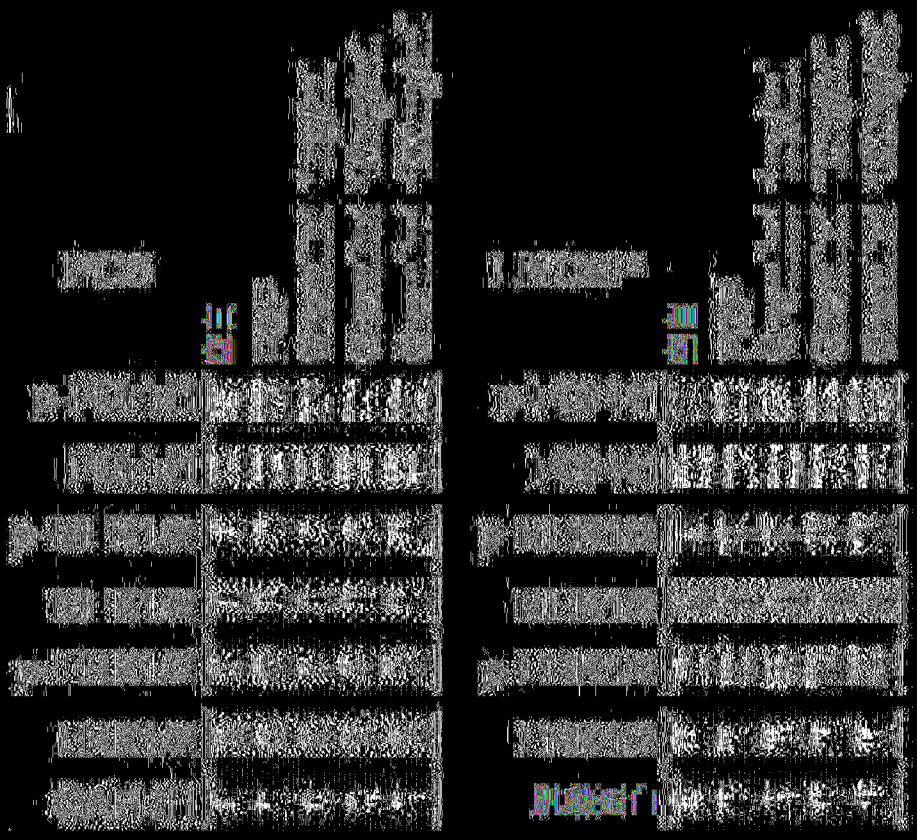
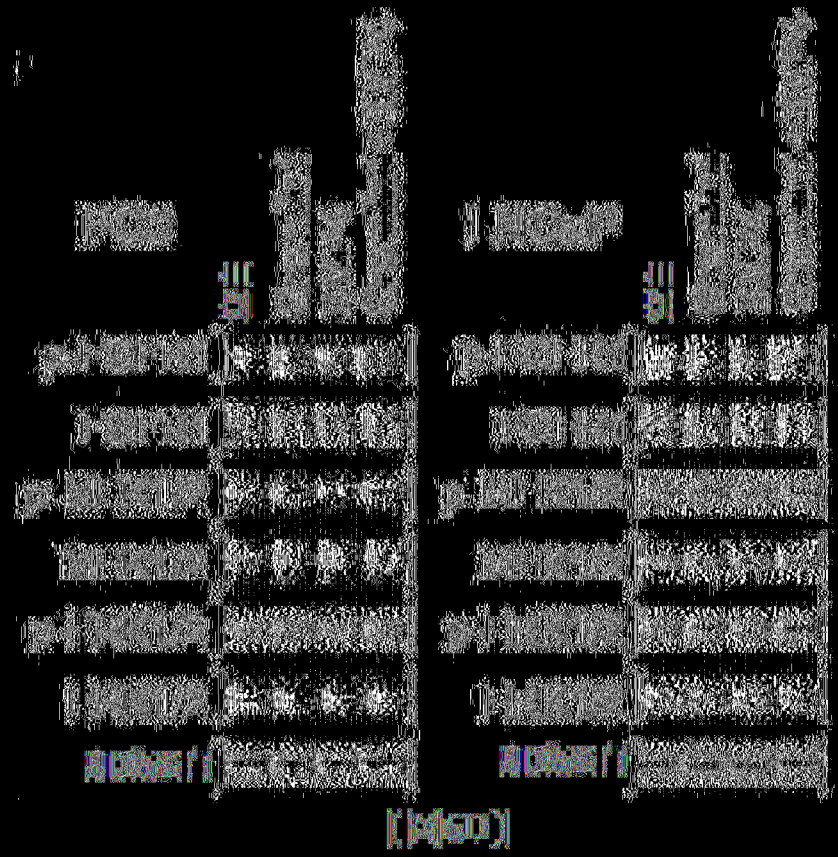
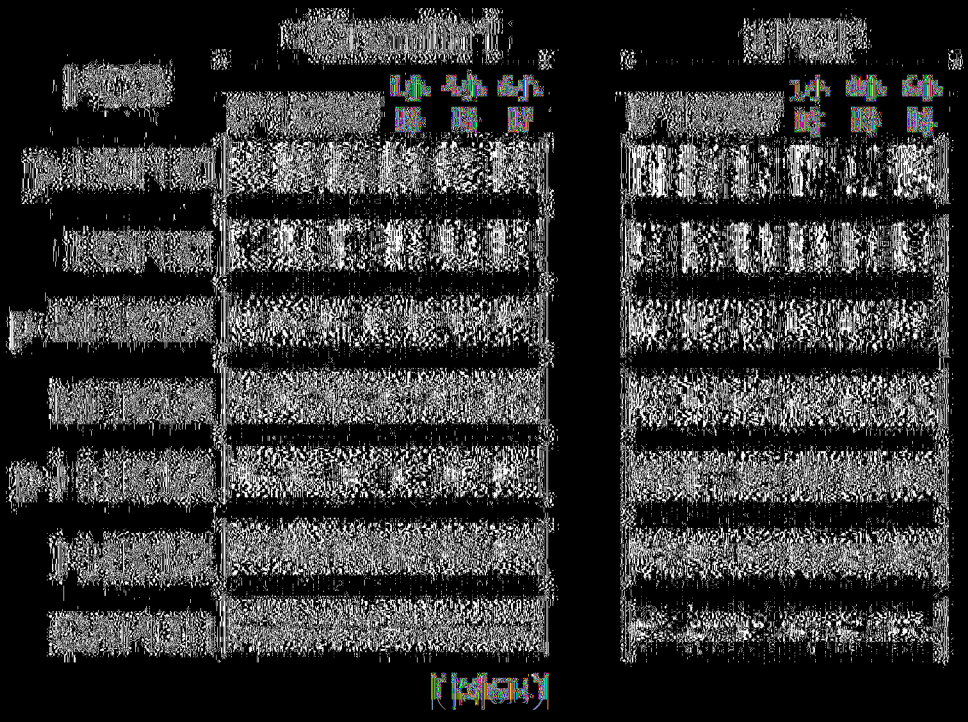
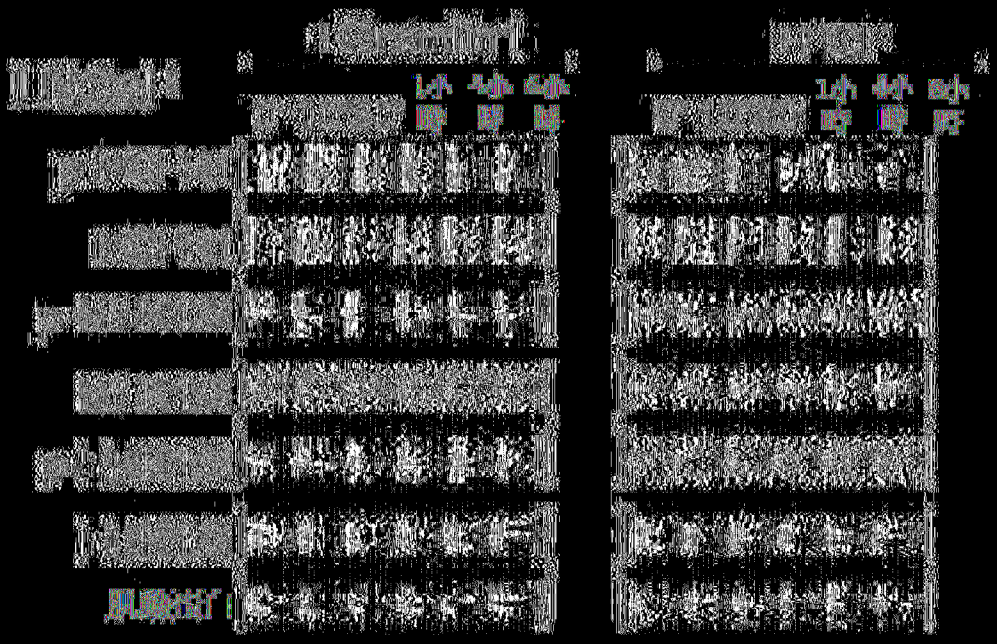

正常組織的富集評分
MAPK活性之評分

圖6B

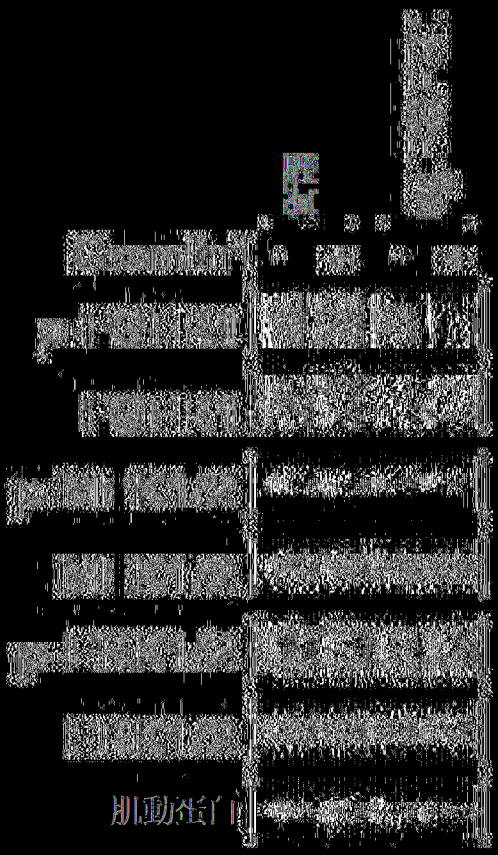




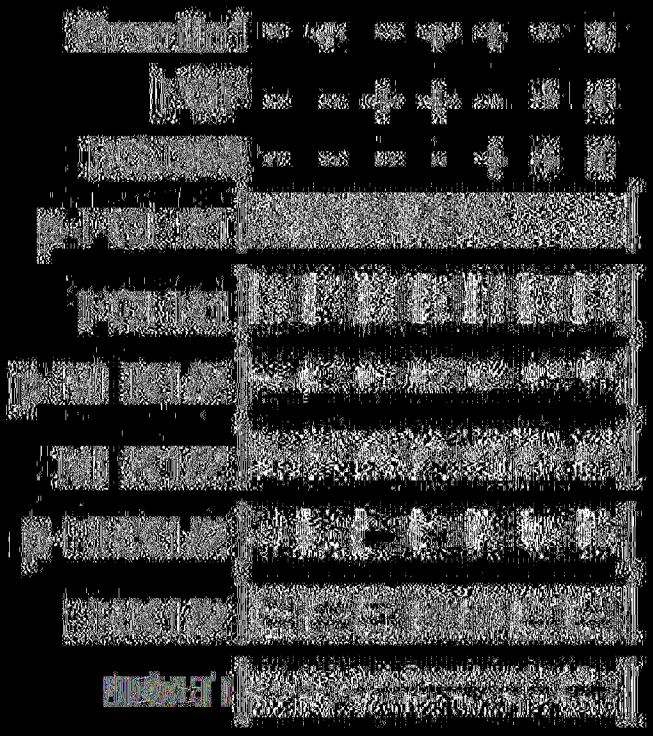




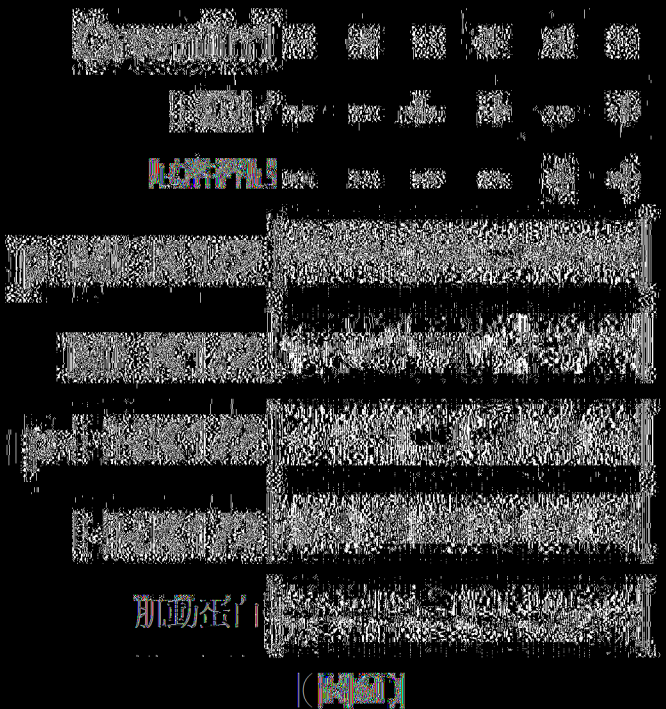
(第6F)



(第5F)



[圖6D]



[圖6E]

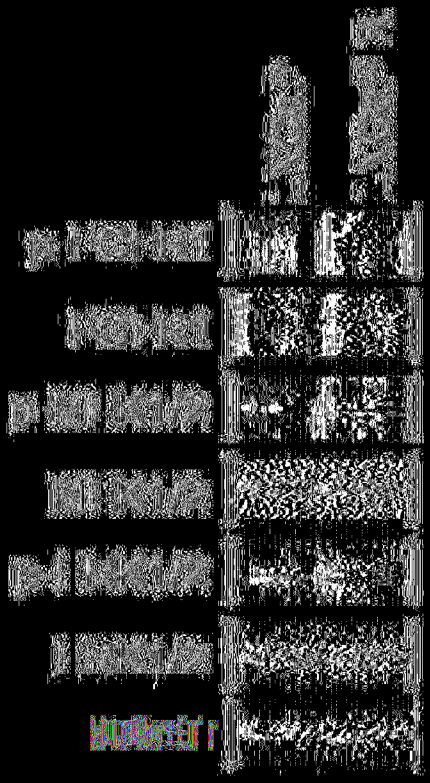


圖7A

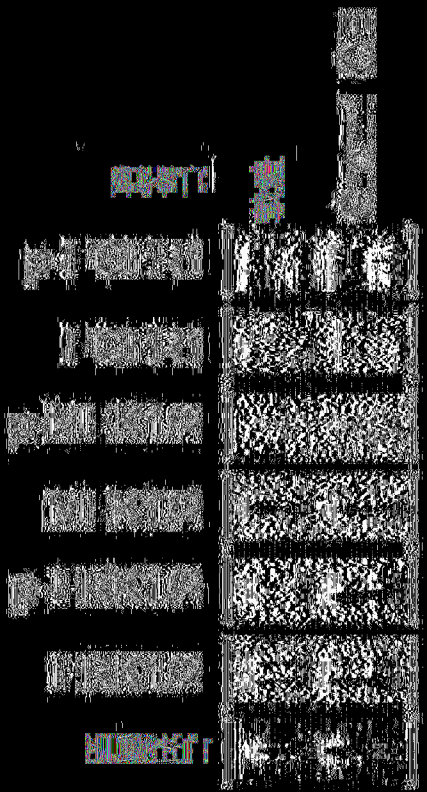
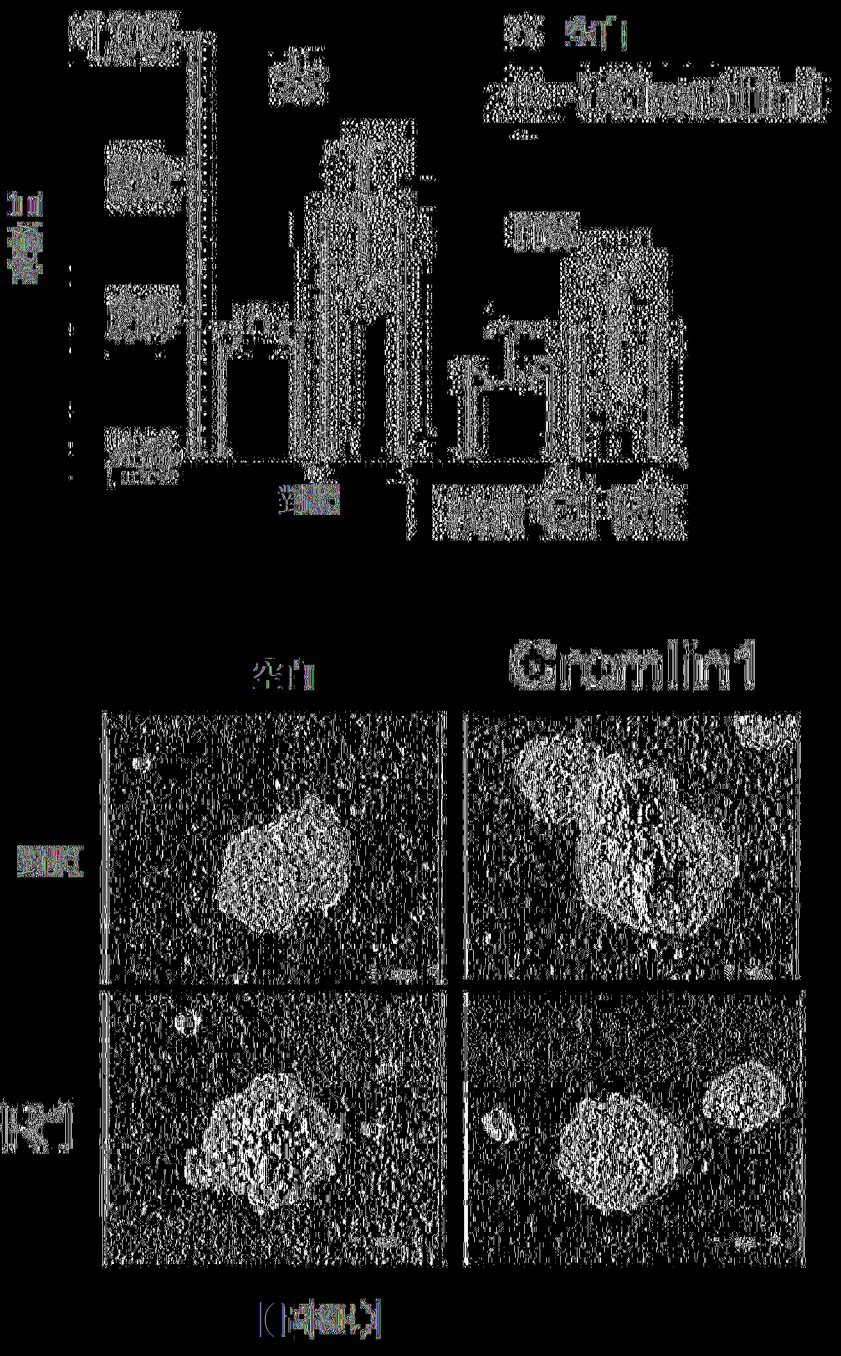
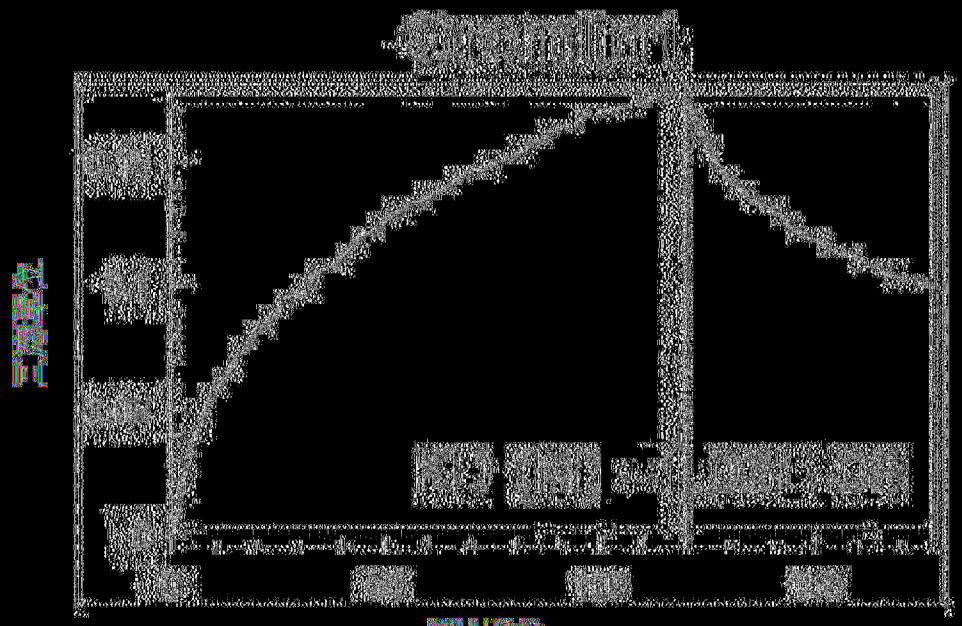


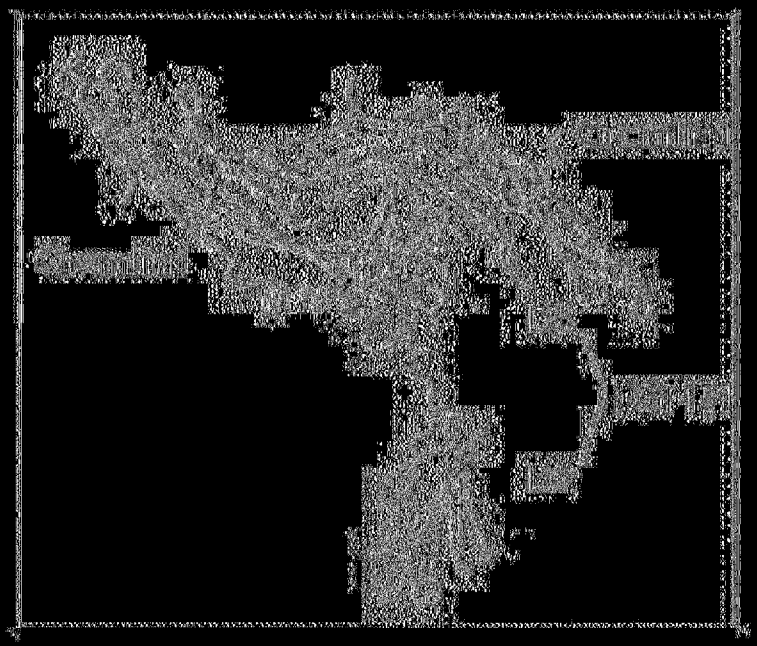
圖7B

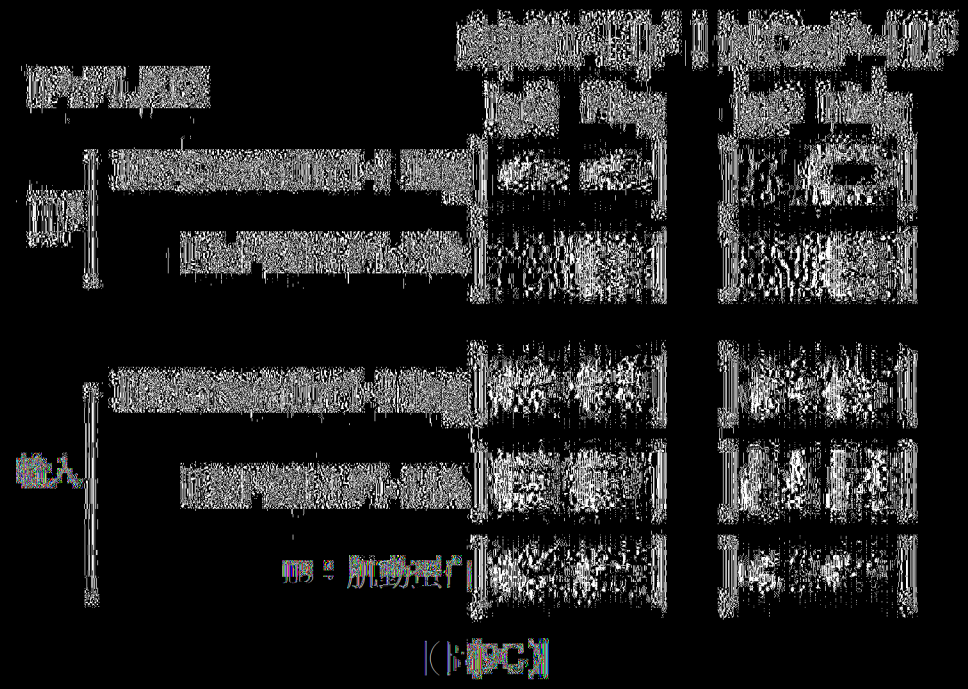
圖8A

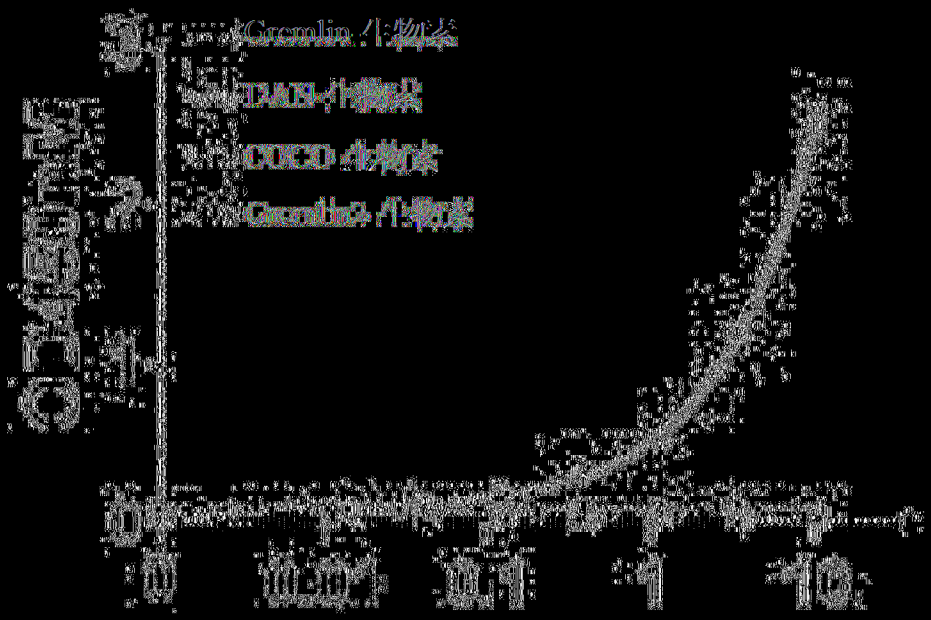
圖8B



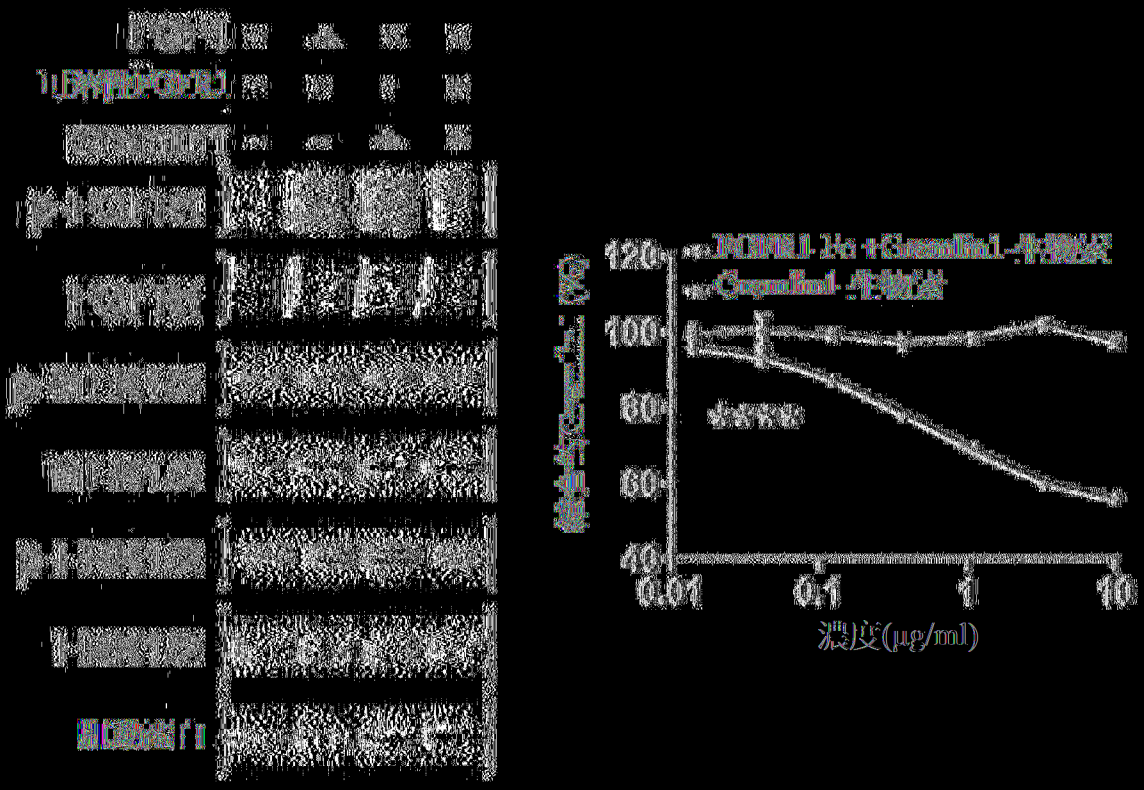




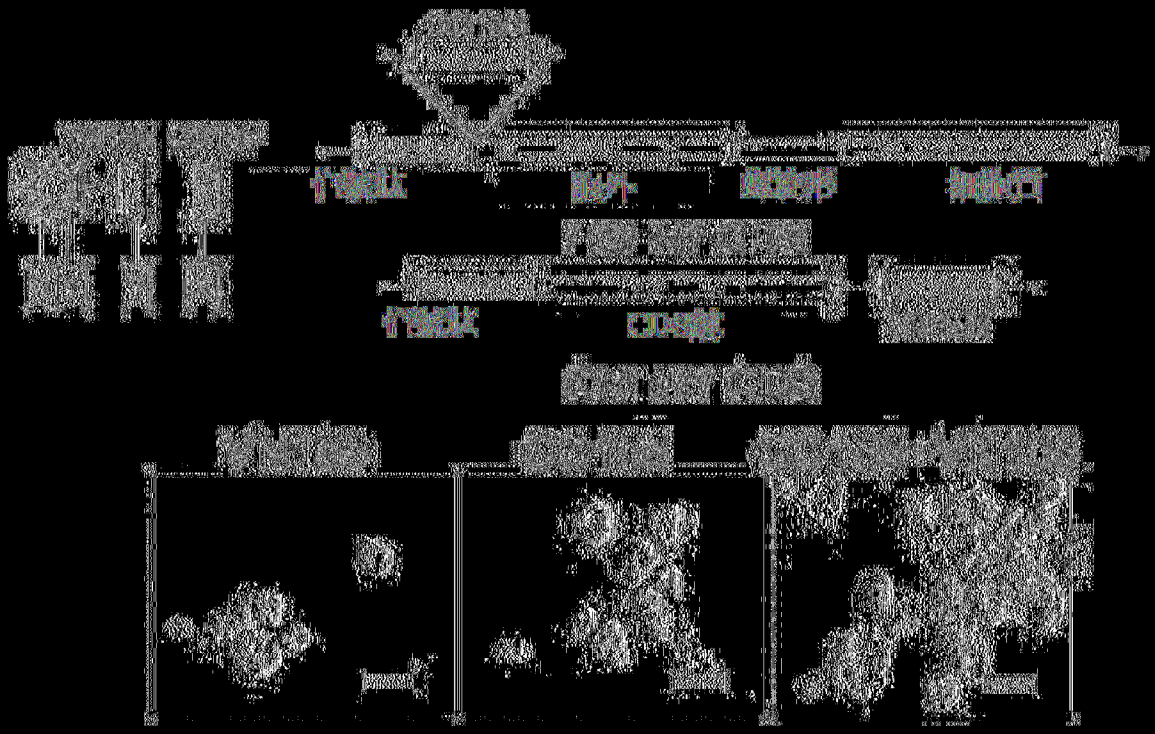


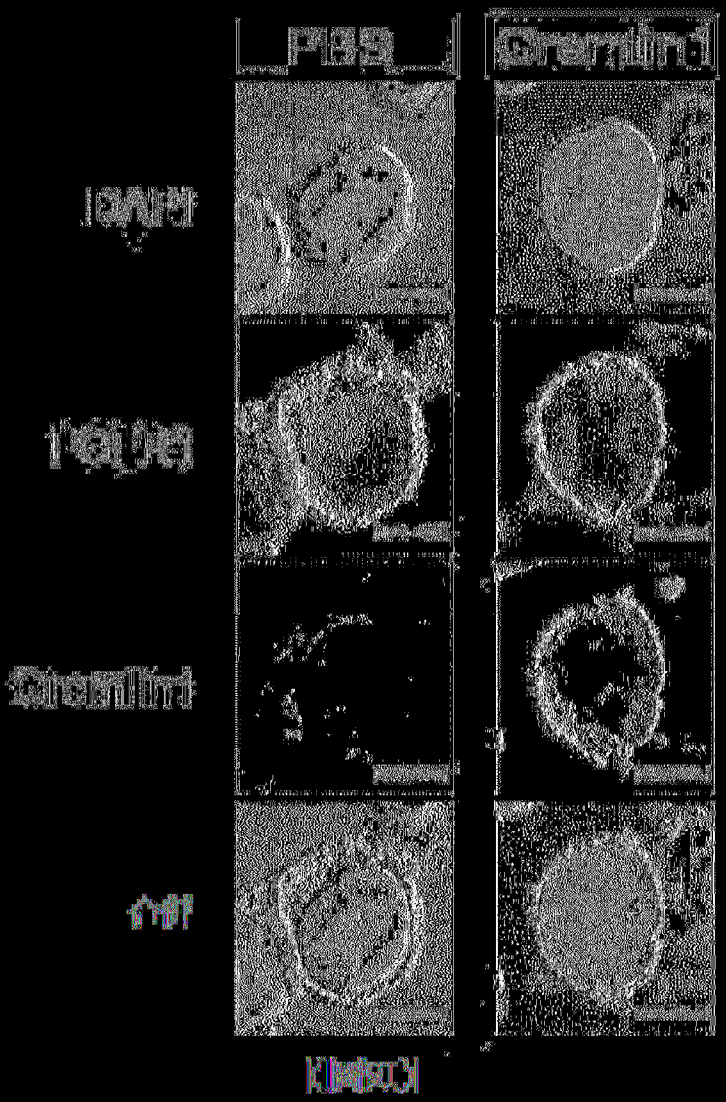

Gremlin 生物素
DAB 生物素
COCD 生物素
Gremlin 生物素
濃度(ng/mL)

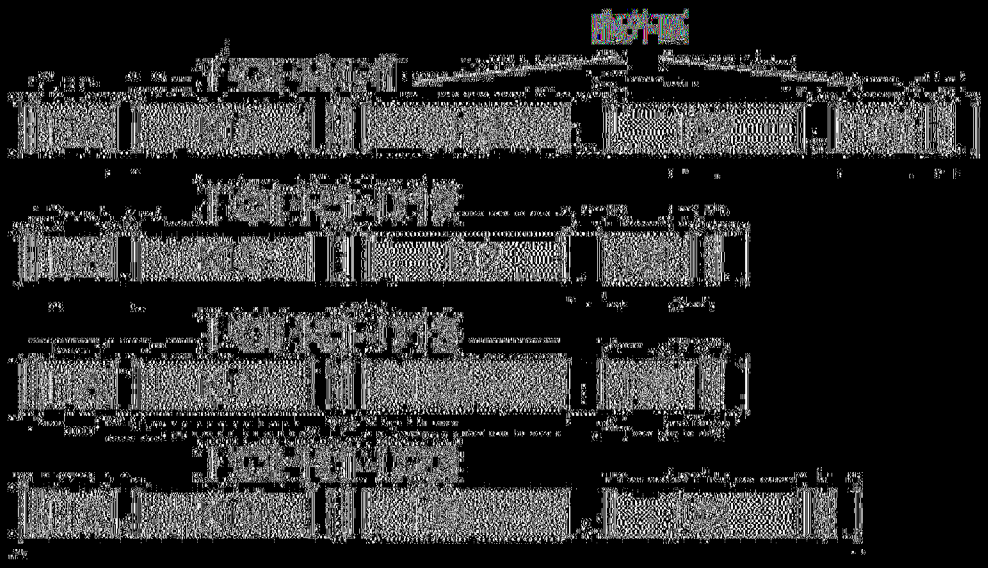
(圖9F)



[圖9G]







圖(略9J)

圖(略9K)

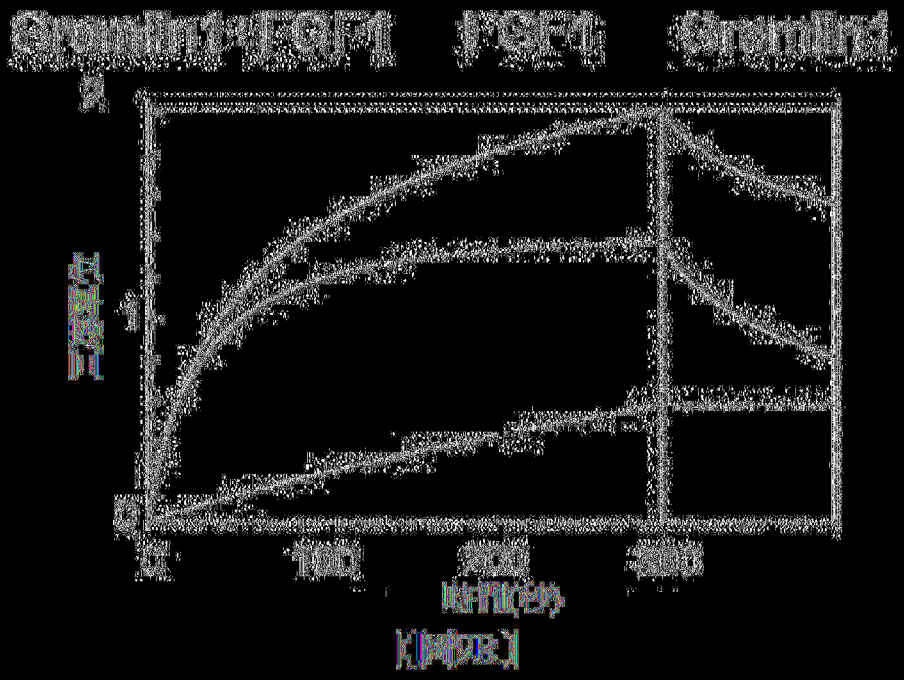
GREM1-Flap點突變

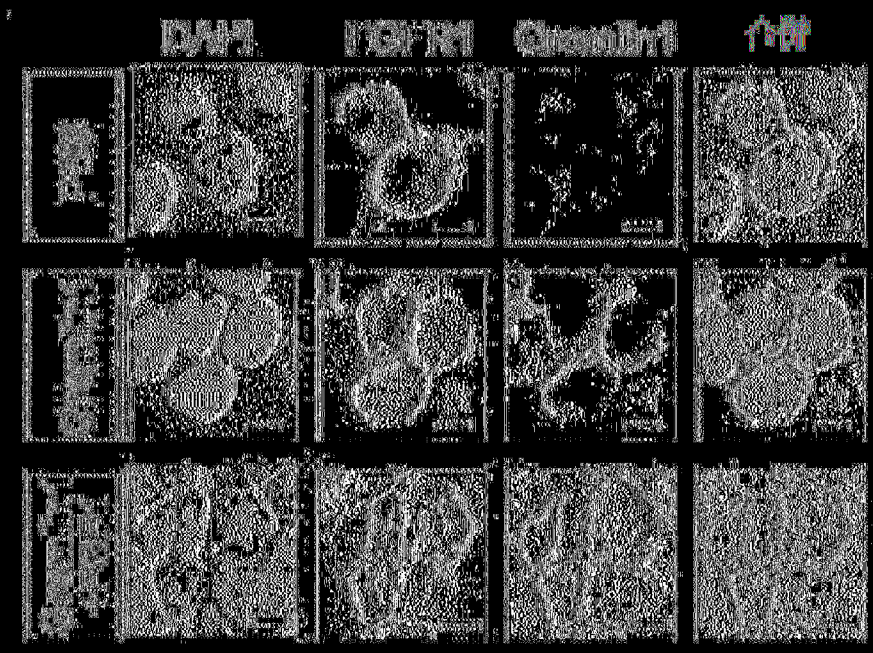
FGFR1點突變

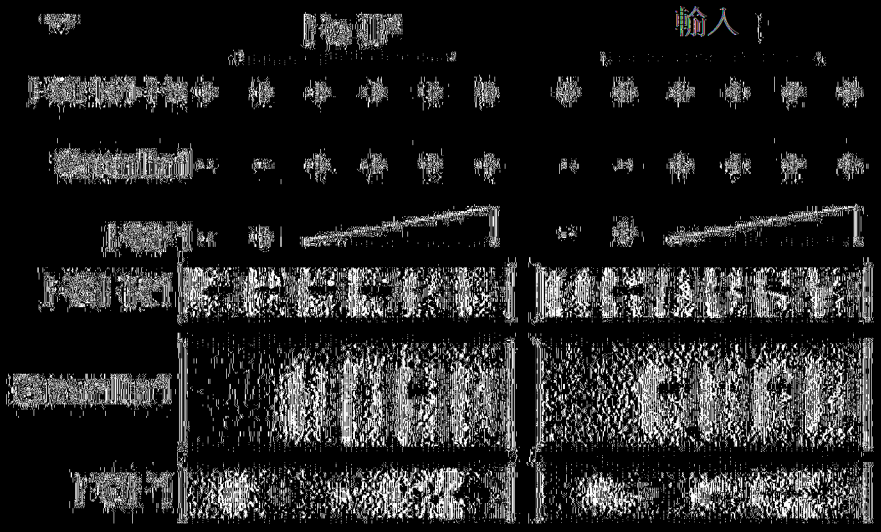
[illegible]

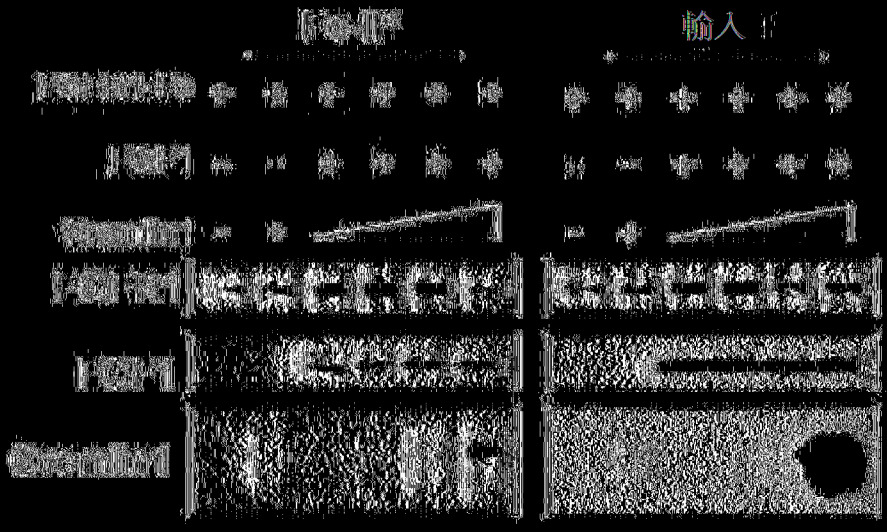
[illegible]

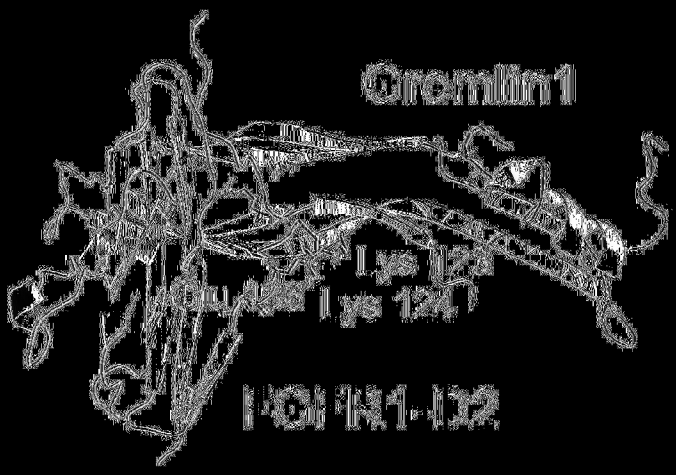
[illegible]



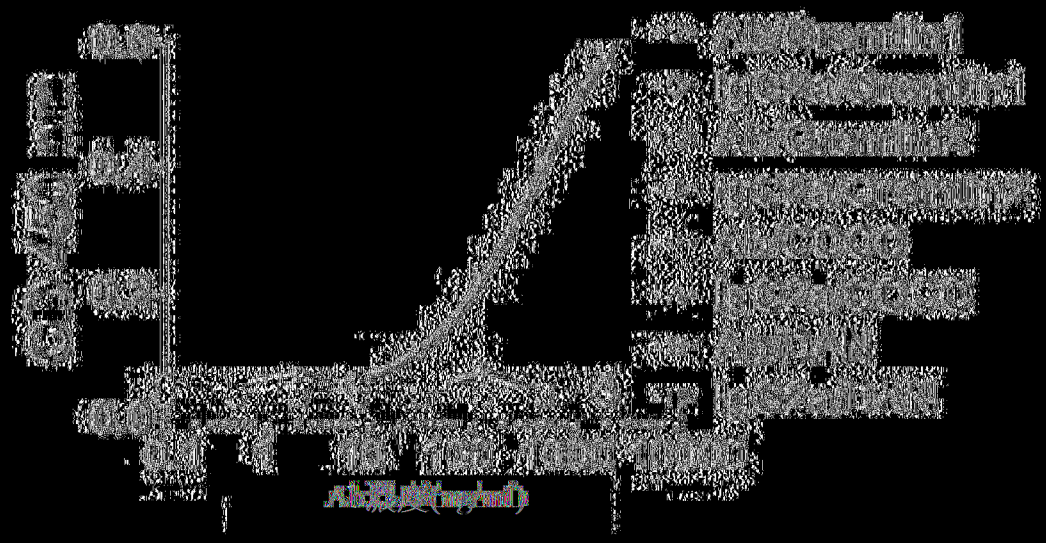



輸入
(197)

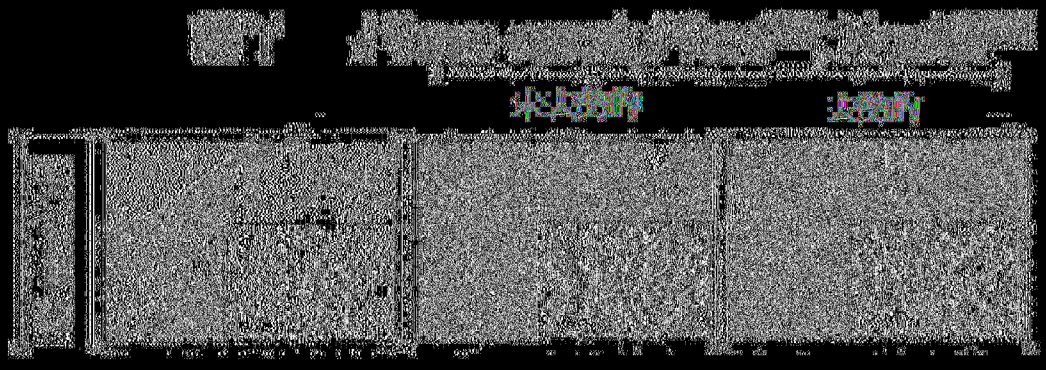

輸入
(190)



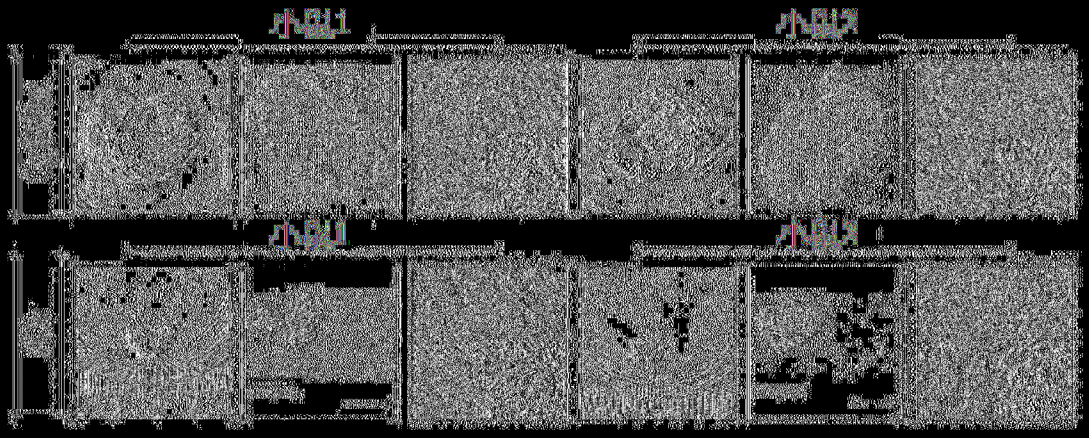
|(開9V)|



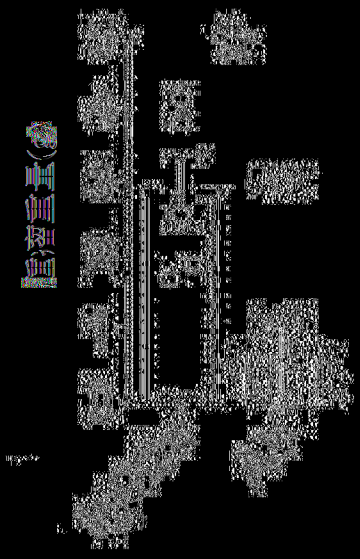
(圖10A)



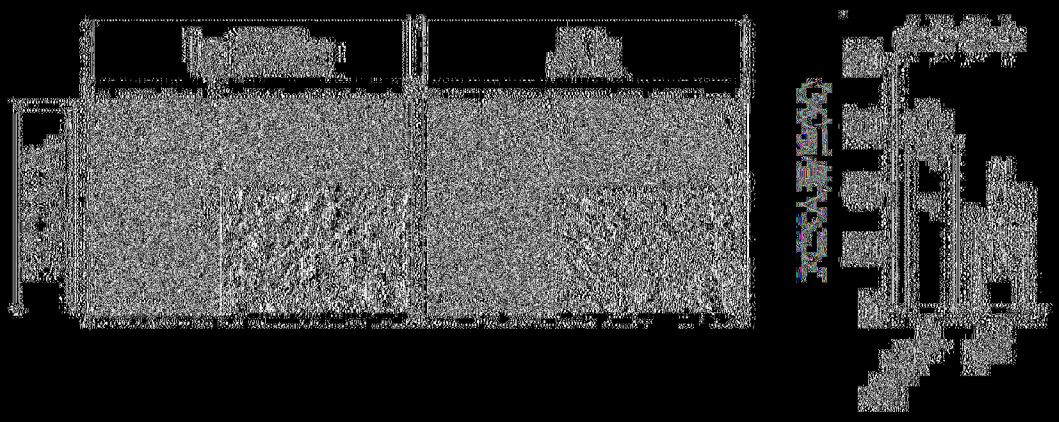
(圖10B)



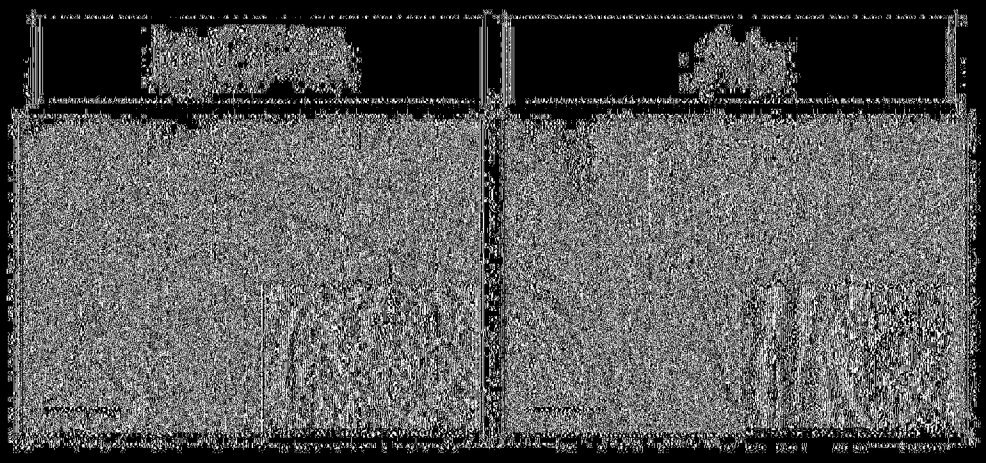
圖(四10C)



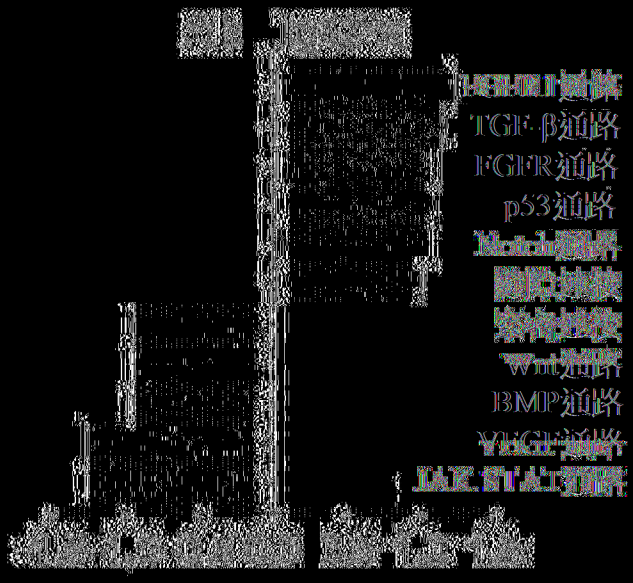
圖(四10D)



（圖10B）

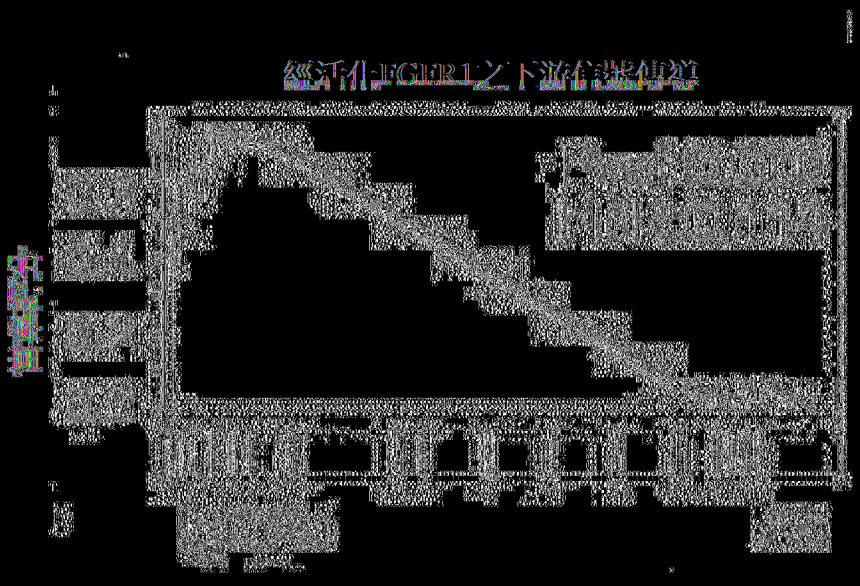


（圖10C）

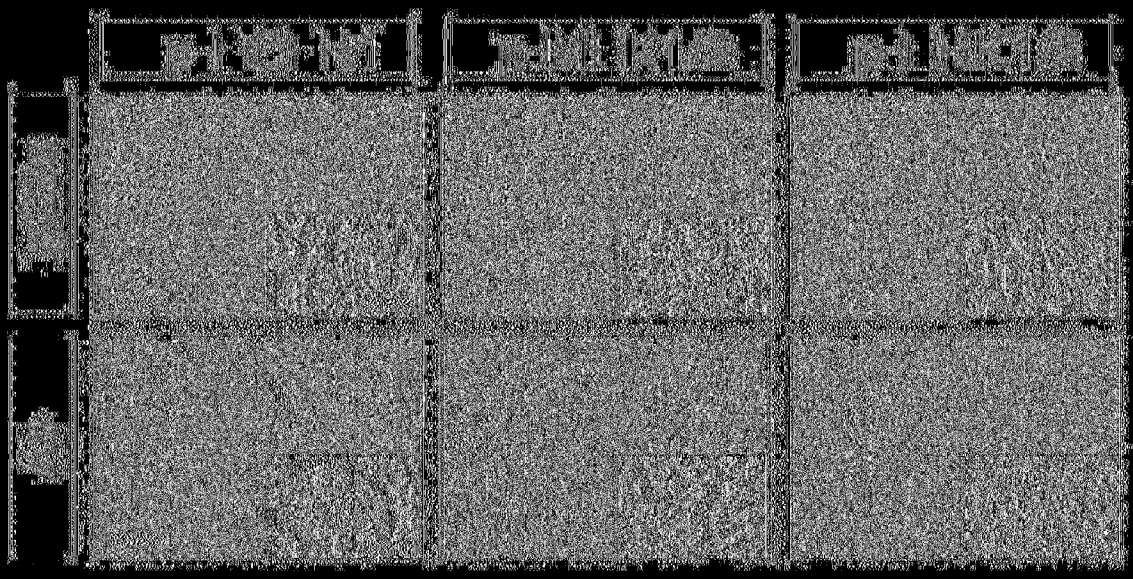


正規化的富集評分

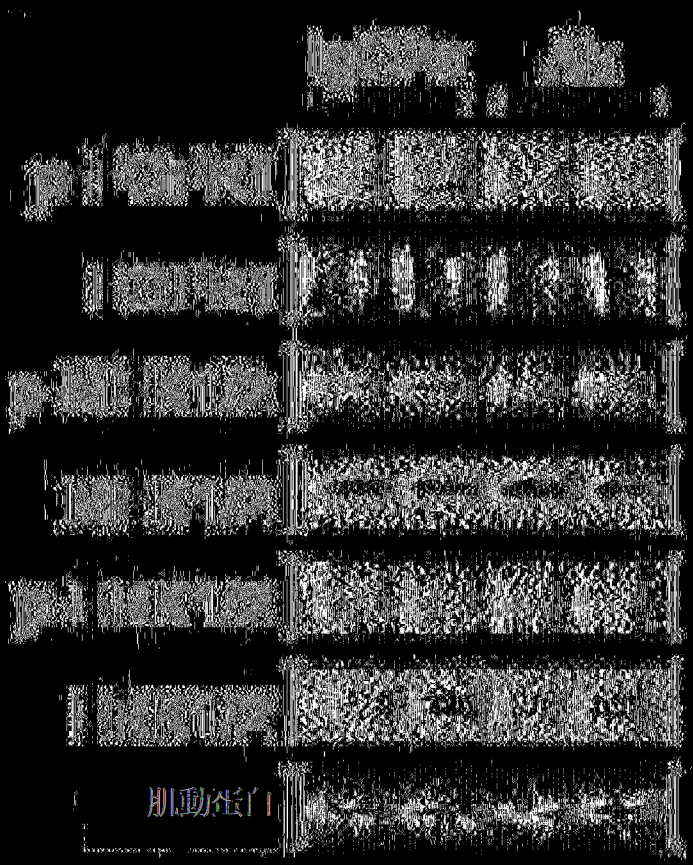
[圖10G]



[圖10H]



[圖10]



[圖10']

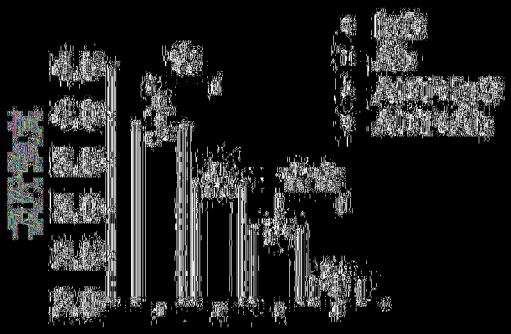


圖10K

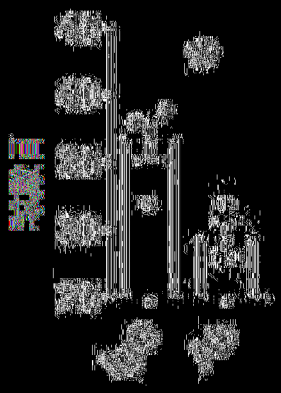


圖10L

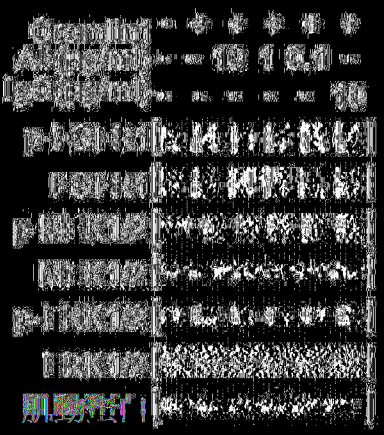


圖10M

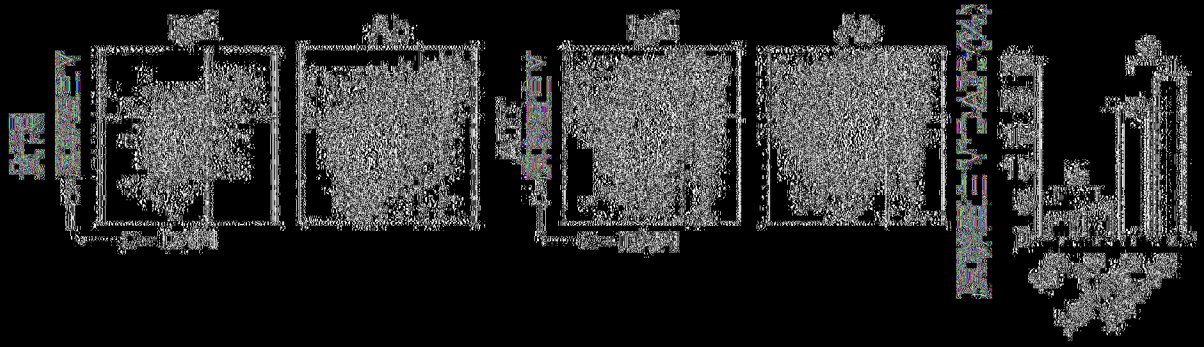
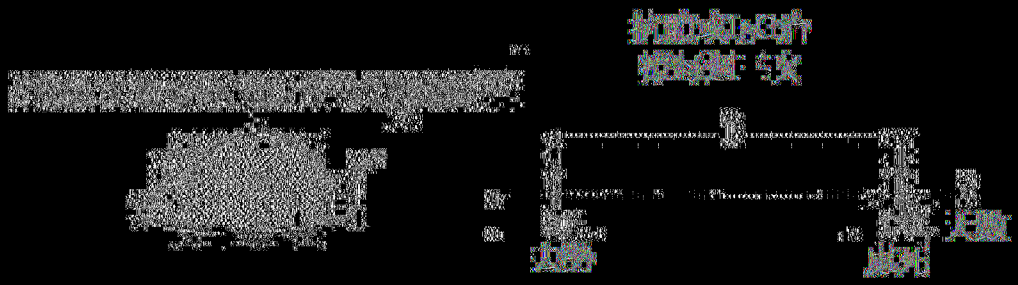
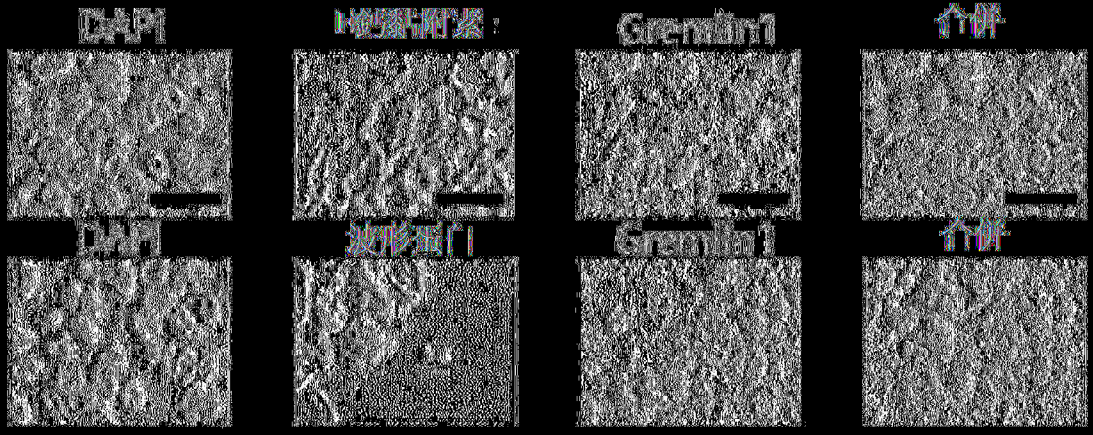


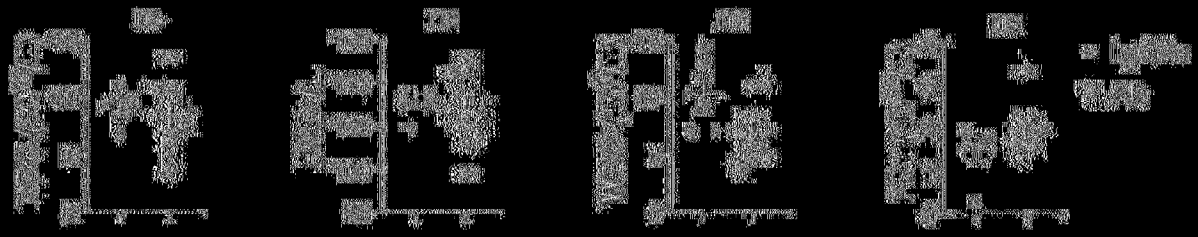
圖10N



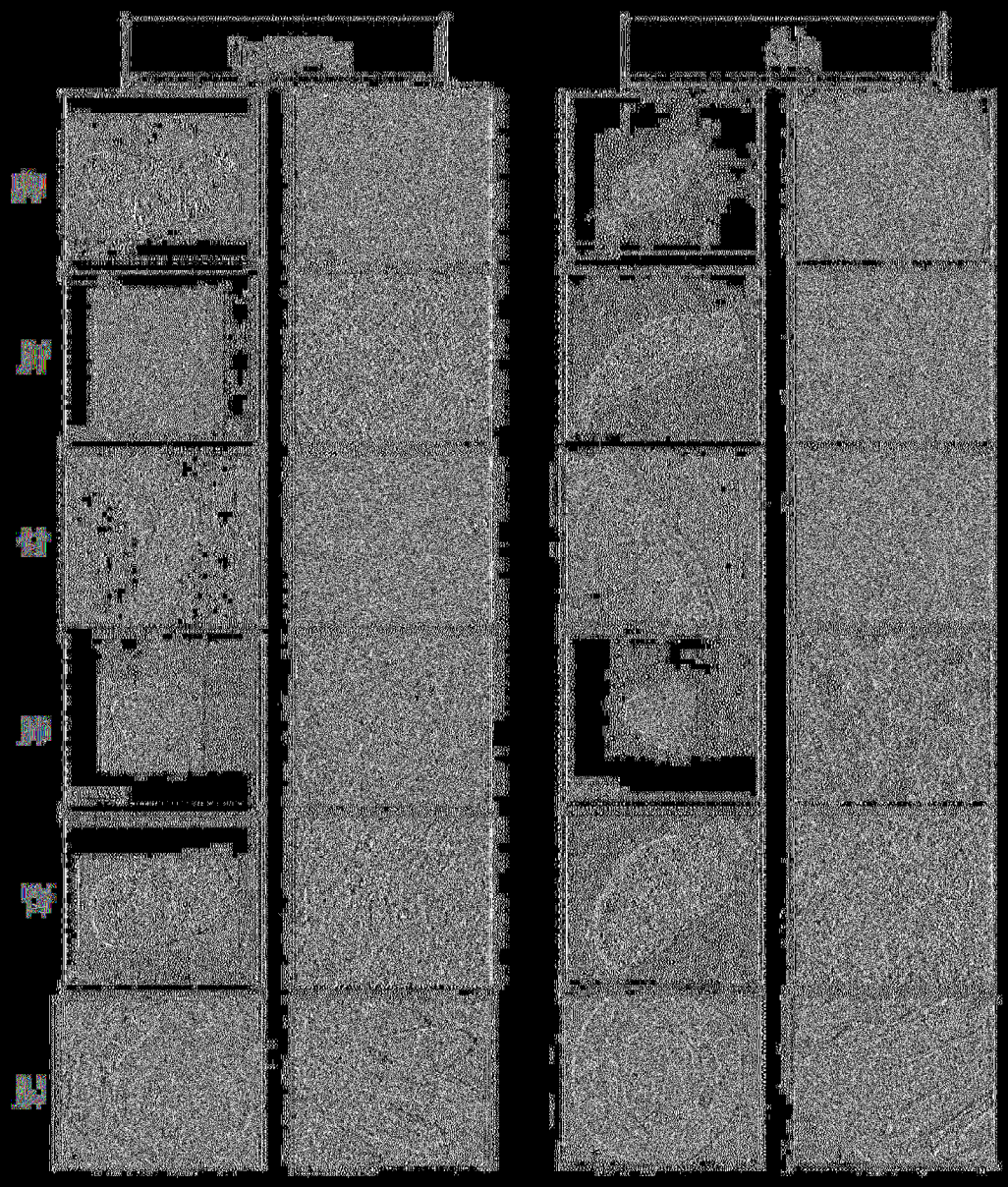
[FIG.9C]

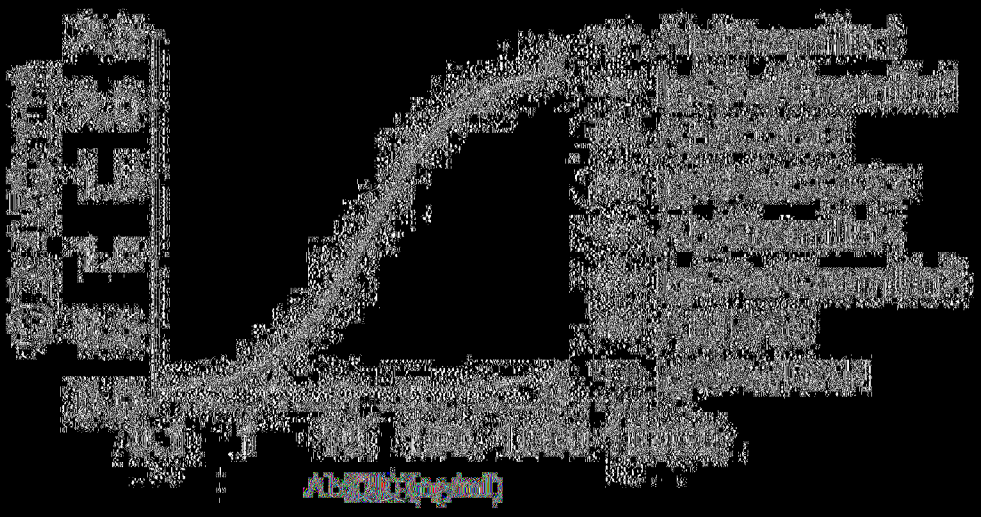


[圖11A]



[圖11B]





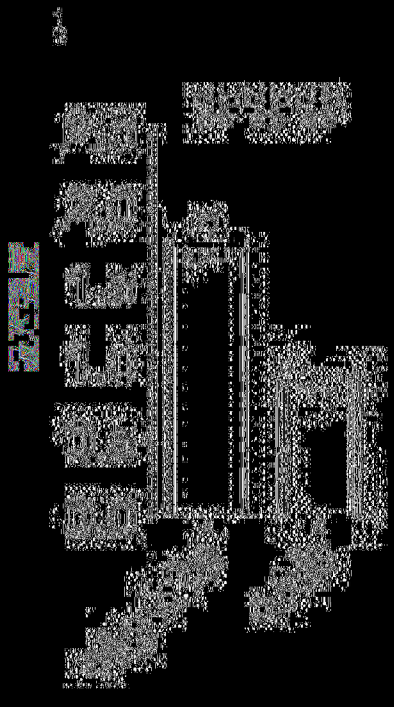


圖12C

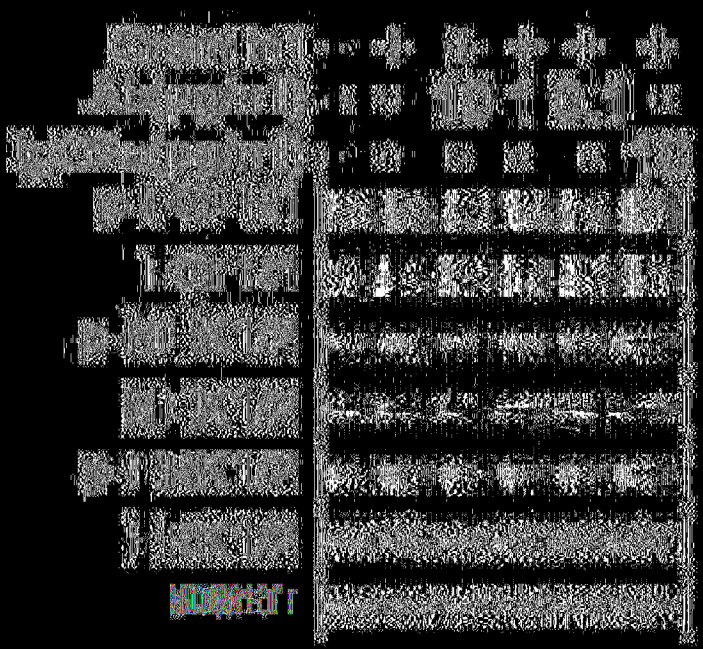
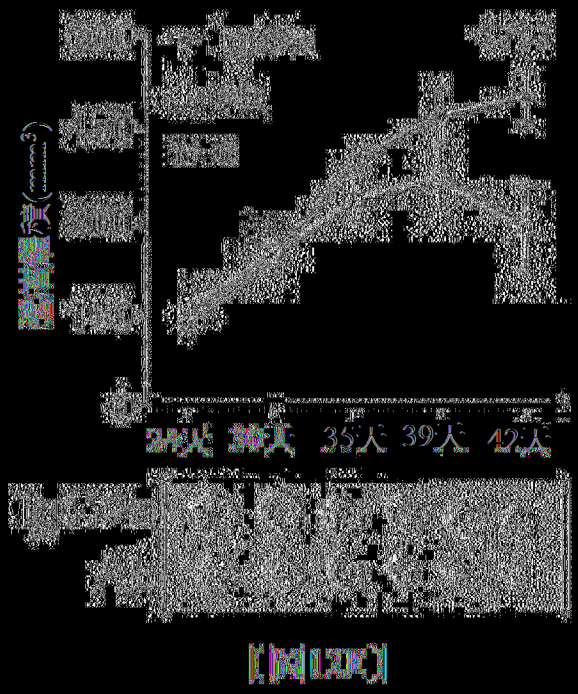
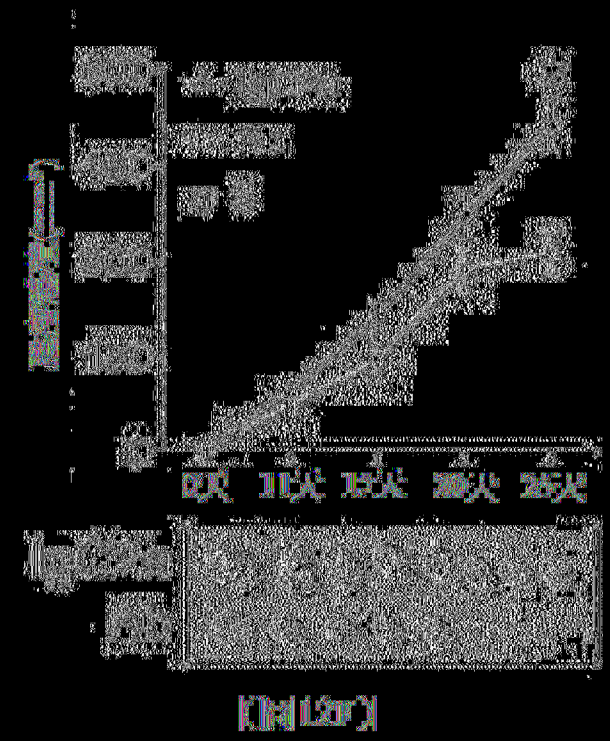
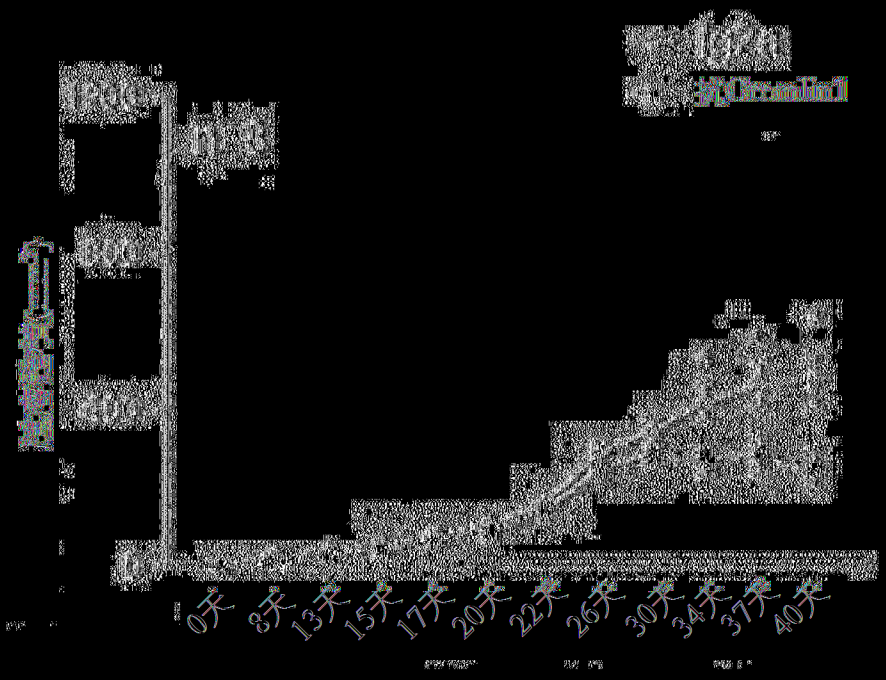


圖12D


31人 33人 35人 39人 42人


9人 11人 13人 15人 25人



大致

|(|13)|

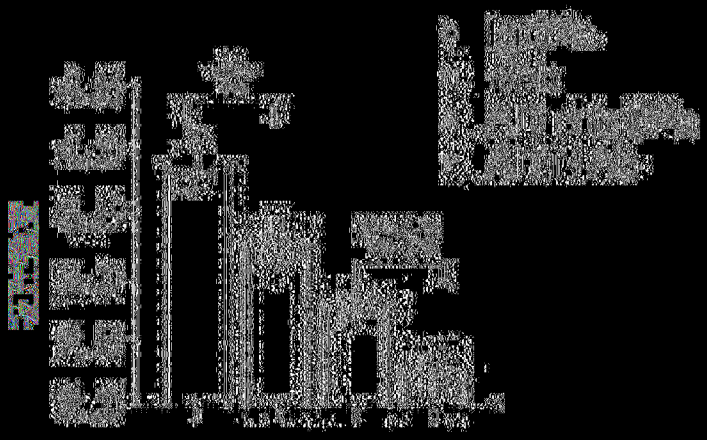


圖14A

圖14B

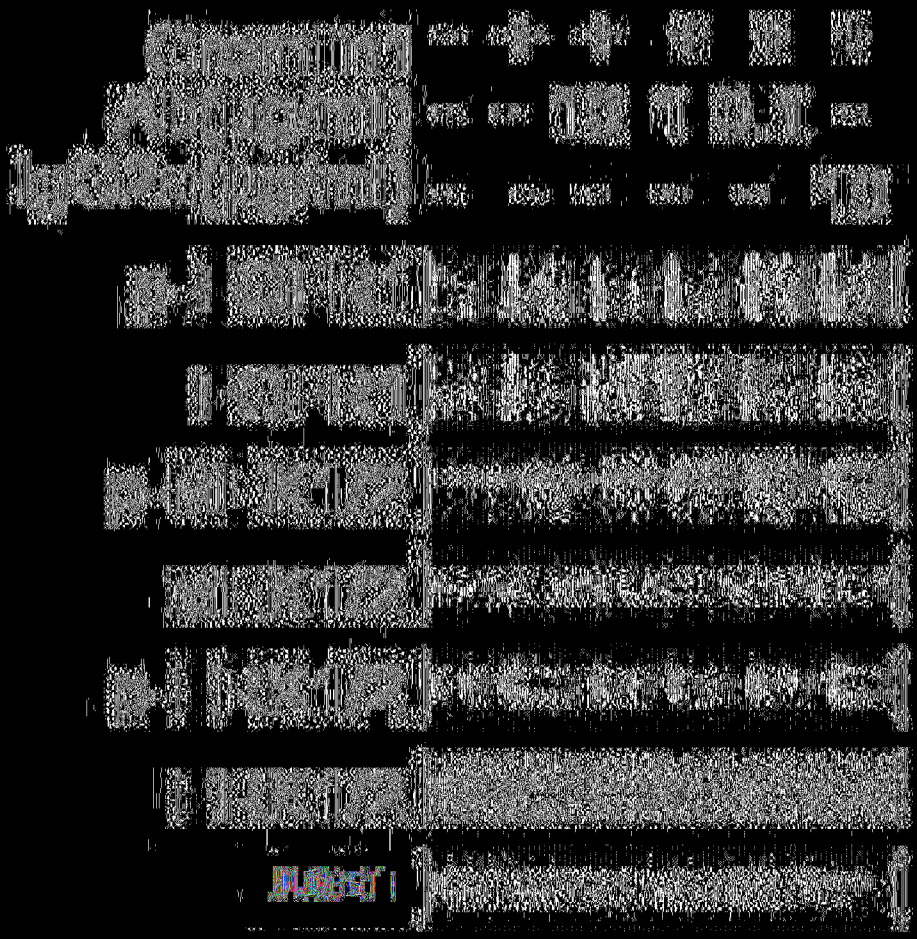


圖14C

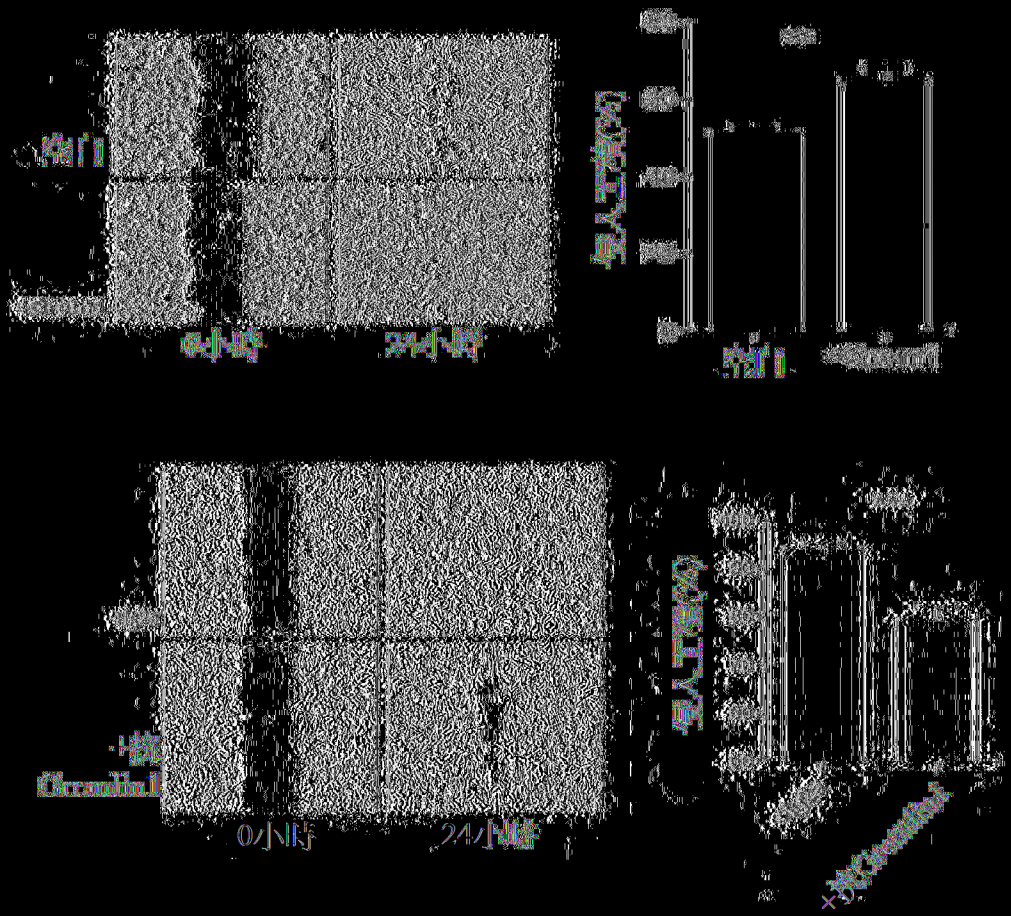


圖15

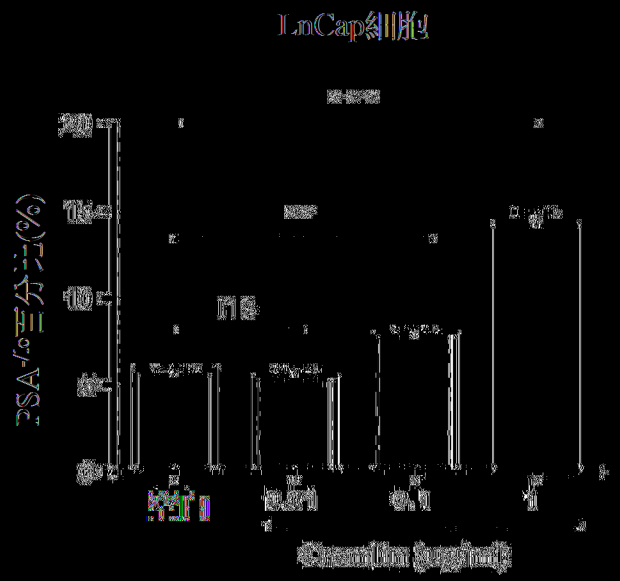

LnCap細胞
PSA/β三分之一(%)
對照
對照
Concentration (ng/ml)

圖16A

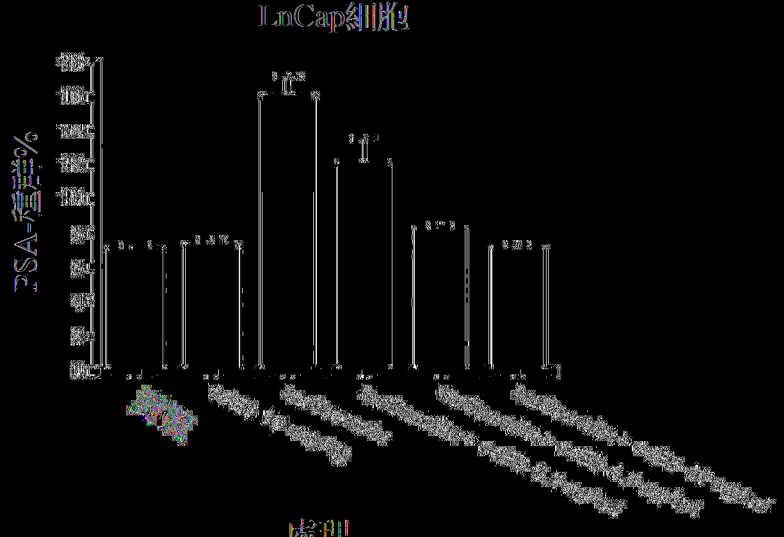

LnCap細胞
PSA-產生%
處理

圖16B

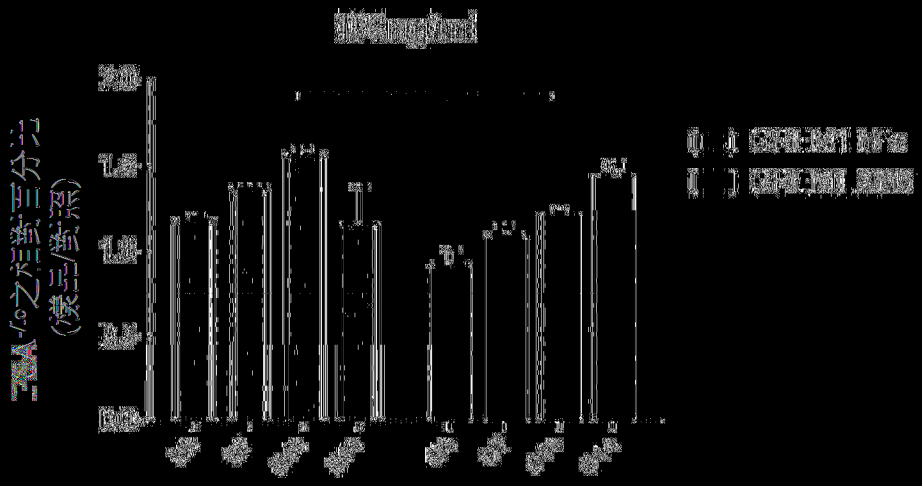


圖16C

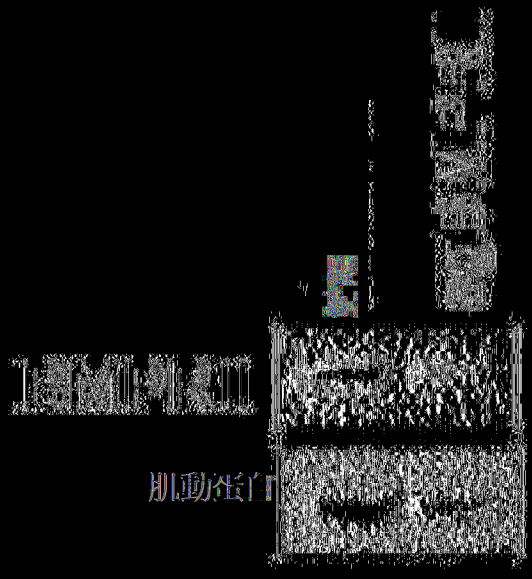


圖1-7A

圖1-7B

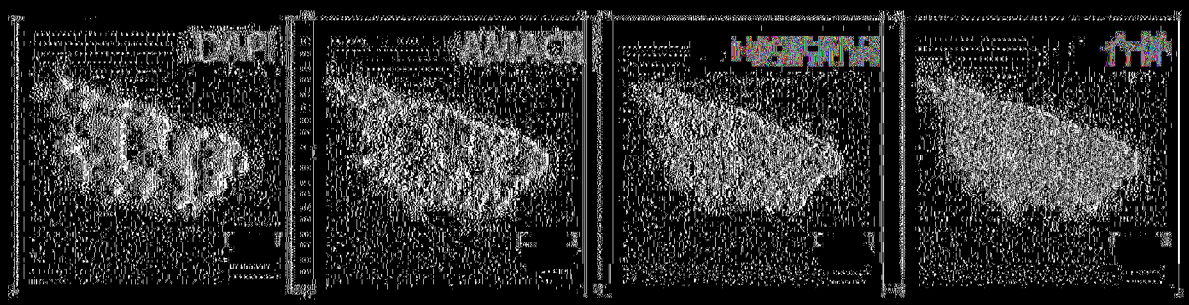


圖18A

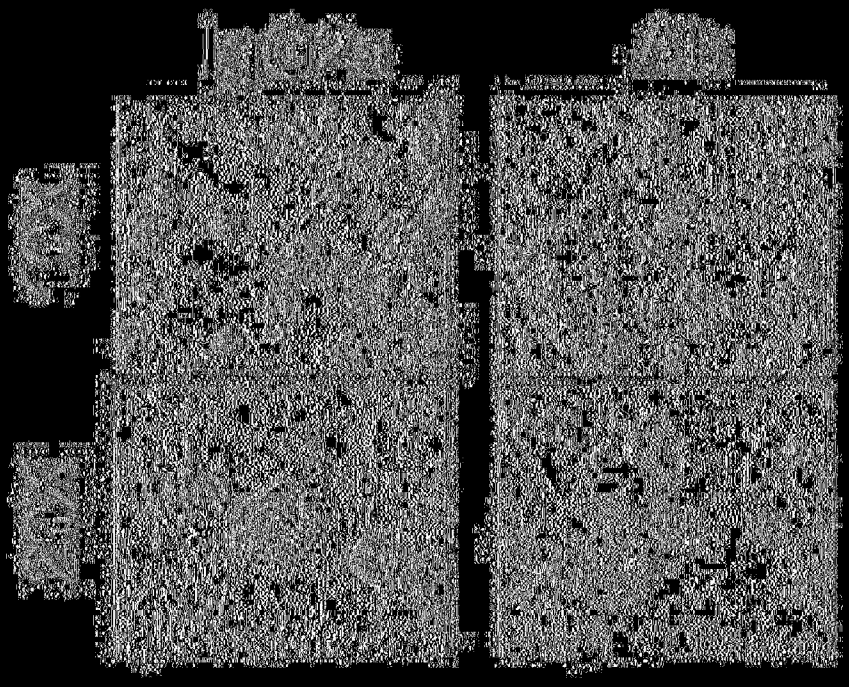


圖18B

簽分類
分局

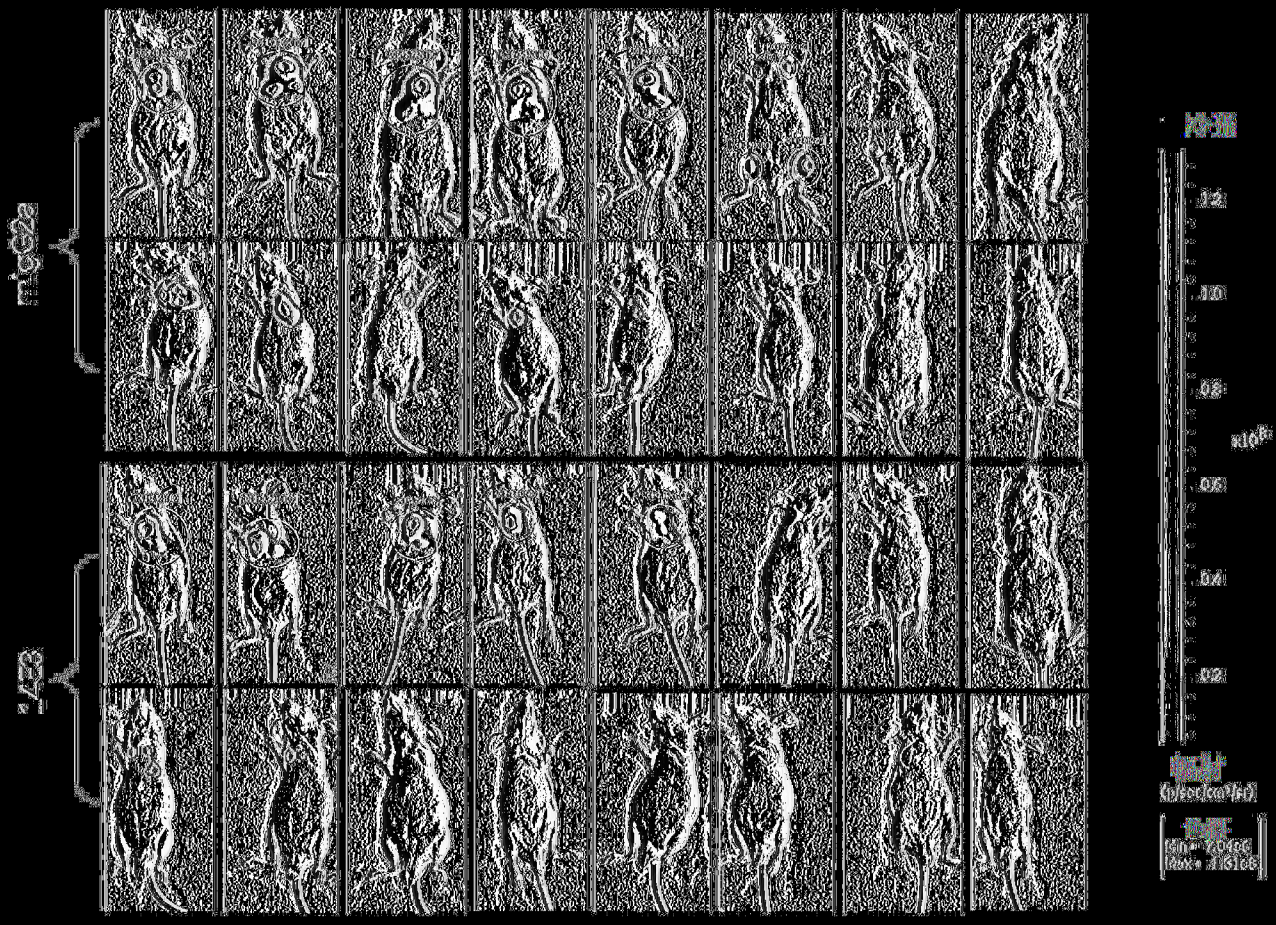
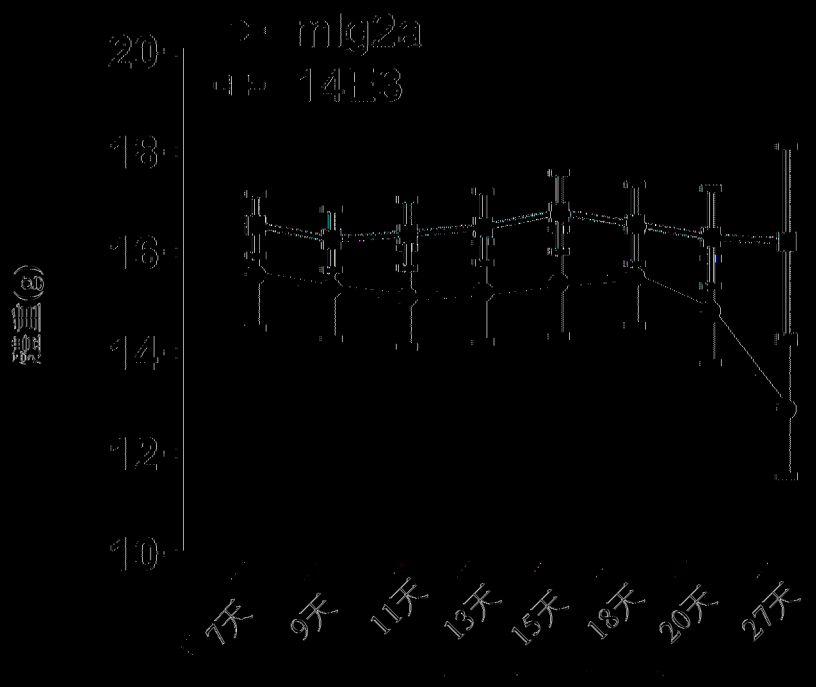
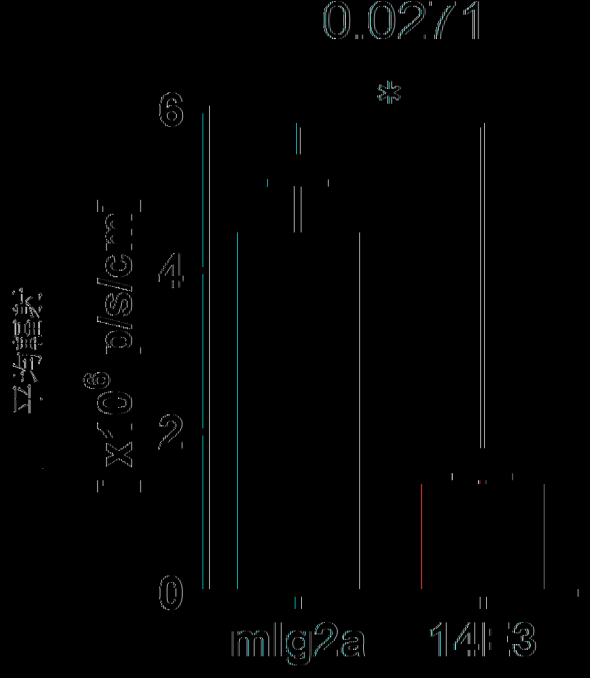


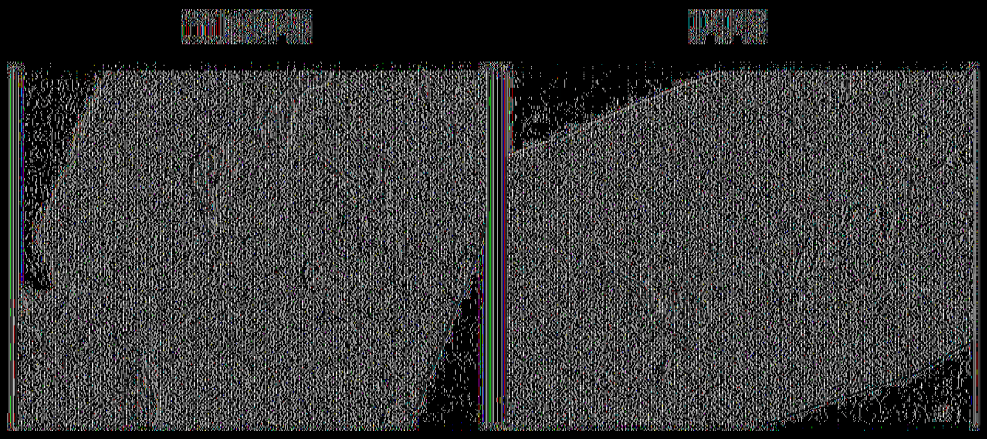
圖19A


mlg2a
1413
20
18
16
14
12
10
7天
9天
11天
13天
15天
18天
20天
27天

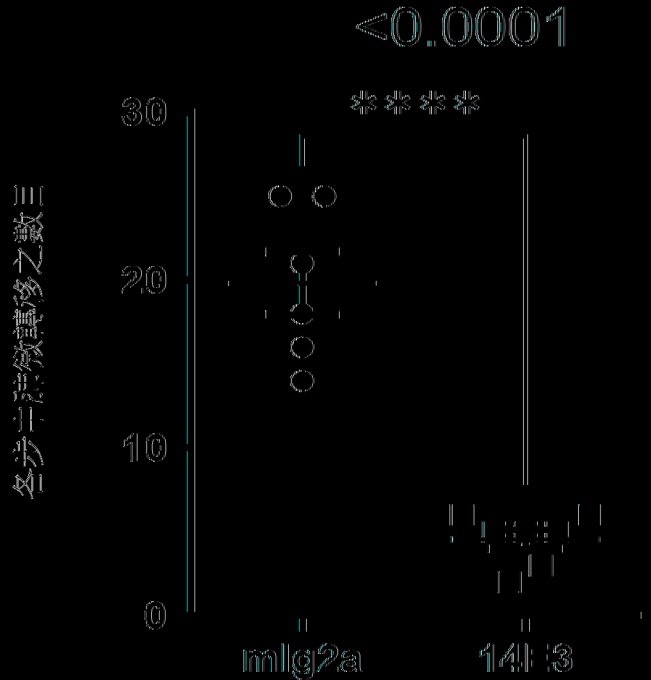
(圖19B)


0.02
1
6
4
2
0
mlg2a
1413

(圖19C)



（圖19D）



（圖19E）

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用GREM1拮抗劑治療疾病的方法

【英文發明名稱】

METHOD OF TREATING DISEASES USING GREMLIN1 ANTAGONISTS

【技術領域】

【0001】 本發明一般係關於一種使用GREM1拮抗劑治療GREM1相關疾病之新方法。

【先前技術】

【0002】 Gremlin1係BMP拮抗劑DAN家族中高度保守的分泌蛋白。據報導，其可以與BMP-2、BMP-4或BMP-7結合形成異二聚體，阻止BMP配體與相應的BMP受體相互作用，進而抑制BMP信號傳導之活化。Gremlin1為胚胎發生過程中之關鍵蛋白，與組織纖維化病變以及膠質瘤及結腸癌密切相關。然而，作為一種分泌蛋白，我們對Gremlin1之瞭解還遠遠不夠深入。除了BMP信號傳導通路外，Gremlin1是否藉由非BMP機制發揮作用尚未明確。

【0003】 因此，有必要探索Gremlin1靶向劑之新醫療用途。

【發明內容】

【0004】 在整個本發明中，冠詞「一(a/an)」及「該(the)」在本文中用於指一個(種)或多於一個(種) (亦即，至少一個(種))該冠詞之語法對象。舉例而言，「一抗體」意指一種抗體或多於一種抗體。

【0005】 一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療表現

GREM1之疾病或病症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中疾病或病症之特徵在於減弱的或被抑制的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0006】 在某些實施方式中，受試者正在接受或已經接受AR抑制劑。在某些實施方式中，疾病或病症對AR抑制劑具有抵抗性。

【0007】 在某些實施方式中，疾病或病症為AR相關之癌症(諸如前列腺癌、乳癌、膠質母細胞瘤、黑色素瘤、膀胱癌、腎細胞癌、胰臟癌、肝細胞癌、卵巢癌、子宮內膜癌、套細胞淋巴瘤或唾液腺癌)，或AR相關之非癌病症(諸如脫髮、痤瘡、多毛症、卵巢囊腫、多囊卵巢疾病、性早熟、脊髓及延髓肌肉萎縮或年齡相關黃斑變性)。

【0008】 一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療表現GREM1之癌症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中癌症之特徵在於減弱的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0009】 在一些實施方式中，癌症為表現AR之癌症或為AR陰性癌症。

【0010】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、睾丸癌、子宮內膜癌、卵巢癌及皮膚癌。

【0011】 在一些實施方式中，受試者正在接受或已經接受雄激素剝奪療法或耐雄激素剝奪療法。

【0012】 在一些實施方式中，癌症進一步確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0013】 在一些實施方式中，癌症為轉移性的。在一些實施方式中，癌症為轉移性前列腺癌。

【0014】 在一些實施方式中，癌症為癌症之肺轉移。在一些實施方式中，癌症為前列腺癌肺轉移。

【0015】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌。在一些實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0016】 在一些實施方式中，癌症之特徵在於GREM1過表現。

【0017】 一方面，本發明提供了一種在受試者中提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法敏感性的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【0018】 一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症或在有需要之受試者中抑制FGFR1活化或在有需要之受試者中抑制MAPK信號傳導之方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【0019】 在一些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於不存在功能性PTEN及/或p53。

【0020】 在一些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於在PTEN及/或p53中存在失活突變。

【0021】 在一些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於不存在PTEN及/或p53表現。

【0022】 在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症之特徵在於GREM1表現或過表現。

【0023】在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。

【0024】在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症為癌症。

【0025】在一些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌、膠質瘤、脂質肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【0026】在一些實施方式中，癌症為前列腺癌。

【0027】在一些實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0028】在一些實施方式中，癌症為乳癌。

【0029】在一些實施方式中，乳癌為三陰性乳癌。

【0030】在一些實施方式中，纖維化疾病為肺纖維化、皮膚纖維化、糖尿病性腎病或缺血性腎損傷。

【0031】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑降低GREM1水準或GREM1活性。

【0032】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑選擇性地降低癌細胞中而不是非癌細胞中之GREM1活性。

【0033】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗GREM1抗體或

其抗原結合片段、抑制性GREM1模擬肽、靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸、編碼抑制性核酸之多核苷酸、抑制gremlin及BMP之間相互作用的化合物、抑制GREM1活性之化合物。

【0034】在一些實施方式中，靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸包括短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA或反義寡核苷酸。

【0035】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑包括GREM1-FGFR1軸抑制劑。

【0036】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑抑制GREM1依賴性FGFR1信號傳導。

【0037】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑阻斷GREM1及FGFR1之間的結合。

【0038】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑包括FGFR1結合抑制劑。

【0039】在一些實施方式中，FGFR1結合抑制劑與FGFR1之胞外域2結合，並且視情況在包括殘基Glu 160之表位處與FGFR1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：75所示。

【0040】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑在包括殘基Lys 123及/或殘基Lys 124之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示；或者阻斷FGFR1與hGREM1之殘基Lys 123及/或殘基Lys 124結合。

【0041】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑或GREM1-FGFR1軸抑制劑包括抗hGREM1之抗體或其抗原結合片段。

【0042】在一些實施方式中，抗體包括以下特徵中之至少一者：a)能夠在癌細胞中而不是非癌細胞中選擇性地降低對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性；b)在非癌細胞中表現出對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性不超過50%的降低；c)能夠與包括SEQ ID NO：68所示胺基酸序列之嵌合hGREM1結合；d)能夠與hGREM1結合，但不與小鼠gremlin1特異性結合；e)在包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示，或與包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之hGREM1片段結合，視情況hGREM1片段具有至少3 (例如，4、5、6、7、8、9或10)個胺基酸殘基之長度；f)能夠降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之活化；及/或g)能夠根據Fortebio所量測的在不超過1 nM之KD處結合hGREM1。

【0043】在一些實施方式中，抗體包括線性表位或構象表位。

【0044】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中重鏈可變區包括：a)重鏈互補決定區1 (HCDR 1)包括選自由SEQ ID NO：1、11、21及31組成之群的序列，b) HCDR2包括選自由SEQ ID NO：2、12、22及32組成之群的序列，以及c) HCDR3包括選自由SEQ ID NO：3、13、23及33組成之群的序列，及/或其中輕鏈可變區包括：d)輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包括選自由SEQ ID NO：4、14、24及34組成之群的序列，e) LCDR2包括選自由SEQ ID NO：5、15、25及35組成之群的序列，以及f) LCDR3包括選自由SEQ ID NO：6、16、26及36組成之群的序列。

【0045】在一些實施方式中，重鏈可變區選自由以下組成之群：a)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ

ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；b)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；c)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；以及d)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3。

【0046】 在一些實施方式中，輕鏈可變區選自由以下組成之群：a)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；b)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；c)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；以及d)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0047】 在一些實施方式中，a)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；b)重鏈可變區包括：包括SEQ ID

NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；c)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；或者d)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0048】在一些實施方式中，重鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：45、SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0049】在一些實施方式中，輕鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：47、SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0050】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段包括：a)包括SEQ ID NO：7所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：8所示序列之輕鏈可變區；或b)包括SEQ ID NO：17所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：18所示序列之輕鏈可變區；或c)包括SEQ ID NO：27所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：28所示序列之輕鏈可變區；或d)包括SEQ ID NO：37所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：38所示序列之輕鏈可變區；或e)包括選自由SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43及SEQ ID NO：45組成之群的序列之重鏈可變區，及包括選自由SEQ ID NO：47及SEQ ID NO：49組成之群的序列之輕鏈可變區；或f)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：41/47、41/49、43/47、43/49、45/47及45/49組成之群；或g)重鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57組成之群的序列，以及輕鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61組成之群的序列；或h)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：51/59、51/61、53/59、53/61、55/59、55/61、57/59及57/61組成之群。

【0051】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段進一步包括一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留對GREM1之特異性結合特異性或親和力。

【0052】在一些實施方式中，至少一個取代或修飾為在CDR序列中之一或多者及/或VH或VL序列之非CDR區中之一或多者。

【0053】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段進一步包括免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或視情況人IgG之恆

定區。

【0054】 在一些實施方式中，恆定區包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【0055】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【0056】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩定化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0057】 在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙特異性的。

【0058】 一方面，本發明提供了一種抗體或其抗原結合片段，其能夠特異性結合gremlin之第一及第二表位或者能夠特異性結合hGREM1及第二抗原兩者。

【0059】 一方面，本發明提供了一種其抗原結合片段，其中第二抗原包括免疫相關靶標。

【0060】 一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中第二抗原包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、

IL-21、CD3、CD16或CD83。

【0061】一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中第二抗原包括腫瘤抗原。

【0062】一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中腫瘤抗原包括腫瘤特異性抗原或腫瘤相關抗原。

【0063】一方面，本發明提供了其抗原結合片段，其中腫瘤抗原包括前列腺特異性抗原(PSA)、CA-125、神經節苷酯G(D2)、G(M2)及G(D3)、CD20、CD52、CD33、Ep-CAM、CEA、鈴蟾素樣肽類、HER2/neu、表皮生長因子受體(EGFR)、erbB2、erbB3/HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、癌相關黏蛋白、VEGF、VEGFR (例如VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)、雌激素受體、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受體、EGFα、c-Kit受體、轉鐵蛋白受體、密封蛋白18.2、GPC-3、Nectin-4、ROR1、間皮素、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2或LIV-1。

【0064】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係不與鼠GREM1交叉反應的。

【0065】在一些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係與小鼠GREM1交叉反應的。

【0066】在一些實施方式中，方法亦包括投與治療有效量之第二治療劑。

【0067】在一些實施方式中，第二治療劑包括抗癌療法，視情況抗癌療法選自化療劑、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑(例如VEGFR

(諸如VEGFR-1、VEGFR-2及VEGFR-3)之拮抗劑)、靶向治療劑、細胞治療劑、基因治療劑、激素治療劑、細胞介素、安寧療護、用於治療癌症(例如腫瘤切除術)之手術、一或多種止吐藥、用於由化療引起之併發症之治療，或用於癌症患者之飲食補充劑(例如吲哚-3-甲醇)。

【0068】 在一些實施方式中，抗癌療法包括抗前列腺癌藥物，視情況雄激素剝奪療法。

【0069】 在一些實施方式中，抗前列腺癌藥物包括：雄激素軸抑制劑；雄激素合成抑制劑；PARP抑制劑；或其組合。

【0070】 在一些實施方式中，雄激素軸抑制劑選自由促黃體激素釋放激素(LHRH)促效劑、LHRH拮抗劑及雄激素受體拮抗劑組成之群。

【0071】 在一些實施方式中，雄激素軸抑制劑為地加瑞克、比卡魯胺、氟他胺、尼魯米特、阿帕魯胺、達洛魯胺、恩雜魯胺或阿比特龍。

【0072】 在一些實施方式中，抗前列腺癌藥物選自由以下組成之群：醋酸阿比特龍酯、阿帕魯胺、比卡魯胺、卡巴他賽、康士得(比卡魯胺)、達洛魯胺、地加瑞克、多西他賽、Eligard (醋酸亮丙瑞林)、恩雜魯胺、厄利達(阿帕魯胺)、費蒙格(地加瑞克)、氟他胺、醋酸戈舍瑞林、組胺瑞林(Vantas)、Jevtana (卡巴他賽)、醋酸亮丙瑞林、立普安(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot (醋酸亮丙瑞林)、利普卓(奧拉帕利)、酮康唑(里素勞)、鹽酸米托蒽醌、Nilandron (尼魯米特)、尼魯米特、Nubeqa (達洛魯胺)、奧拉帕尼、普列威(Sipuleucel-T)、鐳223二氯化物、瑞格列克(Orgovyx)、Rubraca (瑞卡帕布樟腦磺酸鹽)、瑞卡帕布樟腦磺酸鹽、Sipuleucel-T、泰素帝(多西他賽)、曲普瑞林(Trelstar)、多菲戈(鐳223二氯化物)、安可坦(恩雜魯胺)、諾雷得(醋酸戈舍瑞林)及Zytiga (醋酸阿比

特龍酯)。

【0073】 一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有癌症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性之方法，包括：(a)偵測來自受試者之生物樣品中之雄激素受體(AR)表現或信號傳導，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的AR表現或信號傳導來確定回應之可能性。

【0074】 在一些實施方式中，受試者當偵測到受試者不存在AR表現或信號傳導或者被偵測為具有相對於參考水準降低之AR表現或信號傳導時確定為具有對GRME1拮抗劑回應之可能性。

【0075】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測來自受試者之生物樣品中之GREM1表現。

【0076】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現時，確定受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0077】 一方面，本發明提供了一種偵測經確定為不存在AR表現或經確定為具有減弱的雄激素受體(AR)信號傳導之樣品中GREM1存在或含量的方法，包括使樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定樣品中之GREM1之存在或含量。

【0078】 一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有疾病或病症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性之方法，包括：(a)偵測來自受試者之生物樣品中之PTEN及/或p53之缺乏，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的PTEN及/或p53之缺乏來確定回應之可能性。

【0079】 在一些實施方式中，當偵測到受試者缺乏PTEN及/或p53時，確定受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0080】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測GREM1在來自受試

者之生物樣品中之表現。

【0081】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現時，確定受試者具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0082】 一方面，本發明提供了一種偵測經確定為缺乏PTEN及/或p53之樣品中之GREM1之存在或含量的方法，包括使樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定樣品中之GREM1之存在或含量。

【0083】 在一些實施方式中，樣品係自患有或疑似患有GREM1相關疾病或病症之受試者獲得的。

【0084】 在一些實施方式中，GREM1相關疾病或病症為癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓或骨關節炎(OA)。

【0085】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌、神經膠質瘤、脂質體肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【0086】 在一些實施方式中，癌症為前列腺癌或乳癌，其中前列腺癌為：a)抗雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，及/或b)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)之水準。

【0087】 在一些實施方式中，方法亦包括向經確定為具有回應之可能性的受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【圖式簡單說明】

【0088】

圖1A顯示在雄激素敏感性PCa (HSPC) (n=474)及去勢抵抗性前列腺癌(CRPC) (n=60)中Gremlin1之免疫組織化學染色圖像。示出了具有代表性之圖像。比例尺=100 μm。

圖1B顯示CRPC中GREM1染色強度顯著高於HSPC。採用Aperio ScanScope軟體分析細胞質H評分。

圖1C顯示在CRPC中PSA及Gremlin1免疫組織化學染色圖像。比例尺=200 μm。

圖1D顯示在LNCaP細胞中藉由由R1881 (1 nM)活化AR下調*GREM1* mRNA轉錄，並且由恩雜魯胺(10 μg/ml)抑制AR顯著升高該轉錄。

圖1E顯示在LNCaP細胞中藉由由R1881 (1 nM)活化AR下調Gremlin1蛋白水準，並且由恩雜魯胺(10 μg/ml)抑制AR顯著升高該水準。

圖1F顯示在LNCaP細胞中藉由由R1881 (1 nM)活化AR下調*GREM1*啟動子驅動之螢光素酶活性，並且由恩雜魯胺(10 μg/ml)抑制AR顯著提高該活性。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖1G顯示染色質免疫沈澱(ChIP)偵測結果，表明經R1881或恩雜魯胺處理後，在LNCaP細胞中針對Gremlin1啟動子之AR富集水準。Enz：恩雜魯胺。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖1H顯示Gremlin1表現較高之PCa患者總生存期較短(p<0.05)。

圖1I顯示與Pbsn-Cre4；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$小鼠(n=3)之其他器官相比，在前列腺癌組織中GREM1表現水準最高。

圖2A顯示與親本LNCaP細胞相比，LNCaP去勢抵抗性細胞(LNCaP-

R)中Gremlin1之表現水準較高。

圖2B顯示在*AR*過表現LNCaP細胞中*GREM1*表現之免疫墨點分析。

圖2C顯示在*AR*過表現LNCaP細胞中*GREM1*表現之q-PCR分析。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖2D顯示在*AR*敲除LNCaP細胞中*GREM1*表現之免疫墨點分析。

圖2E顯示在*AR*敲除LNCaP細胞中*GREM1*表現之q-PCR分析。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖3A顯示免疫墨點證實了在PC3細胞中*GREM1*敲除或*GREM1*過表現之效能。

圖3B顯示在PC3細胞中*GREM1*敲除導致抑制球形成能力，而*GREM1*過表現或添加外源的Gremlin1蛋白則表現出促進作用。實驗重複三次進行。

圖3C顯示在PC3細胞中*GREM1*敲除導致抑制細胞增殖，而*GREM1*過表現或添加外源的Gremlin1蛋白則表現出促進作用。實驗重複三次進行。

圖3D顯示*GREM1*敲除增加PC3細胞中之細胞凋亡。

圖3E顯示在體內*GREM1*敲除抑制PC3異源移植體之生長。

圖3F顯示在體內*GREM1*過表現促進PC3異源移植體之形成發生率及腫瘤之生長。比例尺=1 cm。

圖3G顯示免疫墨點法證實在Himyc小鼠PCa衍生之類器官中*Grem1*過表現。

圖3H顯示Gremlin1促進Himyc PCa類器官中類器官之形成及雄激素

剝奪療法(ADT)之耐受性。(採用雙尾學生t檢驗及雙向ANOVA分析進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖4A顯示免疫墨點證實了在LNCaP細胞中*GREM1*敲除及過表現之效能。

圖4B顯示在LNCaP細胞中*GREM1*敲除抑制球形成能力，而過表現*GREM1*或外源添加Gremlin1蛋白則有相反的作用。

圖4C顯示在雄激素剝奪療法、ADT、雄激素阻斷療法下Gremlin1促進LNCaP PCa細胞之生長。實驗重複三次進行。

圖4D顯示在雄激素剝奪療法中*GREM1*敲除增加LNCaP細胞中之細胞凋亡。在經ADT治療之LNCaP細胞中，*GREM1*表現及添加外源的Gremlin1蛋白抑制LNCaP細胞中之細胞凋亡。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖5A顯示免疫墨點證實了在LAPC4細胞中*GREM1*過表現之效能。

圖5B顯示Gremlin1增強LAPC4之球形成。

圖5C顯示在ADT治療下Gremlin1促進LAPC4細胞之生長。

圖5D顯示在恩雜魯胺治療下*GREM1*過表現防止細胞死亡，上述恩雜魯胺治療之特徵在於降低的膜聯蛋白V/PI染色。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖6A顯示RNA-seq資料之基因集富集分析表明FGFR1及MAPK信號傳導通路為在*GREM1*過表現LNCaP亞系中最豐富的信號傳導通路。

圖6B顯示RNA-seq資料之基因集富集分析表明FGFR1及MAPK信號傳導通路為在*GREM1*過表現LNCaP亞系中最豐富的信號傳導通路。

圖6C顯示FGFR/MEK/ERK信號傳導通路被PC3細胞及LNCaP耐藥細胞中Gremlin1蛋白活化並呈劑量依賴關係。FGF (20 ng/ml)用作刺激FGFR之陽性對照。

圖6D顯示由Gremlin1對MEK/ERK信號傳導通路之活化不依賴於BMP4。在存在BMP4 (20 ng/ml)或不存在BMP4之情況下用Gremlin1蛋白處理PC3細胞及LNCaP耐藥細胞。

圖6E顯示在PC3細胞中，與FGF (20 ng/ml)相比，Gremlin1 (100 ng/ml)處理導致FGFR/MEK/ERK信號傳導活化之延長刺激。

圖6F顯示在LNCaP細胞中，與FGF (20 ng/ml)相比，Gremlin1 (100 ng/ml)處理導致對FGFR/MEK/ERK信號傳導活化之延長刺激。

圖6G顯示由CRISPR/Cas9介導之*FGFR1*敲除取消FGFR/MEK/ERK信號傳導通路之活化。

圖6H顯示Gremlin1藉由FGFR活化MEK/ERK信號傳導通路，其中如此圖所示用Gremlin1 (100 ng/ml)、FGF1 (20 ng/ml)或FGFR1/2/3抑制劑BGJ398 (1 μM)處理PC3及LNCaP耐藥細胞。

圖6I顯示Gremlin1對MEK/ERK信號傳導通路之活化不依賴於EGFR，其中如此圖所示用Gremlin1 (100 ng/ml)、EGF (20 ng/ml)或EGFR抑制劑厄洛替尼(1 μM)處理PC3及lncap耐藥細胞。

圖7A顯示與親本AR依賴性LNCaP細胞相比，LNCaP去勢抵抗性細胞(LNCaP R)表現出對FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之強烈活化。

圖7B顯示與對照之類器官相比，在*GREM1*過表現鼠*HiMyc* PCa類器

官中FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路上調。

圖8A顯示Gremlin1蛋白對LNCaP細胞增殖(n=6)之促進作用被FGFR1或MEK抑制劑消除，但不受添加BMP4之影響，其中BGJ398為一種FGFR1抑制劑，且曲美替尼為一種MEK抑制劑。

圖8B顯示Gremlin1蛋白對球形成之促進作用(n=3)被FGFR1或MEK抑制劑消除，但不受添加BMP4之影響，其中BGJ398為一種FGFR1抑制劑，且曲美替尼為一種MEK抑制劑。

圖8C顯示LNCaP細胞中*FGFR1*敲除效能之免疫墨點結果。

圖8D顯示*FGFR1*敲除顯著減弱Gremlin1對LNCaP細胞增殖之積極作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖8E顯示*FGFR1*敲除顯著減弱了Gremlin1對球形成之積極作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖9A顯示FGFR1與固定在鏈黴親和素感測器(ForBio)上之Gremlin1-生物素結合(Kd=1.06E-8M)。

圖9B顯示Z-dock模擬之Gremlin1及FGFR1胞外域之蛋白結構預測相互作用(http://zdock.umassmed.edu/)。蛋白結構由PDB生成(http://www.rcsb.org/)。Gremlin1:5AEJ；FGFR1:3ojv。

圖9C顯示採用flag標記之Gremlin1及HA標記之FGFR1表現質體轉染之293T細胞及LNCaP耐藥細胞中Gremlin1與FGFR1免疫共沈澱。

圖9D顯示LNCaP耐藥細胞中內源性Gremlin1與FGFR1免疫共沈澱。

圖9E顯示藉由酶聯免疫吸附測定法(ELISA)量測，Gremlin 1而非

Gremlin 2或DAN蛋白家族之其他成員與FGFR1結合。

圖9F顯示純化後的Gremlin1與可溶性FGFR1蛋白之相互作用係藉由下拉實驗證明的。

圖9G顯示可溶性FGFR1競爭性地抑制PC3中Gremlin1對FGFR1/MEK/ERK信號傳導之活化。

圖9H顯示BiFC測定表明在LNCaP耐藥細胞中Gremlin1及FGFR1之間的共定位。

圖9I顯示LNCaP-R細胞中Gremlin1及FGFR1之免疫螢光染色圖像。用Gremlin1 (100 ng/ml)或PBS在37℃下處理細胞10分鐘。

圖9J顯示經截短之FGFR1之圖。

圖9K顯示經截短之FGFR1及Gremlin1 (左圖)或FGF1 (右圖)之Co-IP測定結果。

圖9L顯示Gremlin1之誘變策略。點突變以粗體及下劃線表示。

圖9M顯示Gremlin1 K123A-K124A突變體破壞Gremlin1及FGFR1之間的免疫共沈澱，其中編號對應於SEQ ID NO：69。

圖9N顯示FGFR1突變之示意圖。點突變以粗體及下劃線表示。

圖9O顯示FGFR1及Gremlin1之共免疫沈澱受到FGFR1 E160A突變之損害。

圖9P顯示FGFR1突變之示意圖。

圖9Q顯示FGFR1-C176G或FGFR1-R248Q突變消除FGF1及FGFR1之間的共免疫沈澱(左圖)，但不影響Gremlin1及FGFR1之間蛋白複合物之形成(右圖)。

圖9R至圖9U顯示添加FGF1不會影響Gremlin1及FGFR1之間的結

合，反之亦然，此係藉由Fortebio (R)、共免疫染色(S)及下拉(T、U)測定發現的。

圖9V顯示對接模組，該模組突出了Gremlin1及FGFR1之間結合袋中之關鍵胺基酸殘基。

圖10A顯示酶聯免疫吸附測定法驗證了抗鼠Gremlin1抗體對Gremlin1之結合特異性。在此圖中Ab為抗鼠Gremlin1。

圖10B顯示Gremlin1在去勢的*Pbsn-Cre4*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$鼠PCa模型中高度表現。示出了具有代表性的Gremlin1免疫染色圖像。

圖10C顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PCa之生長具有顯著的抑制作用。總的腫瘤外觀上發現有顯著抑制性。

圖10D顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PCa之生長具有顯著的抑制作用。腫瘤總重量上發現有顯著抑制性。

圖10E顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PCa之生長具有顯著的抑制作用。PCNA陽性細胞數目顯著減少，發現有顯著抑制性。

圖10F顯示抗Gremlin1治療顯著抑制去勢的*Pbsn-Cre4*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$小鼠中侵入性PCa之進展。

圖10G及圖10H顯示基因集富集分析表明抗Gremlin1治療組前列腺中FGFR信號傳導通路受到顯著抑制。

圖10I及圖10J顯示免疫染色及免疫墨點分析表明抗Gremlin1抗體對*Pbsn-Cre*；$PTEN^{fl/fl}$；$Trp53^{fl/fl}$小鼠前列腺中FGFR1/MAPK信號傳導通路具有抑制作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖10K顯示抗Gremlin1抗體(100 ng/ml)促進藉由恩雜魯胺(10 μg/ml)

對體外細胞增殖之抑制(n=3)。

圖10L顯示抗Gremlin1療法抑制LNCaP-R細胞球形成能力(n=3)。

圖10M顯示LNCaP-R細胞中FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化被Gremlin1抗體抑制。

圖10N顯示膜聯蛋白-V/DAPI染色證明抗Gremlin1抗體表現出與恩雜魯胺誘導細胞死亡之協同效應。Ab：抗人Gremlin1。ADT：採用恩雜魯胺10 μg/ml治療。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖10O顯示對*Pbsn-Cre4*；*PTEN*$^{fl/fl}$；*Trp53*$^{fl/fl}$ GEMM治療之示意圖。在2個月時去勢的小鼠接受抗Gremlin1抗體(腹腔內，10 mg/kg)或IgG，如本文所示，每週三次，持續2個月。

圖11A顯示在去勢的*Pbsn-Cre*；*PTEN*$^{fl/fl}$；*Trp53*$^{fl/fl}$ PCa中，Gremlin主要由上皮細胞表現。ECAD：E鈣黏附素；VIM：波形蛋白。

圖11B顯示當向小鼠(10 mg/kg，每週兩次)全身投與時，Gremlin1抗體治療不會引起嚴重的副作用。在接受抗體治療之小鼠中，外周血細胞計數未發現明顯變化。Ab：抗mGREM1抗體。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖11C顯示當向小鼠(10 mg/kg，每週兩次)全身投與藥時，Gremlin1抗體治療不會引起嚴重的副作用。在接受抗體治療的小鼠之主要器官未偵測到明顯的改變。Ab：抗mGREM1抗體。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖12A顯示藉由酶聯免疫吸附測定法驗證了抗人Gremlin1 (14E3)對Gremlin1之結合特異性。在此圖中Ab為抗人Gremlin1。

圖12B顯示抗人Gremlin1抗體(10 ug/ml)抑制PC3細胞之細胞增殖。

圖12C顯示抗Gremlin1抗體(10 ug/ml)對PC3細胞之球形成具有抑制作用。

圖12D顯示Gremlin1抗體以劑量依賴之方式中和PC3細胞中Gremlin1蛋白對FGFR1/MEK/ERK信號傳導之活化。

圖12E及圖12F顯示在一系列傳代實驗中抗Gremlin1治療顯著阻礙PC3腫瘤異源移植體之體內生長。在指定的時間點(見箭頭)以10 mg/kg腹腔內注射抗體。

圖13顯示使用14E3之治療減小PC3 CRPC模型之腫瘤體積並且提高生存率。

圖14A顯示抗Gremlin1抗體(100 ng/ml)促進藉由恩雜魯胺(1 ug/ml)對體外細胞增殖之抑制。

圖14B顯示抗Gremlin1治療抑制LNCaP細胞球形成能力。

圖14C顯示LNCaP細胞中FGFR1/MEK/ERK信號傳導之活化被Gremlin1抗體抑制。

圖14D顯示膜聯蛋白-V/DAPI染色證明抗Gremlin1抗體表現出與恩雜魯胺誘導細胞死亡之協同效應。Ab：抗人Gremlin1 14E3。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖15顯示14E3降低了對癌細胞遷移之GREM1介導之促進作用。

圖16A至圖16C顯示14E3降低了GREM1介導之低PSA群體百分比之

增加，而不依賴於BMP結合環區。

圖17A顯示免疫墨點證實了在LNCaP細胞中BMPRII敲除之效能。

圖17B及圖17C顯示*BMPRII*敲除對Gremlin1抗體對LNCaP細胞增殖及球形成之抑制作用沒有顯著影響。Ab：抗人Gremlin1 14E3。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖18A顯示AMCAR及DAPI之免疫螢光染色表明患者來源之類器官之腫瘤來源。

圖18B及圖18C顯示類器官尺寸及數目之減少表明抗Gremlin1 14E3抗體對PDO之形成及生長具有抑制作用。(採用雙尾學生t檢驗進行統計分析。*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001。資料以平均值±SEM表示。)

圖18D顯示該患者來源之類器類實驗中使用的患者樣品之詳細資訊。

圖19A顯示分別來自對照組(mIgG2a)及實驗組(14E3)之每隻小鼠模型的腫瘤熱圖圖像。對照組及實驗組各16隻小鼠。

圖19B顯示在PCa轉移小鼠模型研究中，抗Gremlin1之抗體(例如14E3)對體重沒有明顯影響。

圖19C顯示在PCa轉移小鼠模型研究中，使用Gremlin1抗體治療後平均輻射強度降低。

圖19D顯示肺組織切片圖像，箭頭表示肺中之轉移位點。

圖19E顯示在PCa轉移小鼠模型研究中，肺中之微轉移數的統計資訊。

【實施方式】

【0089】 以下對本發明之描述僅旨在說明本發明之各種實施方式。因此，所論述的具體修改不應解釋為對本發明範疇之限制。對熟習此項技術者將顯而易見的是，可以在不脫離本發明範疇的情況下作出各種等效物、變化及修改，並且應理解，此等等效實施方式將包含在本文中。本文引用之所有參考文獻，包含出版物、專利及專利申請，均以全文引用之方式併入本文中。

【0090】

定義

在本發明上下文中使用之術語「一(a)」、「一個(an)」、「該(the)」以及類似術語(特別是在申請專利範圍之上下文中)，除非本文中另有說明或與上下文明顯矛盾，否則應解釋為包括單數及複數。

【0091】 關於本文提供之生物標誌物(諸如AR、PTEN及/或p53)使用的術語「失活突變」指突變或轉錄後修飾，其導致生物標誌物(諸如AR、PTEN及/或p53)之基因或基因產物之功能或活性的至少部分(或完全的)損失，或者導致沒有功能的基因或基因產物。例如，生物標誌物之受影響的基因或基因產物之活性將顯著低於野生型對應物，或甚至被消除。失活突變可以為易位、基因內染色體斷裂、倒置、缺失(例如，雙對偶基因缺失、雜合或純合拷貝數缺失)、微拷貝數改變、插入、替換、異常剪接或其任何組合，這降低生物標誌物之生物活性。在某些實施方式中，多核苷酸序列之插入或刪除可能導致讀框移位，從而改變密碼子之閱讀框架，並導致轉譯後之基因產物與原基因完全不同。此經常會產生截短蛋白，該截短蛋白導致功能喪失。

【0092】 如本文所用，術語「缺失」，當用作一種生物標誌物之失

活突變時，指一種突變，其中自一個多核苷酸序列丟失或刪除一或多個核鹼基對，或其中自多肽序列中刪除一或多個胺基酸殘基。例如，其可以指生物標誌物之整個編碼區或其一部分之刪除、丟失或移除。

【0093】 如本文所用，「取代」指在多核苷酸序列中將一個核鹼基替換為另一個核鹼基，或在多肽序列中將一個胺基酸殘基替換為另一個胺基酸殘基之突變。在多核苷酸序列中之取代可以：1)將一個密碼子修改為一個編碼不同胺基酸殘基之密碼子，因此會導致產生的蛋白之胺基酸序列之變化，或2)修改為一個編碼相同的胺基酸殘基之密碼子，由此造成產生的蛋白沒有變化；或者3)將一個胺基酸編碼密碼子修改為一個單一的「終止」密碼子，並且導致不完全蛋白(不完全蛋白通常係無功能的)。

【0094】 如本文所用，「插入」為一種突變，其中一或多個額外的鹼基對插入到一個多核苷酸序列之某個位置，或其中一或多個胺基酸殘基插入到一個多肽序列。

【0095】 如本文所用，「易位」指由於兩個非同源染色體之間的遺傳物質交換導致的一種染色體異常。易位可為平衡的或不平衡的；平衡的易位導致沒有物質之增加或損失，而不平衡的易位可以導致特定染色體片段之三體或單體。染色體易位通常出現在白血病中，如例如急性髓性白血病。

【0096】 關於生物標誌物(諸如AR、PTEN及/或p53)之術語「水準」指樣品中存在的相關生物標誌物之量或數目。該量或數目可以用絕對值表示，亦即生物標誌物在樣品中之總數目，或者以相對值表示，亦即生物標誌物在樣品中之濃度或百分比。可以在DNA水準(例如，以在染色體區域中基因之量或數目或拷貝數表示)、在RNA水準(例如，以mRNA量或

數目表示)，或在蛋白水準(例如，以蛋白或蛋白複合物之量或數目)量測生物標誌物之水準。

【0097】 如本文所用，關於生物標誌物之術語「參考水準」指允許比較的基準水準。參考水準可以由熟習此項技術者根據所需目的來選擇。確定適當參考水準之方法對熟習此項技術者而言係已知的，例如，參考水準可以根據經驗、現有知識或自臨床研究中收集之資料來確定。

【0098】 如本文所用，關於生物標誌物之術語「陰性」指生物標誌物在偵測樣品中呈陰性或不存在。例如，在測試樣品中呈陰性的生物標誌物可以與缺乏此種生物標誌物之樣品中之陰性對照水準具有可比的或不可區分的水準，或者，可以具有低於定義存在或陽性結果之臨限值水準的水準。

【0099】 如本文所用，關於受試者對治療產生反應之「可能性」及「可能」為對治療反應發生在受試者身上之可能性的量測。其可以與「概率」互換使用。可能性指一種大於猜測但小於確定性的概率。因此，若一個理性的人利用常識、訓練或經驗得出結論：在給定的情況下，治療反應係可能的，則治療反應係可能發生的。

【0100】 術語「受益於」或「反應性」，正如在療法之上下文中所使用的(例如，使用GREM1拮抗劑治療)，指對療法有益或有利的反應，而非不利的反應亦即不良事件。

【0101】 如本文所使用之術語「抗體」包含與特異性抗原結合之任何免疫球蛋白、單株抗體、多株抗體、多價抗體、二價抗體、單價抗體、多特異性抗體或雙抗體。天然完整抗體包括兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈。哺乳動物重鏈分為α、δ、ε、γ及μ，每個重鏈由一個可變區(V_H)及第一、

第二及第三恆定區(分別地C_{H1}、C_{H2}、C_{H3})組成；哺乳動物輕鏈分為λ及κ，每個輕鏈由可變區(V_L)及恆定區組成。抗體呈「Y」形，其中Y之主幹由藉由二硫鍵結合在一起的兩條重鏈之第二及第三恆定區組成。Y之每個臂包含與單條輕鏈之可變區及恆定區結合的單條重鏈之可變區及第一恆定區。輕鏈及重鏈之可變區負責抗原結合。兩條鏈之可變區通常含有三個高度可變的環區，稱為互補決定區(CDR) (輕鏈CDR包含LCDR1、LCDR2及LCDR3，重鏈CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文所揭示之用於抗體及抗原結合域之CDR邊界可以藉由Kabat、IMGT、AbM、Chothia或Al-Lazikani之約定來定義或確定(Al-Lazikani, B.、Chothia, C.、Lesk, A. M.之《分子生物學雜誌(J. Mol. Biol.)》，273(4), 927 (1997)；Chothia, C.等人之《分子生物學雜誌》，12月5日；186(3):651-63 (1985)；Chothia, C.及Lesk, A.M.之《分子生物學雜誌》，196,901 (1987)；N. R. Whitelegg等人之《蛋白工程(Protein Engineering)》，v13(12), 819-824 (2000)；Chothia, C.等人之《自然(Nature)》，12月21日-28日；342(6252):877-83 (1989)；Kabat E.A.等人，馬里蘭州貝塞斯達國立衛生研究院(1991)；Marie-Paule Lefranc等人之《發育與比較免疫學(Developmental and Comparative Immunology)》，27: 55-77 (2003)；Marie-Paule Lefranc等人之《免疫組研究(Immunome Research)》，1(3), (2005)；Marie-Paule Lefranc之《B細胞分子生物學(Molecular Biology of B cells)》(第二期)，第26章481-514, (2015))。三個CDR在稱為框架區(FR)之側翼延段之間插入，框架區與CDR相比更高度保守，並且形成支撐高變環區之支架。重鏈及輕鏈之恆定區不參與與抗原結合，但表現出各種效應子功能。基於抗體重鏈恆定區之胺基酸序列，將抗體分類。抗體之

五種主要類別或同種型為IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其特徵在於分別存在α、δ、ε、γ及μ重鏈。將幾個主要抗體類別劃分為亞類，諸如IgG1 (γ1重鏈)、IgG2 (γ2重鏈)、IgG3 (γ3重鏈)、IgG4 (γ4重鏈)、IgA1 (α1重鏈)或IgA2 (α2重鏈)。在某些實施方式中，本文提供之抗體涵蓋其任何抗原結合片段。

【0102】 如本文所用，術語「抗原結合片段」指由包括一或多個CDR之抗體片段或任何其他與抗原結合但不包括完整的天然抗體結構之抗體部分形成之抗體片段。抗原結合片段之實例包含但不限於雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩定化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。抗原結合片段能夠與親本抗體所結合之相同抗原結合。在某些實施方式中，抗原結合片段可以包括來自特定親本抗體之一或多個CDR。

【0103】 關於抗體之「Fab」指抗體之單價抗原結合片段，該抗體由單條輕鏈(可變區及恆定區兩者)藉由二硫鍵與單條重鏈之可變區及第一恆定區結合而形成。Fab可以藉由木瓜蛋白酶消化在接近鉸鏈區之重鏈之間二硫鍵的N端之殘基處的抗體獲得。

【0104】 「Fab'」指包含鉸鏈區一部分之Fab片段，其可以藉由胃蛋白酶消化在接近鉸鏈區重鏈之間的二硫鍵C端之殘基的抗體獲得，因此其在鉸鏈區少數殘基(包含一或多個半胱胺酸)中與Fab不同。

【0105】 「$F(ab')_2$」指Fab'之二聚體，包括兩條輕鏈及部分之兩條重鏈。

【0106】 關於抗體之「Fv」指最小的帶有完整抗原結合位點之抗體片段。Fv片段由結合於單條重鏈之可變區的單條輕鏈之可變區組成。「dsFv」指二硫穩定化Fv片段，其中在單條輕鏈之可變區與單條重鏈之可變區之間的鍵為二硫鍵。

【0107】 「單鏈Fv抗體」或「scFv」指一種由一個輕鏈可變區及一個重鏈可變區直接相互連接或藉由肽連接序列連接(Huston JS等人之《美國國家科學院院刊(*Proc Natl Acad Sci USA*)》，85:5879(1988))之工程化抗體。「scFv二聚體」指包括具有連接子的兩個重鏈可變區及兩個輕鏈可變區之單鏈。在某些實施方式中，「scFv二聚體」為一種二價雙抗體或二價scFv (BsFv)，包括V_H-V_L (由肽連接子連接)與另一個V_H-V_L部分二聚化，以至一部分的V_H與另一部分的V_L配位並形成可以靶向同一抗原(或表位)或不同抗原(或表位)的兩個結合位點。在其他實施方式中，「scFv二聚體」為雙特異性雙抗體，其包括V_{H1}-V_{L2} (由肽連接子連接)與V_{L1}-V_{H2} (亦由肽連接子連接)結合，使得V_{H1}與V_{L1}配位且V_{H2}與V_{L2}配位並且每個配位對具有不同的抗原特異性。

【0108】 「單鏈Fv-Fc抗體」或「scFv-Fc」指由連接至抗體Fc區之scFv組成的工程化抗體。

【0109】 「駱駝化單域抗體」、「重鏈抗體」、「奈米體」或「HCAb」指含有兩個V_H域而沒有輕鏈之抗體(Riechmann L.及Muyldermans S.之《免疫學方法雜誌(J Immunol Methods)》，12月10日；231(1-2):25-38 (1999)；Muyldermans S.之《生物技術雜誌(J Biotechnol)》，6月；74(4):277-302 (2001)；WO94/04678；WO94/25591；美國專利號6,005,079)。重鏈抗體最初係自*駱駝科*(駱駝、

單峰駝及美洲駝)獲得的。儘管缺乏輕鏈，但駱駝化抗體具有真實的抗原結合庫(Hamers-Casterman C.等人之《自然》，6月3日；363(6428):446-8 (1993)；Nguyen VK等人之「駱駝科之重鏈抗體；進化創新案例(Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation)」，《免疫遺傳學(Immunogenetics)》，4月；54(1):39-47 (2002)；Nguyen VK.等人之《免疫學(*Immunology*)》，5月；109(1):93-101 (2003))。重鏈抗體之可變域(VHH域)表示由適應性免疫反應生成之已知最小的抗原結合單位(Koch-Nolte F.等人之《FASEB雜誌(*FASEB J.*)》，11月；21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007))。「雙抗體」包含具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，其中該片段包括與單條多肽鏈上之V_L域連接之一個V_H域(V_H-V_L或V_L-V_H) (參見例如Holliger P.等人之《美國國家科學院院刊》，7月15日；90(14):6444-8 (1993)；EP404097；WO93/11161)。由於連接子太短，因此同一條鏈上之兩個域無法配對，因此，迫使該域與另一條鏈之互補域配對，從而產生兩個抗原結合位點。該抗原結合位點可以靶向相同的不同抗原(或表位)。

【0110】「域抗體」指僅含重鏈之可變區或輕鏈之可變區的抗體片段。在某些實施方式中，兩個或更多個V_H域藉由肽連接子共價接合以形成二價或多價域抗體。二價域抗體之兩個V_H域可靶向相同或不同的抗原。

【0111】在某些實施方式中，「$(dsFv)_2$」包括三個肽鏈：由肽連接子連接之兩個V_H域，及與由二硫橋結合至兩個V_L部分之兩個V_H域。

【0112】在某些實施方式中，「雙特異性ds雙抗體」包括V_{H1}-V_{L2}(由肽連接子連接)與V_{L1}-V_{H2} (亦由肽連接子連接)藉由V_{H1}與V_{L1}之間的二

硫橋結合。

【0113】 在某些實施方式中，「雙特異性dsFv」或「dsFv-dsFv'」包括三個肽鏈：V_{H1}-V_{H2}部分，其中重鏈由肽連接子(例如，長柔性連接子)結合並且藉由二硫橋分別與V_{L1}及V_{L2}部分結合。每個二硫配對的重鏈及輕鏈具有不同的抗原特異性。

【0114】 如本文所用，術語「人源化」指抗體或抗原結合片段包括來源於非人類動物之CDR、來源於人類之FR區及(當適用時)來源於人類之恆定區。在某些實施方式中，替換人源化gremlin抗體可變區框架之胺基酸殘基進行序列最佳化。在某些實施方式中，人源化gremlin抗體鏈之可變區框架序列至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%與相應的人類可變區框架序列相同。

【0115】 如本文所用，術語「嵌合」指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於一個物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同的物種之抗體或抗原結合片段。在一說明性實施例中，嵌合抗體可以包括來源於人類之恆定區及來源於非人類物種(諸如小鼠)之可變區。

【0116】 術語「生殖系序列」指編碼可變區胺基酸序列或子序列之核酸序列，與所有其他已知的由生殖系免疫球蛋白可變區序列編碼之可變區胺基酸序列相比，該序列與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高的確定胺基酸序列同一性。生殖系序列亦可以指與所有其他評估之可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高胺基酸序列同一性之可變區胺基酸序列或子序列。生殖系序列可以為僅框架區、僅互補決定區、框架及互補決定區、可變片段(如上文所定義)或包括可變區之序列或子序列之其他組合。序列同一性可以使用本文之方法確定，例如，使

用BLAST、ALIGN或此項技術中已知的另一種比對演算法比對兩個序列。生殖系核酸或胺基酸序列與參考可變區核酸或胺基酸序列可以具有至少 約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列一致性。例如，可以藉由可公開獲得的國際ImMunoGeneTics資料庫(IMGT)及V-base確定生殖系序列。

【0117】 如本文互換使用之「抗人gremlin1抗體」、「抗hGREM1抗體」或「抗人gremlin1抗體」指能夠特異性結合人gremlin1並具有足夠的特異性及/或親和力之抗體，例如，用於治療用途。

【0118】 如本文所用，術語「親和力」指免疫球蛋白分子(亦即抗體)或其片段與抗原之間的非共價相互作用之強度。

【0119】 如本文所用，術語「特異性結合(specific binding或specifically binds)」指兩個分子之間，諸如抗體與抗原之間的非隨機結合反應。在某些實施方式中，本文提供之抗體或抗原結合片段特異性結合至人類及/或非人類gremlin1之結合親和力(KD)≤10^{-6} M (例如，≤5×10^{-7} M、≤2×10^{-7} M、≤10^{-7} M、≤5×10^{-8} M、≤2×10^{-8} M、≤10^{-8} M、≤5×10^{-9} M、≤4×10^{-9}M、≤3×10^{-9}M、≤2×10^{-9} M或≤10^{-9} M)。本文使用之K_D指解離速率相對於締合速率之比率($k_{離}/k_{合}$)，其可藉由使用此項技術中已知之任何習知方法來確定，上述方法包含但不限於表面等離激元共振方法、微尺度熱泳方法、HPLC-MS方法及流式細胞量測術(諸如FACS)方法。在某些實施方式中，K_D值可以藉由使用流式細胞術法適當地確定。可以使用各種免疫測定格式來選擇與特定蛋白特異性免疫反應之抗體。例如，固相ELISA免疫測定常用於選擇與蛋白特異性免疫反應之抗體(關於可用於確定特異性免疫反應性之免疫測定格式及條件之描述，參見例如Harlow及

Lane之《使用抗體，實驗室手冊(Using Antibodies, A Laboratory Manual)》(1998))。通常，特異性或選擇性結合反應將產生至少兩倍於背景信號，更通常為至少10至100倍於背景信號之信號。

【0120】 如本文所用，術語「胺基酸」指含有胺(-NH_2)及羧基(-COOH)官能基以及每種胺基酸特有之側鏈的有機化合物。胺基酸之名稱在本發明中亦以標準的單字母或三字母代碼表示，其概述如下。

名字	三字母代碼	單字母代碼
丙胺酸	Ala	A
精胺酸	Arg	R
天冬醯胺	Asn	N
天冬胺酸	Asp	D
半胱胺酸	Cys	C
麩胺酸	Glu	E
麩醯胺酸	Gln	Q
甘胺酸	Gly	G
組胺酸	His	H
異白胺酸	Ile	I
白胺酸	Leu	L
離胺酸	Lys	K
甲硫胺酸	Met	M
苯丙胺酸	Phe	F
脯胺酸	Pro	P
絲胺酸	Ser	S
蘇胺酸	Thr	T
色胺酸	Trp	W
酪胺酸	Tyr	Y
纈胺酸	Val	V

【0121】 關於胺基酸序列之「保守取代」指用具有類似生理化學特性之側鏈的不同胺基酸殘基置換胺基酸殘基。例如，保守取代可以：在具有疏水側鏈之胺基酸殘基之間(例如，Met、Ala、Val、Leu及Ile)、在具有親水側鏈之胺基酸殘基之間(例如，Cys、Ser、Thr、Asn及Gln)、在具有酸性側鏈之殘基之間(例如，Asp、Glu)、在具有鹼性側鏈之胺基酸之間(例如，His、Lys及Arg)或在具有芳基側鏈之殘基之間(例如，Trp、Tyr及

Phe)進行。如此項技術中所知，保守取代通常不會引起蛋白構象結構之顯著變化，因此可保留蛋白之生物活性。

【0122】 關於胺基酸序列(或核酸序列)之「序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並在必要時引入空位以實現最大對應性之後，與參考序列中之胺基酸(或核酸)殘基相同的候選序列中之胺基酸(或核酸)殘基之百分比。例如，使用可公開獲得的工具，諸如BLASTN、BLASTp (在美國國家生物技術資訊中心(NCBI)之網站可以獲得)，亦可以參見Altschul S.F.等人之《分子生物學雜誌》，215:403-410 (1990)；Stephen F.等人之《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》，25:3389-3402 (1997))、ClustalW2 (在歐洲生物資訊學研究院網站獲得，亦可以參見Higgins D.G.等人之《酶學方法(Methods in Enzymology)》，266:383-402 (1996)；Larkin M.A.等人之《生物資訊學(Bioinformatics)》，(英格蘭牛津)，23(21): 2947-8 (2007))；及ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體，可以實現為確定胺基酸(或核酸)序列一致性百分比目的之比較。熟習此項技術者可使用該工具提供之預設參數，或可自定義適於比對之參數，諸如例如藉由選擇合適演算法進行。在某些實施方式中，不相同的殘基位置可以藉由保守胺基酸取代而不同。「保守胺基酸取代」指一個胺基酸殘基被另一個具有類似的化學特性(如電荷或疏水性)之側鏈(R基團)之胺基酸殘基取代。通常，保守胺基酸取代基本上不會改變蛋白之功能特性。在兩個或更多個胺基酸序列因保守取代而彼此不同的情況下，類似性百分比或程度可以向上調整以校正取代之保守性質。進行此種調整之方法為熟習此項技術者眾所周知的。參見例如Pearson (1994)之《分子生物學方法》，24: 307-331，其藉由引用合併至本文。

【0123】 如本文所用，「同源序列」指多核苷酸序列(或其互補鏈)或當視情況經比對時，與一個胺基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性之另一個胺基酸序列。

【0124】 「分離的」物質已藉由人工方式自天然狀態改變。若「分離的」組合物或物質存在於自然界中，則其已經自其原始環境改變或移出，或這兩種情況都有。例如，天然地存在於活動物體內之多核苷酸或多肽並非「分離的」，但若相同多核苷酸或多肽與其天然狀態之共存材料充分地分離，由此以基本上純的狀態存在，則該多核苷酸或多肽為「分離的」。經分離「核酸」或「多核苷酸」可互換使用，且指經分離核酸分子之序列。在某些實施方式中，「分離的抗體或其抗原結合片段」指由電泳方法(諸如SDS-PAGE、等電聚焦、毛細管電泳)，或層析法(諸如離子交換層析法或反相HPLC)測定具有至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%之純度的抗體或抗原結合片段。

【0125】 術語「受試者」包含人類及非人類動物。非人類動物包含所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、小鼠、大鼠、貓、兔、羊、狗、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除註明外，術語「患者」或「受試者」在本文中可互換使用。

【0126】 如本文所用，病症之「治療(treating或treatment)」包含預防或減輕病症，減緩病症之發作或發展速率，降低罹患病症之風險，預防或延遲與病症相關之症狀之發展，減少或結束與病症相關之症狀，生成病

症之完全或部分消退，治癒病症或其某一組合。

【0127】 術語「gremlin1」或「GREM1」指gremlin之變體1，並且包括不同物種(諸如人類、小鼠、猴子等)中之gremlin1。GREM1在進化上係保守的，並且人類gremlin1基因(*hGREM*1)已被定位至染色體15q13-q15 (Topol L Z等人之(1997)《分子與細胞生物學(*Mol. Cell Biol.*)》，17: 4801-4810；Topol L Z等人之《細胞發生學與細胞遺傳學(*Cytogenet Cell Genet.*)》，89: 79-84).)。hGREM1之胺基酸序列在GenBank資料庫中以登錄號NP-037504或在Uniprot資料庫中以登錄號O60565可獲得，在本文中提供以SEQ ID NO：66所示之序列。術語「人類gremlin1」及術語「hGREM1」在本發明中可以互換使用。

【0128】 如本文所用，「與gremlin1相關」或「與GREM1相關」之疾病或病症指由GREM1表現或活性增加引起、加重或與之相關的任何疾病或病症。在一些實施方式，與GREM1相關之病症為例如青光眼、癌症、纖維化疾病、血管生成、視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓或骨關節炎(OA)。

【0129】 如本文所用，「癌症」指特徵在於惡性細胞生長或腫瘤、異常增生、浸潤或轉移之任何醫療狀況，可以為良性或惡性的，且包含實體瘤及非實體癌(例如，血液惡性腫瘤)，諸如白血病。如本文所用，「實體瘤」指贅生性及/或惡性細胞之實體塊。

【0130】 術語「醫藥學上可接受的」表示指定的載體、媒劑、稀釋劑、賦形劑及/或鹽通常與構成製劑之其他成分在化學上及/或物理上相容，並與其接受者在生理上相容。

【0131】 術語「治療有效量」或「有效量」意謂在適用於任何治療

之合理益處/風險比下產生一些期望之局部或全身治療效果的藥劑量。當為預防疾病投與時，該量足以避免或延遲疾病之發作。治療有效量或有效量並不需要具有治癒性或防止疾病或病症之發生。在某些實施方式中，藥劑之治療有效量將取決於其治療指數、溶解度等。

【0132】 本文中提及「約」一個值或參數包含(並且描述)針對該值或參數本身之實施方式。例如，關於「約X」之描述包含「X」之描述。數值範圍包含定義該範圍之數字。一般而言，術語「約」指變數之指示值以及變數在指示值之實驗誤差範圍內(例如，平均值95%置信區間內)或指示值之10%以內的所有值，以較大的值為準。在術語「約」在一段時間(年、月、週、日等)之上下文中使用時，術語「約」指一段時間加上或減去下一個從屬時間段之時間段(例如，約1年指11-13個月；約6個月表示6個月加上或減去1週；約1週指6-8天等)，或在指示值之10%以內，以較大的值為準。

【0133】 本發明提供了gremlin1 (GREM1)拮抗劑之新的醫療用途。新醫療用途部分基於一個意外的發現，亦即GREM1之轉錄被雄激素受體(AR)抑制並且在雄激素剝奪療法(ADT)中釋放。新醫療用途部分基於一個發現，亦即PTEN及/或p53之缺乏促進GREM1表現。此外，本發明令人驚訝地發現，在包含去勢抵抗性前列腺癌(CRPC)之晚期前列腺癌中顯著上調GREM1，並且與去勢抵抗性之發展及較差之總生存率呈正相關。發明者已經證明GREM1拮抗劑在治療相關病症方面係有用的。

【0134】

採用減弱的雄激素受體信號傳導治療表現GREM1之病症的方法

一方面，本發明提供了一種在有需要之受試者中治療表現GREM1之

疾病或病症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中疾病或病症之特徵在於減弱的或經抑制的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0135】 在某些實施方式中，受試者正在接受或已經接受AR抑制劑。在某些實施方式中，疾病或病症對AR抑制劑具有抵抗性。本文所用之AR抑制劑指可用於抑制AR活性之治療劑，例如，在雄激素剝奪療法中使用之治療劑。

【0136】 在某些實施方式中，疾病或病症為AR相關之癌症(諸如前列腺癌、乳癌、膠質母細胞瘤、黑色素瘤、膀胱癌、腎細胞癌、胰臟癌、肝細胞癌、卵巢癌、子宮內膜癌、套細胞淋巴瘤或唾液腺癌)，或AR相關之非癌病症(諸如脫髮、痤瘡、多毛症、卵巢囊腫、多囊卵巢疾病、性早熟、脊髓及延髓肌肉萎縮或年齡相關黃斑變性)。

【0137】 一方面，本發明提供了在有需要之受試者中治療表現GREM1之癌症的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑，其中癌症之特徵在於減弱的雄激素受體(AR)信號傳導。

【0138】

減弱的雄激素受體(AR)信號傳導

雄激素受體(AR)為類固醇及核受體超家族成員之一，主要在雄激素靶組織中表現，諸如前列腺、骨骼肌、肝臟及中樞神經系統(CNS)，在前列腺、腎上腺及附睾中觀察到最高表現水準。

【0139】 AR為用作胞內轉錄因子的一種可溶性蛋白。在與雄激素結合及被雄激素活化後，AR介導調節前列腺上皮細胞生長及分化之靶標基因之轉錄。AR信號傳導對包含前列腺在內的男性生殖器官之發育及維護至關重要。

【0140】 如本文所用，術語「減弱的雄激素受體(AR)信號傳導」指水準顯著低於AR信號傳導正常或基線水準(例如，健康細胞或組織樣品中之AR信號傳導水準，或一般癌症患者群體中或特定的相關癌症患者群體中或具有AR依賴性前列腺癌患者群體中之AR信號傳導之平均水準)的AR信號傳導。

【0141】 具有減弱的雄激素受體(AR)信號傳導之癌症可為表現AR之癌症，其中例如，由於治療(例如，藥物治療或手術治療)，或由於AR表現水準降低，或由於AR之某些失活突變，AR信號傳導受到抑制。或者，具有減弱的AR信號傳導之癌症在AR表現上可為陰性的，特別是對於通常表現AR之癌症(諸如前列腺癌)。

【0142】 在某一實施方式中，癌症為表現AR之癌症。已知不同類型之癌症表現AR。表現AR之癌症的實例包含但不限於前列腺癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、睾丸癌、子宮內膜癌、卵巢癌及皮膚癌。在某些實施方式中，表現AR之癌症為前列腺癌或乳癌。

【0143】 在某一實施方式中，受試者正在接受或已經接受雄激素剝奪療法(ADT)。如本文所用，術語「雄激素剝奪療法」或「ADT」指藉由降低雄激素水準或抑制雄激素之生物功能諸如抑制AR信號傳導來抑制雄激素之療法。體內主要的雄激素為睾酮及雙氫睾酮(DHT)。

【0144】 ADT可以藉由手術治療(諸如手術去勢)或藥物治療來實現。ADT藥物之實例包含但不限於LHRH促效劑(諸如亮丙瑞林(立普安、Eligard)、戈舍瑞林(諾雷得)、曲普瑞林(Trelstar)及組胺瑞林(Vantas))、LHRH拮抗劑(諸如地加瑞克(費蒙格)、瑞格列克(Orgovyx))、降低腎上腺雄激素水準之藥物(諸如阿比特龍(Zytiga)、酮康唑(里素勞))、雄激素受體

拮抗劑(諸如氟他胺(Eulexin)、比卡魯胺(康士得)、尼魯米特(Nilandron))及其他抗雄激素製劑(諸如恩雜魯胺(安可坦)、阿帕魯胺(厄利達)及達洛魯胺(Nubeqa))。

【0145】 在某一實施方式中，受試者或癌症對ADT具有耐藥性。所謂「耐藥性」指該疾病對ADT沒有或具有降低的反應性或敏感性。藉由例如需要增加劑量才能達到一定的療效，可以表明降低之反應性。在某些實施方式中，疾病可為對ADT無反應性的。例如，儘管進行ADT治療但是癌細胞或腫瘤尺寸增大了，或者疾病回歸到其以前的狀態，例如，部分恢復之後以前的症狀又回歸了。對ADT之抗性可為新生的，亦可為習得的。

【0146】 在某一實施方式中，受試者或癌症具有降低的AR表現水準或AR具有一或多個失活突變。在雄激素不敏感症候群及前列腺癌患者中，已發現超過800種不同的AR突變。在AR基因中，已經偵測到四種不同類型的突變來滅活AR，包含：a)導致胺基酸取代或過早終止密碼子之單點突變；b)核苷酸插入或缺失導致讀框移位及早熟反芻；c)基因完全或部分缺失；及d)導致選擇性剪接之內含子突變(詳情參見K. Eisermann等人之《泌尿男科轉化醫學雜誌(Transl Androl, Urol.)》，2013年9月；2(3): 137-147)。

【0147】 在一些實施方式中，癌症對雄激素受體(AR)表現為陰性，亦即AR陰性癌症。如本文所用，AR陰性癌症指原本表現AR但變成AR陰性的癌症。在某些實施方式中，AR陰性癌症為前列腺癌或乳癌。已知一些前列腺癌細胞株為AR陰性，諸如PC3細胞株。AR陰性癌症可以被偵測到AR表現或AR信號傳導陰性(或偵測不至)，或可以具有與已知的AR陰性前列腺癌細胞相當的偵測到之AR表現水準。

【0148】在一些實施方式中，前列腺癌或乳癌對雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均呈陰性。前列腺癌中之NE分化為一種公認的表型變化，藉此前列腺癌細胞轉分化成NE樣細胞。NE樣細胞缺乏雄激素受體及前列腺特異性抗原之表現，並且對治療有耐藥性。NE分化可以藉由量測NE標誌物嗜鉻粒蛋白A (CgA)之蛋白水準或mRNA水準、CgA/前列腺特異性抗原(PSA)之比率及/或神經元特異性烯醇酶(NSE)來評估(參見例如Hu等人之《腫瘤學前沿(*Front Oncol*)》，2015;5:90；Berruti等人之《內分泌相關癌症(Endocr Relat Cancer)》，(2005) 12(1):109-17.10.1677/erc.1.00876；Khan等人之《巴基斯坦醫學協會雜誌(J Pak Med Assoc)》，(2011) 61(1):108-11；Taplin等人之《泌尿學(Urology)》，(2005) 66(2):386-91.10.1016/j.urology；Sarkar等人之《癌症生物標誌物(Cancer Biomark)》，(2010) 8(2):81-7.10.3233/CBM-2011-0198；Burgio等人之《內分泌相關癌症》，(2014) 21(3):487-93.10.1530/ERC-14-0071；Conteduca等人之《前列腺(Prostate)》，(2014) 74(16):1691-6.10.1002/pros.22890；Berruti等人之《癌症(Cancer)》，(2000) 88(11):2590-7.10.1002/1097-0142(20000601)88:11；Sasaki等人之《歐洲泌尿學(Eur Urol)》，(2005) 48(2):224-9.10.1016/j.eururo.2005.03.017，其揭示內容藉由整體引用合併於此)。

【0149】在一些實施方式中，前列腺癌特徵亦在於具有低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準。

【0150】PSA為AR之典型下游靶標。正常情況下，血液中很少分泌PSA。良性前列腺肥大、前列腺炎或前列腺癌引起之腺體尺寸增大及組織損傷增加可能提高循環的PSA水準。分化較差或未分化晚期前列腺癌細胞

產生較少的PSA，並且伴有低水準之PSA (例如，小於4 ng/ml)。亦可以認為PSA水準低或PSA呈陰性之前列腺癌細胞可以對抗雄激素製劑、化療藥物、促氧化劑或放療具有耐藥性，亦可以具有去勢抵抗性(Skvortsov S.等人之《幹細胞(STEM CELLS)》，第36卷，第10期，1457-1474)。

【0151】 PSA之參考水準可為PSA陽性前列腺癌通常發現之PSA臨限值水準。PSA之參考水準亦可為一般前列腺癌患者群體中或進展至晚期之前列腺癌患者群體中PSA平均水準。血液中PSA之某些參考水準可為例如約2 ng/ml、約4 ng/ml、約6 ng/ml、約8 ng/ml或約10 ng/ml，如使用免疫可偵測之測定法所量測的，例如，Hybritech (加利福尼亞州聖地亞哥)、Tosoh (加利福尼亞州福斯特城)、Bayer Centaur PSA測定套組(紐約州柏油村)或Abbott測定法(伊利諾伊州芝加哥)。參見例如Dan等人之《癌症》，第109卷，第2期，2007，**https://doi.org/10.1002/cncr.22372**；及Oesterling等人之《泌尿學雜誌(*J Urol*)》，1995；154:1090-1095，其揭示內容藉由整體引用合併於此。

【0152】 在某些實施方式中，前列腺癌PSA呈陰性。例如，前列腺癌不表現PSA，或者在PSA測試中呈陰性。

【0153】 在某一實施方式中，前列腺癌為去勢抵抗性的。去勢抵抗性前列腺癌(CRPC)為一種晚期前列腺癌，儘管循環之雄激素水準低，但仍能生長。儘管ADT之後血清睾酮值低於50 ng/dL，但CRPC可能表現為PSA水準之持續升高、原有疾病之進展及/或新轉移之出現(Toshiyuki Kamoto等人之《日本臨床雜誌(Nihon Rinsho)》，2014年12月；72(12):2103-7；Fred Saad等人之《加拿大泌尿外科協會雜誌(Can Urol Assoc J)》，2010年12月；4(6): 380-384)。

【0154】 儘管雄激素減少或降低，但一些CRPC仍然依賴於AR信號傳導。例如，可以藉由擴大AR表現、使AR基因及/或基因編碼輔活化因子/輔阻遏物突變、活化雄激素非依賴性AR通路及/或產生替代雄激素，可以罹患CRPC，由此對用於疾病發展之AR通路保留依懶性(Thenappan等人之《泌尿男科轉化醫學雜誌》，2015年6月；4(3): 365-380)。一些CRPC可以繞過AR信號傳導之要求。

【0155】 在一些實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0156】 在一些實施方式中，癌症進一步確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0157】 在某些實施方式中，癌症為轉移性的。轉移性癌症可以或已經自其原發部位擴散至身體之另一部位。轉移性腫瘤與原發腫瘤為同一類型之癌症。轉移性癌症可以擴散至原發部位附近區域，亦可以擴散至身體之遠距離部分。

【0158】

GREM1過表現

在不願受任何理論約束之情況下，據信AR信號傳導與GREM1表現呈負相關，而且減弱的AR信號傳導則被認為導致GREM1表現增加。

【0159】 在某一實施方式中，AR信號傳導減弱的癌症之特徵亦在於GREM1表現或過表現。GREM1表現或過表現可以發生在疾病細胞或疾病微環境中。

【0160】 如本文所用，關於GREM1之術語「過表現」指相對於參考水準提高的表現水準。參考水準可為在相同組織類型之正常細胞中發現的GREM1表現水準，可以視情況正規化至另一個基因(例如，管家基因)之表現水準。或者，參考水準可為在健康之受試者中發現的GREM1表現水準。基於核酸水準或蛋白水準確定表現水準。在一些實施方式中，表現GREM1之癌症的GREM1表現水準比參考水準至少高10% (例如，至少15%、20%、30%、35%、40%、50%或1倍、2倍、3倍甚至更高)。

【0161】

提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法敏感性的方法

另一方面，本發明進一步提供了提高表現AR之癌症對雄激素剝奪療法(ADT)敏感性的方法，包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。

【0162】 在不願受任何理論約束的情況下，據信ADT降低AR信號傳導可以導致GREM1表現或表現增加，且使用GREM1拮抗劑可以進一步提高表現AR之癌症對ADT之敏感性。

【0163】 關於癌症之術語「敏感性」指癌症對一種治療方法(例如，使用GREM1拮抗劑之治療方法)回應之能力。癌症之敏感性可以藉由例如抑制癌細胞增殖或促進癌細胞死亡來量測。可以根據在相同劑量下增加之效能或根據相似效能劑量減少來確定增強之敏感性。

【0164】 在一些實施方式中，方法包括給受試者投與與ADT聯合使用之GREM1拮抗劑。

【0165】

治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症的方法

在各種實施方式中，本發明提供了治療特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症的方法。

【0166】

PTEN及/或p53缺乏

PTEN及p53有助於調節前列腺祖細胞及前列腺癌之推定腫瘤起始細胞之自我更新及分化。在本文中提供之術語PTEN及/或p53旨在包含不同的形式，包含mRNA、蛋白及DNA (例如，基因組DNA)。因此，PTEN及/或p53之水準及/或活性及/或突變狀態可以使用RNA (例如，mRNA)、蛋白或DNA (例如，基因組DNA)來量測。

【0167】 術語「TP53」及「p53」在本文可以互換使用。TP53為一種能夠調控多種基因(例如，調控細胞週期及細胞凋亡)之轉錄因子。p53之替代名稱包含例如抗原NY-CO-13、磷蛋白p53、腫瘤抑制蛋白p53及細胞腫瘤抗原p53。如本文所用，p53可以指示TP蛋白以及編碼TP53蛋白之多核苷酸(例如，DNA或RNA)，包含所有的亞型及變體。在某些實施方式中，p53基因在GenBank資料庫中以NCBI參考序列NG_017013.2可獲得，且人p53蛋白之示例性序列在UniProtKB資料庫中以登錄號P04637 (P53-HUMAN)可獲得。在某些實施方式中，p53蛋白包括SEQ ID NO：73所示之胺基酸序列。

【0168】 術語「PTEN」、「Pten」及「PTEN酪胺酸磷酸酶」在本文可互換使用。PTEN亦稱為刪除十號染色體同源缺失性磷酸酶張力蛋白，係作為雙特異性蛋白磷酸酶的一種腫瘤抑制蛋白，藉由其脂質磷酸酶活性對PI3K信號傳導通路起反作用及藉由其蛋白磷酸酶活性負調節MAPK通路(Pezzolesi等人之《人類分子遺傳學(Hum. Molec. Genet.)》，16: 1058-

1071, 2007)。如本文所用，PTEN可以指PTEN蛋白以及DNA (例如編碼基因序列)或編碼PTEN之RNA，包含所有的亞型及變體。人PTEN之示例性序列在UniProtKB資料庫中以登錄號P60484 (PTEN_HUMAN)可獲得，其具有三種亞型：亞型1 (P60484-1)、亞型α (P60484-2)及亞型3 (P60484-3)。PTEN基因之示例性序列在GenBank資料庫中以NCBI參考序列NC_000010.11可獲得。在某些實施方式中，PTEN蛋白包括SEQ ID NO：74所示之胺基酸序列。

【0169】 如本文所用，「缺乏(deficiency或deficient)」指活性或水準不足，可以包含例如低於正常活性或水準，或活性或水準之缺失或不存在。例如，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以導致PTEN及/或p53沒有或低於正常功能，或生物樣品中PTEN及/或p53表現水準之缺失或降低。

【0170】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53之缺乏特徵在於功能性PTEN及/或p53之缺失。

【0171】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以藉由存在PTEN及/或p53失活突變來表示。

【0172】 應當理解，本發明不限於任何特定的PTEN或p53突變。任何PTEN或p53之失活突變在本發明中都係有用的。

【0173】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以藉由生物樣品中PTEN及/或p53之表現水準或拷貝數來表示。因此，為了確定生物樣品中PTEN及/或p53之活性或水準是否存在缺乏，本文提供之方法可以包括確定相對於參考水準生物樣品中PTEN及/或p53之表現水準或拷貝數是否降低的步驟。

【0174】 PTEN及/或p53在DNA或RNA水準上之突變狀態或表現水

準可以藉由此項技術中已知之任何方法來量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或定序測定。PTEN及/或p53在蛋白水準上之突變狀態或表現水準可以藉由此項技術中已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法。

【0175】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53缺乏之特徵在於PTEN及/或p53表現之缺失。

【0176】 在某些實施方式中，PTEN及/或p53活性或水準之缺乏可以藉由表觀遺傳沈默、轉錄抑制或PTEN及/或p53之微小RNA (miRNA)調控來表示。

【0177】 在不願受任何理論約束的情況下，據信p53/PTEN之缺乏例如藉由失活突變導致GREM1之表現增加。在某一實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症之特徵亦在於GREM1表現或過表現。可以使用上述方法確定GREM1表現。

【0178】 在某些實施方式中，受試者為人類。在某些實施方式中，受試者被認為係GREM1表現或過表現，視情況在自受試者獲得之生物樣品中。

【0179】

GREM1相關疾病或病症

在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。

【0180】 在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為癌症。在某些實施方式中，癌症為轉移性癌症。在某些實施方式中，癌症為前列腺

癌、乳癌、神經膠質瘤、脂質體肉瘤、肝細胞癌、肺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、甲狀腺癌、肝癌、胰臟癌、膀胱癌、結腸癌、食道癌、膽管癌、骨肉瘤、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌或黑色素瘤。

【0181】 在某一實施方式中，癌症為前列腺癌。

【0182】 在某一實施方式中，前列腺癌為：a)雄激素受體(AR)表現為陰性，b)雄激素受體(AR)表現及神經內分泌(NE)分化均為陰性，c)耐雄激素剝奪療法，視情況去勢抵抗性，d)顯示低於參考水準之前列腺特異性抗原(PSA)水準，或者e) a)至d)之任何組合。

【0183】 在某一實施方式中，癌症為乳癌。乳癌可為三陰性乳癌。

【0184】 在某一實施方式中，纖維化疾病為肺纖維化、皮膚纖維化、糖尿病性腎病或缺血性腎損傷。

【0185】 方法包括向受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑。GREM1相關疾病或病症可為藉由調節GREM1活性(如減少GREM1活性)而受益之疾病或病症。在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症特徵在於GREM1表現或過表現。

【0186】 在一些實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症可以選自由癌症、纖維化疾病、血管生成、青光眼或視網膜疾病、腎臟疾病、肺動脈高壓及骨關節炎(OA)組成之群。GREM1升高之水準與以下許多此等疾病或病症相關聯，諸如硬皮病、糖尿病性腎病、神經膠質瘤、頭頸癌、前列腺癌及結直腸癌。

【0187】

i. 癌症

在一些實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症為癌症，特別是表現GREM1之癌症。

【0188】 本文提供之治療方法係基於一項令人驚訝的發現，亦即PTEN及/或p53缺乏之癌細胞中GREM1之顯著上調，這在以前係未知的。

【0189】 在某些實施方式中，癌症選自實體瘤或血液腫瘤。在某些實施方式中，實體瘤為腎上腺皮質癌、肛門癌、星形細胞瘤、兒童小腦或大腦基底細胞癌、膽管癌、膀胱癌、骨腫瘤、腦癌、小腦星形細胞瘤、大腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、髓母細胞瘤、幕上原始神經外胚層腫瘤、視覺通路及下丘腦神經膠質瘤、乳癌、伯基特淋巴瘤、子宮頸癌、結腸癌、肺氣腫、子宮內膜癌、食道癌、尤文氏肉瘤、視網膜母細胞瘤、胃(胃部)癌、神經膠質瘤、頭頸癌、心癌、霍奇金淋巴瘤、胰島細胞癌(內分泌胰腺)、卡波西肉瘤、腎癌(腎細胞癌)、喉癌、肝癌、肺癌、神經母細胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰臟癌、咽部癌、前列腺癌、直腸癌、腎細胞癌(腎癌)、視網膜母細胞瘤、尤因家族腫瘤、皮膚癌、胃部癌、睾丸癌、喉癌、甲狀腺癌或陰道癌。

【0190】 在某些實施方式中，血液腫瘤為白血病(諸如急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性髓系白血病(CML))、淋巴瘤(諸如霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(如瓦爾登斯特羅姆巨球蛋白血症(WM)))或骨髓瘤(諸如多發性骨髓瘤(MM))。在某些實施方式中，癌症為多發性骨髓瘤(MM)。發現骨髓(BM)間充質間質細胞亞群大量分泌GREM1，被認為在MM疾病之發展中發揮關鍵作用。藉由定量PCR對人及小鼠BM間質樣品之分析表明與健康對照相比，攜帶MM腫瘤之組中GREM1/Grem1的表現顯著較高。抗GREM1抗體已被

證明可以降低小鼠MM腫瘤負荷(K. Clark等人之《癌症(Cancers)》，2020, 12, 2149)。

【0191】 在某些實施方式中，癌症為前列腺癌、胃食道癌、肺癌(如非小細胞肺癌)、肝癌、胰臟癌、乳癌、支氣管癌、骨癌、肝癌及膽管癌、卵巢癌、睾丸癌、腎癌、膀胱癌、頭頸癌、脊柱癌、腦癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、結腸癌、結直腸癌、直腸癌、肛門癌、胃腸癌、皮膚癌、腦垂體癌、胃部癌、陰道癌、甲狀腺癌、膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生異常症候群、肉瘤、畸胎瘤、神經膠質瘤、腺癌、白血病(諸如急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性髓系白血病(CML))、淋巴瘤(諸如霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(如瓦爾登斯特羅姆巨球蛋白血症(WM)))、骨髓瘤(諸如多發性骨髓瘤(MM))、三陰性乳癌(TNBC)、小細胞肺癌、食道癌、骨肉瘤及胃癌。

【0192】 在某些實施方式中，癌症選自由前列腺癌、胃食道癌、肺癌(如非小細胞肺癌)、肝癌、結腸癌、結直腸癌、神經膠質瘤、胰臟癌、膀胱癌及乳癌組成之群。在某些實施方式中，癌症為三陰性乳癌。在某些實施方式中，癌症為多發性骨髓瘤。

【0193】 在某些實施方式中，癌症為轉移性的。在某些實施方式中，本發明進一步提供了使用本文提供之抗體治療或預防癌症轉移的方法。癌症轉移為癌細胞自其原發部位擴散至體內另一部位之過程。

【0194】 在某些實施方式中，癌症為前列腺癌、乳癌或肝癌。在前列腺癌或乳癌中腫瘤抑制蛋白Pten及p53經常丟失。

【0195】 在某些實施方式中，乳癌為三陰性乳癌。術語「三陰性乳

癌」或「TNBC」指經測試雌激素受體、孕激素受體及過量HER2蛋白呈陰性的乳癌。TNBC對激素療法或靶向HER2之藥物可為無反應性。如上文所述，根據章節《藉由減弱雄激素受體信號傳導治療GREM1相關前列腺癌之方法》可以偵測到樣品中之表現。

【0196】與具有正常水準之此等腫瘤抑制蛋白(*Jeff C. L.等人之《EMBO分子醫學(EMBO Mol Med)》，(2014)6:1542-1560*)之其他TNBC相比，PTEN及/或p53缺乏之TNBC具有更差的預後。發現組合之Pten-p53突變加速低密封蛋白之三陰性樣乳癌(TNBC)之形成，其表現出與Pten或p53單突變腫瘤相比超活化之AKI信號傳導及更多間充質特徵。

【0197】在一些實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症為肝癌，例如肝細胞癌(HCC)。在一些實施方式中，肝癌為乙型肝炎病毒(HBV)感染相關之HCC。HCC為世界上癌症相關死亡之第二主要原因。持久性HBV感染為HCC發展之主要風險因素之一，其占世界範圍內HCC之50%以上。藉由CRISPR/Cas9介導之*p53*及*PTEN*基因座之突變HBV感染相關之HCC可以發展，導致PTEN及/或p53缺乏(*Yongzhen L.等人之《科學報告(Scientific Reports)》，(2017) 7: 2796*)。HCC之來源已被認為係肝祖細胞/幹細胞之增強的增殖及成熟停滯，其被證明藉由纖維母細胞分泌阻斷BMP功能之GREM1來促進纖維化(*Guimei M等人之《BMC研究筆記(BMC Res Notes)》，2012；5:390。*)。

【0198】

ii. 纖維化疾病

PTEN及/或p53缺乏之疾病或病症亦可為一種非癌症疾病，只要該疾病之特徵在於PTEN及/或p53缺乏，而該缺乏進一步與GREM1上調相關。

例如，已報導非癌症疾病，諸如肺及皮膚纖維化以及糖尿病性及缺血性腎損傷涉及p53或PTEN之失調，並且已知此等疾病亦與GREM1表現有關(詳情參見*Rohan Samarakoon等人之腎損傷中腫瘤抑制蛋白PTEN表現丟失引發SMAD3及p53依賴性纖維化回應(Loss of Tumour Suppressor PTEN Expression in Renal Injury Initiates SMAD3 and p53 Dependent Fibrotic Responses)，《病理學雜誌(J Pathol)》，2015年8月；236(4): 421-432；Nagaraja M. R.等人之「肺纖維母細胞中之p53表現與肺纖維化重塑之緩解有關(p53 Expression in Lung Fibroblasts Is Linked to Mitigation of Fibrotic Lung Remodeling)」，《美國病理學雜誌(Am J Pathol)》，2018年10月；188(10): 2207-2222*。)。本發明人出乎預料地發現了GREM1及PTEN/p53之間的相關性，因此可以預期，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之非癌症疾病或病症亦可以藉由投與GREM1調節劑，包含GREM1拮抗劑來治療。

【0199】在某一實施方式中，特徵在於PTEN及/或p53缺乏之GREM1相關疾病或病症為纖維化疾病。纖維化疾病為一種涉及纖維化之疾病或病症。纖維化為慢性器官損傷之共同特徵的一種瘢痕化過程，例如肺、肝、腎、皮膚、心臟、腸道或肌肉。纖維化之特徵在於轉化生長因子β (TGF-β)活性升高，導致胞外基質及其他纖維化相關蛋白沈積增加及改變。在許多纖維化疾病中均已發現升高的GREM1表現，表明GREM1可為纖維化之重要標誌物(Costello等人之2010年《美國呼吸系統細胞及分子生物學雜誌(Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.)》，42: 517-523；Lappin等人之2002年《腎病透析移植(Nephrol. Dial. Transplant.)》，17: 65-67；Boers等人之2006年《生物化學雜誌(J. Biol. Chem.)》，281 : 16289-

16295)。

【0200】 纖維化疾病可以包含肺、肝、腎、眼睛、皮膚、心臟、腸道或肌肉之纖維化疾病。肺纖維化疾病之實例包含肺纖維化、囊性纖維化、肺高壓、進行性大規模纖維化、閉塞性細支氣管炎、與慢性哮喘相關之氣道重塑或特發性肺纖維化。肝纖維化疾病之實例包含肝硬化或非酒精性脂肪性肝炎。腎纖維化疾病之實例包含諸如腎纖維化、缺血性腎損傷、腎小管間質纖維化、糖尿病性腎病、腎硬化或腎毒性。眼纖維化疾病之實例包含諸如角膜纖維化、視網膜下纖維化。皮膚纖維化疾病之實例包含諸如腎原性全身纖維化、瘢痕疙瘩或硬皮病。心臟纖維化疾病之實例包含心內膜心肌纖維化或陳舊性心肌梗死。

【0201】

iii. 其他疾病

在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為肺動脈高壓(PAH)。術語「肺動脈高壓」(「PAH」)指以肺動脈壓持續升高為特徵的一種進行性肺病。已經發現在缺氧期間小鼠肺內小血管壁中GREM1升高。已經發現抗GREM1抗體可以緩解或改善PAH相關的一或多種症狀，例如，抑制肺動脈增厚，增加每搏量及/或每搏量與收縮末期容量比(「SV/ESV」)，增加右心室心輸出量及/或心臟指數(CI)，改善PAH患者之其他血流動力學量測，諸如例如右心房壓、肺動脈壓、存在呼氣末期壓下肺毛細血管楔壓、全身動脈壓、心跳、肺血管阻力及/或全身血管阻力(詳情參見美國專利申請US20180057580A1)。

【0202】 在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為骨關節炎(OA)。據報導，GREM1為軟骨細胞中一種機械性加載誘導因子，在循環

應變或靜水壓力加載後其被偵測到在軟骨之中層及深層中以高水準存在。據報導，骨關節炎中GREM1上調，且血清及滑膜液中GREM1濃度與膝OA之發作及嚴重程度相關(J. Yi等人之《醫學科學評議雜誌(Med Sci Monit)》，2016；22: 4062-4065)。GREM1活化核因子-κB信號傳導，導致分解代謝酶之隨後誘導。據報導，小鼠關節內投與GREM1抗體或軟骨細胞特異性GREM1缺失減緩了骨關節炎之發展(參見S.H. Chang等人之《自然通訊(Nature Communications)》，(2019) 10: 1442)。

【0203】在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為血管生成。GREM1為主要的促血管生成受體血管內皮生長因子受體2 (VEGFR-2)之促效劑。已證明，已知用於其抗凝作用之硫酸肝素(HS)及肝素、糖胺聚糖(GAG)與GREM1結合。GREM1與肝素結合，並且以一種不依賴BMP之方式活化VEGFR-2 (Chiodelli等人，2011；《動脈硬化、血栓及血管生物學(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.)》，31: e116-e127)。已發現抗GREM1抗體緩解或改善與血管生成或肝素介導之血管生成相關的一或多種症狀(詳情參見美國專利申請US20200157194)。

【0204】在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為青光眼。青光眼可為由眼睛內一或多個BMP家族基因表現改變引起，其導致眼壓升高及/或青光眼視神經病變。已發現在青光眼之小樑網細胞中GREM1表現增加。已發現GREM1拮抗劑緩解或改善與血管生成或青光眼相關的一或多種症狀(詳情參見美國專利US7744873)。

【0205】在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為視網膜疾病。在某一實施方式中，GREM1相關疾病或病症為腎臟疾病。

【0206】

GREM1拮抗劑

在某一實施方式中，GREM1拮抗劑降低GREM1水準或GREM1活性。例如，GREM1拮抗劑可以部分抑制，亦即降低GREM1之表現及/或活性，或完全抑制，亦即完全消除GREM1之表現及/或活性。

【0207】 GREM1拮抗劑可以降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%之GREM1水準或活性。

【0208】 可以降低GREM1之任何功能或活性。在某些實施方式中，視情況在癌細胞中，GREM1拮抗劑可以降低GREM1介導的對BMP信號傳導之抑制及/或GREM1介導的MAPK信號傳導之活化。在一些實施方式中，GREM1拮抗劑抑制BMP非依賴性GREM1活性。

【0209】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑選擇性地降低癌細胞中而不是非癌細胞中GREM1之功能或活性。可以使用在存在或不存在GREM1拮抗劑之情況下進行的任何合適之測定來量測GREM1功能或活性或水準之降低。

【0210】 在某一實施方式中，GREM1拮抗劑包括GREM1-FGFR1軸抑制劑。本發明令人驚訝地發現GREM1似乎在MAPK信號傳導之活化中發揮作用，其可以不依賴BMP，並且可能用作FGFR之新配體。因此，本文提供之GREM1-FGFR1軸抑制劑指可以干擾或抑制GREM1依賴性FGFR1信號傳導或阻斷GREM1及FGFR1之間結合的任何抑制劑。

【0211】 在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑包括FGFR1結合抑制劑。

【0212】 在一些實施方式中，FGFR1結合抑制劑與FGFR1之胞外域

2結合，並且視情況在包括殘基Glu 160之表位處與FGFR1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：75所示。

【0213】在一些實施方式中，GREM1-FGFR1軸抑制劑在包括殘基Lys 123及/或殘基Lys 124之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示；或阻斷FGFR1與FGFR1之殘基Lys 123及/或殘基Lys 124結合。

【0214】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑或GREM1-FGFR1軸抑制劑包括本文所提供之抗hGREM1抗體或其抗原結合片段。

【0215】在各種實施方式中，GREM1拮抗劑可為抗GREM1抗體或其抗原結合片段、GREM1模擬肽、靶向gremlin RNA或DNA之核酸、抑制gremlin與BMP相互作用之化合物或抑制GREM1介導之生物活性之化合物。GREM1拮抗劑可包括抗GREM1抗體或其抗原結合片段、抑制性GREM1模擬肽、靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸、抑制gremlin及BMP相互作用之化合物、編碼抑制性核酸之多核苷酸、抑制GREM1活性之化合物。

【0216】在某一實施方式中，靶向GREM1 RNA或DNA之抑制性核酸包括短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA或反義寡核苷酸。

【0217】在某些實施方式中，靶向gremlin RNA或DNA之核酸為一種非編碼核酸，例如，短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA、反義寡核苷酸或編碼此類之多核苷酸。

【0218】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑可以在mRNA水準或

蛋白水準上降低GREM1水準。例如，GREM1拮抗劑可以在mRNA水準或蛋白水準促進GREM1降解，破壞編碼GREM1之DNA，或減少編碼GREM1之DNA轉錄。這類GREM1拮抗劑可以包含靶向GREM1 mRNA或DNA之非編碼核酸，例如短髮夾RNA (shRNA)、微干擾RNA (miRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、引導RNA、反義寡核苷酸及編碼此類之多核苷酸。GREM1拮抗劑亦可以包含促進GREM1蛋白降解之藥劑。

【0219】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑可為一種干擾(例如，降低) GREM1與BMP結合之藥劑，諸如BMP2/4/7。例如，GREM1拮抗劑可為抗GREM1抗體、GREM1模擬肽或減少或阻斷GREM1與BMP結合之化合物，從而減少GREM1介導的對BMP信號傳導之抑制。GREM1拮抗劑可以與GREM1競爭以結合BMP，但其亦可以與不同表位或結合位點結合，該表位或結合位點不直接影響GREM1與BMP結合，但仍然減少其由GREM1介導之生物功能。

【0220】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗GREM1抗體、抑制GREM1及BMP相互作用之化合物或抑制GREM1介導之生物活性之化合物(如活化MAPK信號傳導或抑制BMP信號傳導)。

【0221】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑可以包括本文提供之任何抗GREM1抗體，亦可以包括任何現有的抗GREM1抗體，諸如彼等例如 在WO2018/115017、WO2019/158658、WO2019/243801、WO2014159010中揭示之抗體，其揭示內容藉由整體引用合併於此。

【0222】

GREM1抗體

在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或結合至與其他抗GREM1抗體不同之表位的其抗原結合片段。例如，用作GREM1拮抗劑之抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段不與包括SEQ ID NO：63所示之胺基酸序列之BMP結合環區結合。

【0223】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中重鏈可變區選自由以下組成之群：

a)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；

b)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；

c)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；以及

d)重鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3。

【0224】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中輕鏈可變區選自由以下組成之群：

a)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；

b)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；

c)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；以及

d)輕鏈可變區，其包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0225】在一些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中：

a)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：1所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：2所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：3所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：4所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：5所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：6所示序列之LCDR3；

b)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：11所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：12所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：13所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：14所示序列之

LCDR1、包括SEQ ID NO：15所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：16所示序列之LCDR3；

c)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：21所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：22所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：23所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：24所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：25所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：26所示序列之LCDR3；或者

d)重鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：31所示序列之HCDR1、包括SEQ ID NO：32所示序列之HCDR2及包括SEQ ID NO：33所示序列之HCDR3；並且輕鏈可變區包括：包括SEQ ID NO：34所示序列之LCDR1、包括SEQ ID NO：35所示序列之LCDR2及包括SEQ ID NO：36所示序列之LCDR3。

【0226】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中重鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：45、SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0227】在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人gremlin1抗體(hGREM1)或其抗原結合片段，其包括重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區，其中輕鏈可變區包括選自由以下組成之群的序列：SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：38、SEQ ID

NO：47、SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：59、SEQ ID NO：61以及其具有至少80%之序列同一性且仍保留對gremlin之特異性結合特異性或親和力的同源序列。

【0228】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括：

a)包括SEQ ID NO：7所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：8所示序列之輕鏈可變區；或

b)包括SEQ ID NO：17所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：18所示序列之輕鏈可變區；或

c)包括SEQ ID NO：27所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：28所示序列之輕鏈可變區；或

d)包括SEQ ID NO：37所示序列之重鏈可變區及包括SEQ ID NO：38所示序列之輕鏈可變區；或

e)包括選自由SEQ ID NO：41、SEQ ID NO：43及SEQ ID NO：45組成之群的序列之重鏈可變區，及包括選自由SEQ ID NO：47及SEQ ID NO：49組成之群的序列之輕鏈可變區；或

f)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：41/47、41/49、43/47、43/49、45/47及45/49組成之群；或

g)重鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：53、SEQ ID NO：55及SEQ ID NO：57組成之群的序列，以及輕鏈可變區，其包括選自由SEQ ID NO：59及SEQ ID NO：61組成之群的序列；或

h)一對重鏈可變區及輕鏈可變區序列，其選自由SEQ ID NO：51/59、51/61、53/59、53/61、55/59、55/61、57/59及57/61組成之群。

【0229】 在某些實施方式中，本文提供之抗體包括抗hGREM1抗體

14E3、69H5、22F1、56C11之一或多個(例如，1、2、3、4、5或6) CDR序列。

【0230】 如本文所用，「14E3」指具有SEQ ID NO：7所示重鏈可變區及SEQ ID NO：8所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0231】 如本文所用，「69H5」指具有SEQ ID NO：27所示重鏈可變區及SEQ ID NO：28所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0232】 如本文所用，「22F1」指具有SEQ ID NO：17所示重鏈可變區及SEQ ID NO：18所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0233】 如本文所用，「56C11」指具有SEQ ID NO：37所示重鏈可變區及SEQ ID NO：38所示輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0234】 表1顯示此等抗hGREM1抗體之CDR序列。重鏈及輕鏈可變區序列亦提供於下表2中。

表1. 抗hGREM1抗體之CDR區域之序列

抗體	區域	CDR1	CDR2	CDR3
14E3	HCDR	**SEQ ID NO：1** TYGMA	**SEQ ID NO：2** WINTLSGEPTYADDFKG	**SEQ ID NO：3** EPMDY
	LCDR	**SEQ ID NO：4** KSSQSLLDSDGKTYLS	**SEQ ID NO：5** LVSKLDS	**SEQ ID NO：6** WQGAHFPLT
22F1	HCDR	**SEQ ID NO：11** DYYMN	**SEQ ID NO：12** DINPKDGDSGYSHKFKG	**SEQ ID NO：13** GFTTVVARGDY
	LCDR	**SEQ ID NO：14** KSSQSLLDSDGKTYLN	**SEQ ID NO：15** LVSKLDS	**SEQ ID NO：16** WQGTHFPYT
69H5	HCDR	**SEQ ID NO：21** DDYMH	**SEQ ID NO：22** WIDPENGDTEYASKFQG	**SEQ ID NO：23** WATVPDFDY
	LCDR	**SEQ ID NO：24** KSSQSLLNRSNQKNYLA	**SEQ ID NO：25** FTSTRES	**SEQ ID NO：26** QQHYSTPFT
56C11	HCDR	**SEQ ID NO：31** DFYMN	**SEQ ID NO：32** DINPNNGGTSYNQKFKG	**SEQ ID NO：33** DPIYYDYDEVAY
	LCDR	**SEQ ID NO：34** RSSQSLVHSNGNTYLH	**SEQ ID NO：35** KVSNRFS	**SEQ ID NO：36** SQSTHVPLT

表2. 小鼠抗體之VH/VL之序列

	VH	VL
14E3	**SEQ ID NO：7** QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGS TFTTYGMAWMKQAPGKGLTWMGWI NTLSGEPTYADDFKGRFAFSLKTSAN TAYLQINNLKNEDAATYFCAREPMD YWGQGTSVIVSS	**SEQ ID NO：8** DVVMTQTPLTLSITIGQPASISCKSS QSLLDSDGKTYLSWLLQRPDQSPK RLISLVSKLDSGVPDRITGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGIYYCWQGAHF PLTFGAGTKLELK
22F1	**SEQ ID NO：17** EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YSFTDYYMNWLKQSHGKSLEWIGDI NPKDGDSGYSHKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSEDSAVYYCASGFTTV VARGDYWGQGTTLTVSS	**SEQ ID NO：18** DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKS SQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSP KRLIYLVSKLDSGFPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGT HFPYTFGGGTKLEIK
69H5	**SEQ ID NO：27** EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASG FNIKDDYMHWVKRRPEQGLEWIGWI DPENGDTEYASKFQGKATITADTSSN TAYLQLSSLTSEDTAVYYCTTWATVP DFDYWGQGTTLTVSS	**SEQ ID NO：28** DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC KSSQSLLNRSNQKNYLAWYQQKP GQSPKLLVHFTSTRESGVPDRFIGS GSGTDFTLTISNLQAEDLADYFCQ QHYSTPFTFGSGTKLEIK
56C11	**SEQ ID NO：37** EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YTFTDFYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSEDSAVYYCARDPIYY DYDEVAYWGQGTLVTVSA	**SEQ ID NO：38** DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCR SSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQST HVPLTFGAGTKLELK

【0235】 本文提供之抗hGREM1抗體或其抗原結合片段可為單株抗體、多株抗體、人源抗體、嵌合抗體、重組抗體、雙特異性抗體、經標記之抗體、二價抗體或抗獨特型抗體。重組抗體為使用重組方法在體外而非在動物體內製備之抗體。

表3. 人源化14E3 (Hu14E3)及人源化22F1 (Hu14E3)之序列

抗體鏈	序列
Hu14E3-Ha VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMAWMRQAPGQG LEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGTMVTVSS**(SEQ ID NO：41)**
Hu14E3-Hb VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMAWMRQAPGQG LEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGTMVTVSS**(SEQ ID NO：43)**
Hu14E3-Hc VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGSTFTTYGMAWMKQAPGQG LTWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGTMVTVSS**(SEQ ID NO：45)**

Hu14E3-La VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLQQRPG QSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGAHFPLTFGQGTKLEIK(**SEQ ID NO：47)**
Hu14E3-Lb VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLQQRPG QSPRRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGAHFPLTFGQGTKLEIK(**SEQ ID NO：49)**
Hu22F1-Ha VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWVRQAPGQ GLEWMGDINPKDGDSGYSHKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS(**SEQ ID NO：51)**
Hu22F1-Hb VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWVRQAPGQ GLEWMGDINPKDGDSGYSHKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS**(SEQ ID NO：53)**
Hu22F1-Hc VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWVRQAPGQ GLEWMGDINPKDGDSGYSHKFKGRVTLTVDKSTSTVYMELRSLRS EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS(**SEQ ID NO：55)**
Hu22F1-Hd VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMNWLRQAPGQ GLEWIGDINPKDGDSGYSHKFKGRATLTVDKSTSTVYMELRSLRSE DTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS(**SEQ ID NO：57)**
Hu22F1-La VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPG QSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGTHFPYTFGGGTKVEIK(**SEQ ID NO：59)**
Hu22F1-Lb VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPG QSPRRLIYLVSKLDSGFPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGTHFPYTFGGGTKVEIK(**SEQ ID NO：61)**

【0236】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑包括抗人GREM1抗體或其抗原結合片段，其：a)能夠在包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之表位處與hGREM1結合，其中殘基編號如SEQ ID NO：69所示，及/或b)能夠與包括殘基Gln27及/或殘基Asn33之hGREM1片段結合，視情況該hGREM1片段具有至少3 (例如，4、5、6、7、8、9或10)個胺基酸殘基之長度；及/或c)能夠選擇性地在癌細胞中而不是非癌細胞中降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之抑制性；及/或d)在非癌細胞中表現出對BMP信號傳導之hGREM1介導之抑制性不超過50%的降低；及/或e)能夠與包括SEQ ID NO：68所示胺基酸序列之嵌合hGREM1結合；及/或f)能夠降低對MAPK信號傳導之hGREM1介導之活化；及/或g)能夠根據Fortebio所量測的在不超過1 nM之KD處結合hGREM1。

【0237】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段亦包括一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留對hGREM1之特異性結合特異性或親和力。

【0238】在某些實施方式中，取代或修飾中之至少一者在VH或VL序列之一或多個CDR序列中，及/或在一或多個非CDR區中。

【0239】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段進一步包括免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或者視情況人IgG之恆定區。

【0240】在某些實施方式中，恆定區包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【0241】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【0242】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫穩定化Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫穩化雙抗體(ds雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0243】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段為雙特異性的。如本文所用，術語「雙特異性」包含具有兩種以上特異性之分子及具有兩種以上特異性之分子，亦即多特異性。在某些實施方式中，本文提供之雙特異性抗體及其抗原結合片段能夠特異性地與hGREM1之第一表位及第二表位結合，或能夠特異性地與hGREM1及第二抗原結合。在某些實施方式中，hGREM1之第一表位及第二表位彼此不同或沒有重疊。

在某些實施方式中，雙特異性抗體及其抗原結合片段可以同時與第一表位及第二表位結合。

【0244】在某些實施方式中，第二抗原不同於hGREM1。在某些實施方式中，第二抗原包括免疫相關靶標。在某些實施方式中，第二抗原包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16或CD83。

【0245】在某些實施方式中，腫瘤抗原包括腫瘤特異性抗原或腫瘤相關抗原。在某些實施方式中，腫瘤抗原包括前列腺特異性抗原(PSA)、CA-125、神經節苷酯G(D2)、G(M2)及G(D3)、CD20、CD52、CD33、Ep-CAM、CEA、鈴蟾素樣肽類、HER2/neu、表皮生長因子受體(EGFR)、erbB2、erbB3/HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、癌相關黏蛋白、VEGF、VEGFR (例如VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)、雌激素受體、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受體、EGFα、c-Kit受體、轉鐵蛋白受體、密封蛋白18.2、GPC-3、Nectin-4、ROR1、間皮素、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pl5、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2或LIV-1。

【0246】在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係不與小鼠gremlin1交叉反應的。

【0247】 在某些實施方式中，抗GREM1抗體或其抗原結合片段係與小鼠gremlin1交叉反應的。

【0248】 在某些實施方式中，GREM1拮抗劑能夠降低對MAPK信號傳導之GREM1介導之活化。

【0249】

聯合治療方法

本文所提供之治療方法可以進一步包括提供第二治療劑的步驟以及向受試者投與治療有效量之第二治療劑的步驟，從而治療、預防、降低受試者GREM1相關疾病或病症之嚴重程度及/或減緩其進展。在此等實施方式之某些實施方式中，GREM1相關疾病或病症可為特徵在於PTEN及/或p53缺乏，及/或為特徵在於降低的雄激素受體(AR)信號傳導之癌症。

【0250】 在某些實施方式中，如本文所揭示的，與一或多種其他治療劑聯合投與的GREM1拮抗劑可以與一或多種其他治療劑同時投與，且在此等實施方式之某些實施方式中，GREM1拮抗劑及其他治療劑可以作為相同醫藥組合物之一部分經投與。然而，與另一種治療劑「聯合」投與的GREM1拮抗劑不必與該藥劑同時投與，或不必以與該藥劑相同之組分投與。如本文中所使用之片語，在另一種藥劑之前或之後投與GREM1拮抗劑被認為係與該藥劑「聯合」投與，亦即使GREM1拮抗劑及第二種藥劑為藉由不同途徑投與的。在可能的情況下，應根據其他治療劑產品資訊表中列出之時間表或根據2003年之《醫師桌上參考手冊》(醫師桌上參考手冊，第57版；醫療經濟學公司(Medical Economics Company)；ISBN: 1563634457；第57版(2002年11月))或此項技術中眾所周知的方案投與本文所揭示的與GREM1拮抗劑聯合投與之其他治療劑。

【0251】

i). 癌症之聯合治療

在一些實施方式中，可以投與本文揭示之GREM1拮抗劑以用於與第二種抗癌藥物聯合治療癌症，例如，化療劑(如順鉑)、抗癌藥物、放射療法、免疫療法(例如，免疫檢查點抑制劑MPDL-3280A)、抗血管生成劑、靶向療法、細胞療法、基因治療劑、激素治療劑、細胞介素、安寧療護、用於治療癌症(例如腫瘤切除術)之手術、一或多種止吐藥、用於由化療引起之併發症之治療，或用於癌症患者之飲食補充劑。

【0252】 如本文所用，術語「免疫療法」指刺激免疫系統對抗疾病諸如癌症或以一般方式增強免疫系統的一種療法。免疫療法包含被動免疫療法，藉由遞送具有已建立之腫瘤免疫反應性之藥劑(諸如效應細胞)，可以直接或間接介導抗腫瘤作用，並且不一定依賴於完整的宿主免疫系統(諸如抗體療法或CAR-T細胞療法)。免疫療法亦可以包括主動免疫療法，其中治療依賴於體內刺激內源性宿主免疫系統，藉由投與免疫反應調節劑對病變細胞作出反應。

【0253】 免疫療法之實例包含但不限於檢查點調節劑、過繼性細胞轉移、細胞介素、溶瘤病毒及治療性疫苗。

【0254】 檢查點調節劑可以干擾癌細胞避免免疫系統攻擊之能力，並幫助免疫系統對腫瘤做出更強烈的反應。免疫檢查點分子可以介導共刺激信號以增強免疫反應，或者可以介導共抑制信號以抑制免疫反應。檢查點調節劑之實例包含但不限於PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGF β、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、

ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16及CD83。在某些實施方式中，免疫檢查點調節劑包括PD-1/PD-L1軸抑制劑。

【0255】 過繼性細胞轉移，此係一種試圖增強T細胞對抗癌症之天然能力的治療。在這種治療中，T細胞取自患者，並在體外擴增及活化。在某些實施方式中，T細胞在體外經修飾為CAR-T細胞。在體外大批量培養抗癌最活躍的T細胞或CAR-T細胞2至8週。在此期間，患者將接受諸如化療及放射療法等治療，以降低身體之免疫力。在此等治療後，體外培養之T細胞或CAR-T細胞將被送回患者體內。在某些實施方式中，免疫療法為CAR-T療法。

【0256】 細胞介素療法亦可以用於增強腫瘤抗原向免疫系統之呈遞。用於治療癌症的兩種主要類型之細胞介素為干擾素及白細胞介素。細胞介素療法之實例包含但不限於干擾素(諸如干擾素-α、-β及-γ)、集落刺激因子(諸如巨噬細胞CSF、粒細胞巨噬細胞CSF及粒細胞CSF)、胰島素生長因子(IGF-1)、血管內皮生長因子(VEGF)、轉化生長因子(TGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、白細胞介素(諸如IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11及IL-12)、腫瘤壞死因子(諸如TN-α及TNF-β)或其任何組合。

【0257】 溶瘤病毒為一種可以殺死癌細胞之轉基因病毒。溶瘤病毒可以特異性地感染腫瘤細胞，從而導致腫瘤細胞溶解，隨後釋放大量的腫瘤抗原，觸發免疫系統靶向並消除具有此類腫瘤抗原之癌細胞。溶瘤病毒之實例包含但不限於T-VEC (talimogene laherparepvec)。

【0258】治療性疫苗藉由增強免疫系統對癌細胞之回應來對抗癌症。治療性疫苗可以包括非致病性微生物(例如，牛分枝桿菌卡介苗BCG)、靶向腫瘤細胞之轉基因病毒，或一或多種免疫原性成分。例如，BCG可以用導管直接插入膀胱，並可引起針對膀胱癌細胞之免疫反應。

【0259】抗血管生成劑可以阻斷支持腫瘤生長的血管之生長。一些抗血管生成劑靶向VEGF或其受體VEGFR。抗血管生成劑之實例包含但不限於阿昔替尼、貝伐單抗、卡博替尼、依維莫司、來那度胺、甲磺酸樂伐替尼、帕唑帕尼、雷莫蘆單抗、瑞格非尼、索拉非尼、舒尼替尼、沙利度胺、凡德他尼及阿柏西普。

【0260】「靶向療法」為一種作用於與癌症相關之特定分子的療法，特定分子諸如存在於癌細胞中但不存在於正常細胞中之特定蛋白或癌細胞中含量較多的特定蛋白或有助於癌症生長及生存之癌症微環境中之靶分子。靶向療法將治療劑靶向腫瘤，從而使正常組織免受治療劑之影響。

【0261】靶向療法可以靶向例如酪胺酸激酶受體及核受體。此等受體之實例包含erbB1 (EGFR或HER1)、erbB2 (HER2)、erbB3、erbB4、FGFR、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、胰島素樣生長因子-1受體(IGF-1R)、雄激素受體(AR)、雌激素受體(ER)、核受體(NR)及PR。

【0262】靶向療法可以靶向酪胺酸激酶或核受體信號傳導級聯中之分子，諸如Erk及PI3K/Akt、AP-2α、AP-2β、AP-2γ、絲裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PTEN、p53、p19ARF、Rb、Apaf-1、CD-95/Fas、TRAIL-R1/R2、半胱胺酸蛋白酶8、Forkhead、Box 03A、MDM2、IAP、NF-kB、Myc、P13K、Ras、FLIP、調節蛋白(HRG) (亦稱為gp30)、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bak、Bad、Bok、Bik、Blk、Hrk、BNIP3、BimL、Bid

及EGL-1。

【0263】 靶向療法亦可以靶向腫瘤相關之配體，諸如雌激素、雌二醇(E2)、孕酮、雌甾激素、雄激素、糖皮質激素、催乳素、甲狀腺激素、胰島素、P70 S6激酶蛋白(PS6)、生存素、纖維母細胞生長因子(FGF)、EGF、Neu分化因子(NDF)、轉化生長因子α (TGF-α)、IL-1A、TGF-β、IGF-1、IGF-II、IGFBP、IGFBP蛋白酶及IL-10。

【0264】 在一些實施方式中，本文揭示之GREM1拮抗劑可以用於與第二種抗癌藥物聯合投與以治療前列腺癌。在某些實施方式中，抗癌藥物包括抗前列腺癌藥物。在一些實施方式中，抗前列腺癌藥物包括雄激素軸抑制劑；雄激素合成抑制劑；ADP-核糖聚合酶(PARP)抑制劑；或者其結合。

【0265】 在某些實施方式中，雄激素軸抑制劑選自由促黃體激素釋放激素(LHRH)促效劑、LHRH拮抗劑及雄激素受體拮抗劑組成之群。

【0266】 在某些實施方式中，雄激素軸抑制劑為地加瑞克、比卡魯胺、氟他胺、尼魯米特、阿帕魯胺、達洛魯胺、恩雜魯胺或阿比特龍。

【0267】 在某些實施方式中，雄激素合成抑制劑為醋酸阿比特龍酯或酮康唑。

【0268】 在某些實施方式中，PARP抑制劑為奧拉帕尼或盧卡帕尼。

【0269】 在某些實施方式中，抗前列腺癌藥物選自由以下組成之群：醋酸阿比特龍酯、阿帕魯胺、比卡魯胺、卡巴他賽、康士得(比卡魯胺)、達洛魯胺、地加瑞克、多西他賽、Eligard (醋酸亮丙瑞林)、恩雜魯胺、厄利達(阿帕魯胺)、費蒙格(地加瑞克)、氟他胺、醋酸戈舍瑞林、

Jevtana (卡巴他賽)、醋酸亮丙瑞林、立普安(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot (醋酸亮丙瑞林)、利普卓(奧拉帕利)、鹽酸米托蒽醌、Nilandron (尼魯米特)、尼魯米特、Nubeqa (達洛魯胺)、奧拉帕尼、普列威(Sipuleucel-T)、鐳223二氯化物、Rubraca (瑞卡帕布樟腦磺酸鹽)、瑞卡帕布樟腦磺酸鹽、Sipuleucel-T、泰素帝(多西他賽)、多菲戈(鐳223二氯化物)、安可坦(恩雜魯胺)、諾雷得(醋酸戈舍瑞林)及Zytiga (醋酸阿比特龍酯)。

【0270】 在某些實施方式中，癌症患者之飲食補充劑可為一種具有抗癌保護作用的適當補充劑。在某些實施方式中，飲食補充劑包括吲哚-3-甲醇或包括攝入後產生吲哚-3-甲醇之其衍生物。吲哚-3-甲醇被認為對抗癌有保護作用，亦可能對癌前病症有預防作用。

【0271】 在某些實施方式中，本文揭示之抗體或抗原結合片段可以與吲哚-3-甲醇或攝入後可產生吲哚-3-甲醇之其衍生物聯合投與。在某些實施方式中，此種組合對治療gremlin相關疾病係有用的。在某些實施方式中，此種組合對治療癌症係有用的，例如，乳癌、肝細胞癌及結直腸癌。在某些實施方式中，此種組合對治療乳癌係有用的，例如，三陰性乳癌。

【0272】

ii) 非癌症疾病之聯合治療

在一些實施方式中，可以投與第二治療劑以管理或治療至少一種與非癌症疾病(如纖維化)或癌症相關之併發症。

【0273】 在某些實施方式中，第二治療劑為抗纖維化劑(諸如吡非尼酮)、抗炎藥、NSAID、皮質類固醇(諸如普賴蘇)、營養補充劑、血管內

皮生長因子(VEGF)拮抗劑[例如，「VEGF-Trap」，諸如美國專利號7,087,411列出之阿柏西普或其他抑制VEGF之融合蛋白，或者抗VEGF抗體或其抗原結合片段(如貝伐單抗或雷珠單抗)]、針對細胞介素抗體(諸如IL-1、IL-6、IL-13、IL-4、IL-17、IL-25、IL-33或TGF-β)及任何其他有助於改善與纖維化相關病症或癌症相關之至少一個症狀的安寧療法。在某一實施方式中，第二治療劑為抗整合素抑制劑。

【0274】 另一方面，本發明提供了包括本文所提供之GREM1拮抗劑及第二治療劑的套組或醫藥組合物，該組合物可以以一種組合物調配，亦可以以不同的組合物調配。可以進一步包含使用說明或適應症，以提供有關如何進行聯合療法之資訊。

【0275】 在某些實施方式中，癌症患者之飲食補充劑可為一種具有抗癌保護作用的適當補充劑。在某些實施方式中，飲食補充劑包括吲哚-3-甲醇或包括攝入後產生吲哚-3-甲醇之其衍生物。吲哚-3-甲醇被認為對抗癌有保護作用，亦可能對癌前病症有預防作用。

【0276】 在某些實施方式中，本文揭示之抗體或抗原結合片段可以與吲哚-3-甲醇或攝入後可產生吲哚-3-甲醇之其衍生物聯合投與。在某些實施方式中，此種組合對治療gremlin相關疾病係有用的。在某些實施方式中，此種組合對治療癌症係有用的，例如，乳癌、肝細胞癌及結直腸癌。在某些實施方式中，此種組合對治療乳癌係有用的，例如，三陰性乳癌。

【0277】

投與途徑及劑量方案

本文提供之GREM1拮抗劑可以按治療有效劑量投與。如本文所提供

之抗體或抗原結合片段之治療有效量將取決於此項技術中已知之各種因素，諸如例如受試者之體重、年齡、既往病史、目前的藥物治療、健康狀況及交叉反應之可能性、過敏性、敏感性及不良副作用，以及投與途徑及疾病發展之程度。如由此等及其他情況或要求所指示的，一般熟習此項技術者(例如，醫師或獸醫)可按比例減少或增加劑量。

【0278】 在某些實施方式中，本文提供之GREM1拮抗劑(如抗體或抗原結合片段)可以以約0.01 mg/kg至約100 mg/kg之治療有效劑量投與。在某些實施方式中，投與劑量可在治療過程中改變。在某些實施方式中，取決於受試者之反應，投與劑量可在治療過程中改變。

【0279】 可以調整劑量方案以提供最佳的期望反應(如治療反應)。例如，可投與單次劑量，或可隨時間推移投與若干分次劑量。

【0280】 本文揭示之GREM1拮抗劑(如抗體及抗原結合片段)可以藉由目前此項技術中已知之任何途徑投與，諸如例如腸外(如皮下、腹腔內、靜脈，包含靜脈滴注、肌肉注射或皮內注射)或非腸外(如口服、鼻內、眼內、舌下、直腸或局部)途徑。

【0281】

偵測及/或診斷之方法

AR表現或信號傳導測定

一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有癌症之受試者中GREM1拮抗劑回應可能性的方法，包括：(a)偵測來自受試者之生物樣品中之雄激素受體(AR)表現或信號傳導，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的AR表現或信號傳導來確定回應之可能性。

【0282】 如本發明所用，術語「可能性」及「可能」表示治療反應

發生之可能性之百分比。在一些實施方式中，具有一種疾病或病症(如癌症)之受試者被確認為「可能反應」指具有一種疾病或病症之受試者具有超過30%之幾率、超過40%之幾率、超過50%之幾率、超過60%之幾率、超過70%之幾率、超過80%之幾率、超過90%之幾率對使用本文提供之GREM1拮抗劑的治療回應。

【0283】 對患者而言，有益的反應可以用許多臨床參數來表示，包含腫瘤偵測缺失(完全緩解)、腫瘤尺寸及/或腫瘤細胞數目減少(部分緩解)、腫瘤生長停滯(疾病穩定)、抗腫瘤免疫反應增強、可能導致腫瘤消退或排斥反應、在一定程度上減輕與腫瘤有關之一或多種症狀、增加治療後之生存時間及/或降低治療後某一特定時間點之死亡率。

【0284】 AR表現可以用此項技術中已知之任何合適之方法偵測。在一些實施方式中，本文所提供之方法涉及使用能夠偵測生物樣品中AR表現存在或AR表現水準之藥劑接觸生物樣品。偵測AR表現可以基於AR表現之存在或不存在，其中AR表現不存在表明該樣品為AR陰性。

【0285】 AR信號傳導可以使用此項技術中已知之任何合適之方法偵測或確定，包含但不限於藉由量測AR敏感基因產物，諸如PSA。可以確定AR敏感基因產物之水準，並與參考水準進行比較，其中偵測到的水準顯著低於參考水準表明AR信號傳導減弱。AR信號傳導之參考水準可以自已經確定在可比較之受試者中具有AR信號傳導參考水準之一或多個參考樣品獲得(例如自資料庫獲得之樣品)，其包含一組資料、標準或來自一或多個參考樣品之水準。在一些實施方式中，這一組資料、標準或水準為正規化的。

【0286】 減弱的AR信號傳導亦可以基於雄激素剝奪療法治療或AR

失活突變來測定。AR在DNA或RNA水準上之突變狀態或表現水準可以藉由此項技術已知之任何方法量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或者定序測定。AR在蛋白水準上之突變狀態或表現水準可以用此項技術已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法。

【0287】 在一些實施方式中，受試者當偵測到受試者不存在AR表現或信號傳導或者經偵測為具有相對於參考水準降低的AR表現或信號傳導時確定為具有對GRME1拮抗劑回應之可能性。

【0288】 在一些實施方式中，方法亦包括當偵測到受試者不存在AR表現或信號傳導，或者偵測到相對於參考水準降低的AR表現或信號傳導時，向受試者推薦測試GREM1表現。

【0289】 在一些實施方式中，方法亦包括偵測來自受試者之生物樣品中GREM1表現。

【0290】 GREM1表現可以使用此項技術已知之任何合適方法來偵測。在一些實施方式中，本文所提供之方法涉及使用能夠偵測生物樣品中GREM1表現存在或水準之藥劑接觸生物樣品。偵測GREM1表現可以基於GREM1表現之存在或不存在，其中存在GREM1表現表明樣品為GREM1陽性。

【0291】 或者，可以根據GREM1表現之水準進行偵測，其中偵測水準高於參考水準表明GREM1陽性。參考水準可以自一或多個參考樣品中獲得(例如，來自健康受試者、健康組織甚至腫瘤患者之癌前組織中獲得的樣品)。偵測GREM1表現可以在參考樣品及相關生物樣品中平行地進行。參考水準亦可以自資料庫中獲得，其包含一組資料、標準或來自一或多個參考樣品之水準。在一些實施方式中，這一組資料、標準或水準為正

規化的。

【0292】 在一些實施方式中，當在生物樣品中沒有偵測到GREM1表現時，方法亦包括監測一段時間後受試者體中GREM1表現，例如，一個月後、兩個月後、三個月後等。

【0293】 在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現或相對於參考水準提高的GREM1表現時，受試者經確定為具有對GREM1拮抗劑回應之可能性。

【0294】 另一方面，本發明提供了一種偵測經確定為AR表現缺失或經確定為雄激素受體(AR)信號傳導減弱的樣品中GREM1存在或數目的方法，包括用GREM1之偵測試劑接觸樣品，及確定樣品中GREM1之存在或數目。

【0295】 在一些實施方式中，如本文所揭示的，自患有或疑似患有癌症之受試者獲得樣品。

【0296】 在一些實施方式中，方法亦包括向確定對GREM1拮抗劑具有回應可能性之受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑(例如，本文提供之任何抗GREM1抗體或其抗原結合片段)。

【0297】

PTEN/p53偵測

另一方面，本發明提供了一種確定在患有或疑似患有疾病或病症之受試者中對GREM1拮抗劑回應可能性的方法，包括：(a)偵測來自該受試者之生物樣品中之PTEN及/或p53之缺乏，以及(b)基於在步驟(a)中偵測到的PTEN及/或p53之缺乏來確定回應之可能性。

【0298】 PTEN及/或p53之活性或水準之缺乏可以導致PTEN及/或

p53沒有或低於正常功能，或生物樣品中功能性PTEN及/或p53表現水準缺失或降低。

【0299】在一些實施方式中，方法亦包括使用此項技術已知之任何合適之方法偵測功能性PTEN及/或p53之表現水準，例如但不限於，擴增測定、雜交測定、定序測定或免疫測定法。在一些實施方式中，本文所提供之方法涉及使用能夠偵測生物樣品中功能性PTEN及/或p53存在或水準之藥劑接觸生物樣品。偵測功能性PTEN及/或p53表現可以基於功能性PTEN及/或p53之存在或不存在或水準，其中功能性PTEN及/或p53缺失或降低之水準表明樣品中PTEN及/或p53之活性或水準缺乏。在一些實施方式中，方法亦包括偵測PTEN及/或p53之突變狀態，例如，在DNA或RNA水準。

【0300】在一些實施方式中，當偵測到受試者PTEN及/或p53缺乏時，受試者經確定為對GREM1拮抗劑具有回應之可能性。

【0301】在一些實施方式中，方法亦包括當偵測到受試者PTEN及/或p53缺乏時，向受試者推薦測試GREM1表現。

【0302】在一些實施方式中，方法亦包括偵測來自受試者之生物樣品中GREM1表現。相似地，使用上文描述之任何相似的方法偵測及確定GREM1表現。

【0303】在一些實施方式中，當偵測到受試者具有GREM1表現時，受試者經確定為對GREM1拮抗劑具有回應之可能性。

【0304】在一些實施方式中，當在生物樣品中沒有偵測到GREM1表現，方法亦包括監測一段時間後受試者體中GREM1表現，例如，一個月後、兩個月後、三個月後等。

【0305】 一方面，本發明提供了一種偵測經確定為缺乏PTEN及/或p53之樣品中之GREM1之存在或含量的方法，包括使樣品與用於偵測GREM1之偵測試劑接觸，以及確定樣品中之GREM1之存在或含量。

【0306】 在一些實施方式中，如本文所揭示的，樣品係自患有或疑似患有GREM1相關疾病或病症之受試者獲得的。

【0307】 在一些實施方式中，方法亦包括向確定對GREM1拮抗劑具有回應可能性之受試者投與治療有效量之GREM1拮抗劑(例如，本文提供之任何抗GREM1抗體或其抗原結合片段)。

【0308】

生物樣品

可以使用自受試者獲得的合適之生物樣品確定生物標誌物(例如，AR、PTEN、p53及/或GREM1)之存在及/或表現水準及/或突變狀態。

【0309】 在一些實施方式中，生物樣品含有或疑似含有癌細胞。在一些實施方式中，自癌症微環境中獲得生物樣品。在一些實施方式中，生物樣品可以自受試者獲得或源自受試者，例如，福爾馬林固定石蠟包埋(FFPE)組織、新鮮活檢、血液(疑似含有循環腫瘤細胞)或其他體液。在一些實施方式中，可以自生物樣品中分離出癌細胞、間質細胞及/或胞外基質。在某些實施方式中，可以對生物樣品進行進一步處理以例如分離分析物(諸如核酸或蛋白)。

【0310】 在某些實施方式中，生物樣品包括癌細胞、間質細胞、間質或纖維化細胞。

【0311】

偵測及/或測定

如本文所用，術語「測定」、「量測」及「偵測」可以互換使用，並且指定量測定及半定量測定。

【0312】本文提供之生物標誌物AR、PTEN、p53及/或GREM1旨在包括不同的形式，包含mRNA、蛋白及DNA (例如，基因組DNA)。因此，此等生物標誌物之水準及/或活性可以藉由相應生物標誌物之RNA (例如，mRNA)、蛋白或DNA (例如，基因組DNA)來量測。類似地，生物標誌物之突變狀態亦可以藉由DNA (例如，基因組DNA)、RNA (例如，mRNA)或蛋白(例如，藉由量測突變基因編碼之改變的蛋白產物)來量測。

【0313】生物標誌物在DNA或RNA水準之表現水準可以藉由此項技術已知之任何方法量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或定序測定，使用之技術包含但不限於：RNA定序(RNA-seq)及RNAscope (Wang, Z.、Gerstein, M.及Snyder, M. (2009)之「RNA-seq：轉錄組學之革命性工具(RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics)」，《自然綜述：遺傳學(Nature Reviews Genetics)》，10(1), 57-63；Wang等人之「RNAscope：福爾馬林固定石蠟包埋組織之新型原位RNA分析平台(RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues)」，《分子診斷學雜誌(J Mol Diagn)》，2012 年1月；14(1): 22-9。)。生物標誌物在蛋白水準上之表現水準可以藉由此項技術已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法(諸如蛋白免疫墨點、酶聯免疫吸附測定(ELISA)、酶免疫測定(EIA)、放射免疫測定(RIA)、夾心測定、競爭性測定、免疫螢光染色及成像、免疫組化(IHC)及螢光活化細胞分選(FACS))。

【0314】生物標誌物在DNA或RNA水準上之突變狀態可以藉由此項

技術已知之任何方法來量測，例如但不限於擴增測定、雜交測定或定序測定。蛋白水準上之突變狀態可以用此項技術已知之任何方法來量測，例如但不限於免疫測定法。

【0315】 生物標誌物之活性水準可以藉由此項技術已知的合適之功能性測定來量測。

【0316】 此等方法在此項技術中為眾所周知的，下面將作為示例詳細描述。

【0317】

i. ***擴增測定***

核酸擴增測定涉及複製靶標核酸(如DNA或RNA)，由此增加擴增之核酸序列之拷貝數。擴增可以係指數型或線性的。示例性之核酸擴增方法包含但不限於使用聚合酶鏈反應(「PCR」，參見美國專利4,683,195及4,683,202；PCR方案：方法及應用指南(PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications) (Innis等編輯，1990))、逆轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)、定量即時PCR (qRT-PCR)；定量PCR (諸如TaqMan®、巢式PCR)連接酶鏈反應(參見Abravaya, K等人之《核酸研究》，23:675-682，(1995)，分支DNA信號擴增(參見Urdea, M. S.等人之(艾滋病(AIDS))，7(增刊2)：S11-S14, (1993)、擴增RNA報告基因、Q-β複製(參見Lizardi等人之《生物技術(Biotechnology)》，(1988)6:1197)、基於轉錄之擴增(參見Kwoh等人之《美國國家科學院院刊》，(1989) 86:1173-1177)、回旋鏢DNA擴增、鏈置換活化、循環探針技術、自我維持之序列複製(Guatelli等人之《美國國家科學院院刊》，(1990) 87:1874-1878)、滾環複製(美國專利號5,854,033)、等溫依賴核酸序列擴增(NASBA)及基因表現

系列分析(SAGE)之擴增。

【0318】

雜交測定

核酸雜交測定使用探針與靶標核酸雜交，從而允許偵測靶標核酸。雜交測定之非限制性實例包含北方墨點、南方墨點、原位雜交、微陣列分析及基於多重雜交之測定。

【0319】 在某些實施方式中，用於雜交測定之探針為可偵測標記的。在某些實施方式中，用於雜交測定的基於核酸之探針為未標記的。此種未標記之探針可以固定在固體支持物諸如微陣列上，並且可以與經可偵測標記之靶標核酸分子雜交。

【0320】 在一些實施方式中，雜交測定可以在微陣列上進行。

【0321】

定序方法

定序方法允許測定靶標核酸之核酸序列，亦可以對已定序之靶標核酸進行計數，從而量測靶標核酸之水準。定序方法之實例包含但不限於RNA定序、焦磷酸定序及高通量定序。

【0322】 高通量定序涉及邊合成邊定序、邊連接邊定序及超深度定序(諸如Marguiles等人之《自然》，437 (7057): 376-80 (2005)中所述)。邊合成邊定序可以使用折返式PCR及錨定引物在固體表面(或微陣列或晶片)上進行。靶標核酸片段可以藉由與錨定引物雜交附著在固體表面上，並進行橋式擴增。例如，該技術應用於例如在Illumina®定序平台。

【0323】 在某些實施方式中，本文所述之相關生物標誌物之突變及/或野生型狀態之偵測以及水準之偵測係藉由整個轉錄組定序或RNA定序

(例如，RNA-seq)進行的。簡言之，RNA-seq包括將靶標mRNA逆轉錄為cDNA，將cDNA進行片段化並定序，以及分析序列資料以進行mRNA定量；RNAscope包括用螢光探針共軛的一或多個寡核苷酸原位雜交靶標mRNA，以及藉由量測螢光強度偵測mRNA水準。

【0324】

免疫測定法

免疫測定法通常涉及使用特異性結合生物標誌物多肽或蛋白(如本文提供之ATM、ATR、MDM2及/或p53蛋白)之抗體來偵測或量測靶標多肽或蛋白之存在或水準。此類抗體可以使用此項技術已知的方法獲得(參見例如Huse等人之《科學(*Science*)》，(1989) 246:1275-1281；Ward等人之《自然》，(1989) 341 :544-546)或者可以自商業來源獲得。免疫測定法之實例包含但不限於西方墨點、酶聯免疫吸附測定(ELISA)、酶免疫測定(EIA)、放射免疫測定(RIA)、夾心測定、競爭性測定、免疫螢光染色及成像、免疫組織化學(IHC)及螢光活化細胞分選(FACS)。為了查閱免疫學及免疫測定程序之綜述，參見基礎及臨床免疫學(Basic and Clinical Immunology) (Stites及Terr編輯，第7版，1991)。此外，免疫測定法可以若干組態中之任何一種進行，該組態在《酶免疫測定法(Enzyme Immunoassay)》(Maggio編輯，1980)；以及Harlow及Lane，同上文中廣泛綜述。為了查閱習知之免疫測定法，參見《細胞生物學方法：細胞生物學中之抗體(*Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biolog*)》，第37卷(Asai編輯，1993)；《基礎及臨床免疫學(*Basic and Clinical Immunology*)》(Stites及Terr編輯，第7版，1991)。

【0325】 在某些實施方式中，本發明之方法包含量測AR、PTEN、

p53及/或GREM1之表現水準或基因拷貝數。p53之活性可以藉由偵測p53第15位胺基酸殘基之磷酸化或者藉由偵測p53的下游靶標基因表現水準之變化來量測。由於蛋白質具有發揮多種生物活性之能力，對於一種特定的蛋白質可能存在幾種可接受的生物測定方法。用於量測AR、PTEN、p53及/或GREM1之活性的示例性之功能性測定可以在Lee J-H等人之《生物化學雜誌》，288:12840-12851 (2013)、Loughery J等人之《核酸研究》，42:7666-7680 (2014)、Thompson T等人之《生物化學雜誌》，279:53015-53022 (2004)、Wienken, M 等人之《分子細胞生物學雜誌(*J. Mol. Cell Biol.*)》，2017；**9(1):** 74-80中找到。

【0326】 在某些實施方式中，相對於AR、PTEN及/或p53基因產物之參考水準，AR、PTEN及/或p53各自基因產物之表現水準之降低(例如，至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%降低)表明生物樣品中AR、PTEN及/或p53活性或水準缺乏。

【0327】 在某些實施方式中，AR、PTEN及/或p53之表現水準可以正規化為內部控制值或標準曲線。例如，本文所述之AR、PTEN及/或p53之水準可以正規化為標準標誌物之標準水準。標準標誌物之標準水準可以預先確定、同時確定或在自受試者獲得樣品後確定。標準標誌物可以在同一測定中運行，或者可為先前測定中之已知標準標誌物。在PTEN及/或p53之水準藉由定序測定(如RNA定序)確定的情況下，可以將生物標誌物之水準正規化為定序總讀數。

【0328】 在某些實施方式中，若待量測的是AR、PTEN及/或p53之RNA或DNA水準，方法亦包括自樣品中分離核酸。各種提取方法都適用

於自細胞或組織中分離DNA或RNA，諸如苯酚及氯仿提取以及本文中記載之其他各種方法，如Ausubel等人之《分子生物學實驗室指南(*Current Protocols of Molecular Biology)*》，(1997)，John Wiley & Sons，及Sambrook及Russell之《分子克隆：實驗室手冊(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)》，*第3版*(2001)。

【0329】 可商購套組亦可以用於分離RNA，包含例如NucliSens提取套組(生物梅里埃(Biomerieux)，法國馬西伊特萊爾)、QIAamp™小型血液套組、Agcourt Genfind™、Rneasy®小型柱(凱傑(Qiagen))、PureLink® RNA小型套組(賽默飛世爾科技(Thermo Fisher Scientific))及Eppendorf Phase Lock Gels™。技術人員可以按照製造商之方案容易地提取或分離的RNA或DNA。

【0330】

套組

另一方面，本發明進一步提供了用於本文之方法的套組。

【0331】 在一個實施方式中，套組包括：第一試劑或第一套試劑，用於偵測PTEN/p53中一或多個失活突變之存在或缺失；或一或多種試劑，用於量測PTEN/p53之表現水準。在一個實施方式中，其中套組進一步包括第二試劑，用於偵測GREM1之存在或缺失或表現水準。

【0332】 在一個實施方式中，套組包括：第一試劑，用於量測AR失活突變之表現水準或存在或缺失。在一個實施方式中，套組進一步包括第二試劑，用於偵測GREM1之存在或缺失或表現水準。

【0333】 在某些實施方式中，第一試劑包括針對PTEN或p53或AR之一或多個引物、一或多個探針及/或一或多個抗體。在某些實施方式

中，第二試劑包括針對GREM1之一或多個引物、一或多個探針及/或一或多個抗體。該引物、探針及/或抗體可以進行可偵測之標記或不可以進行可偵測之標記。

【0334】 在某些實施方式中，套組進一步可以包括實施本文記載之方法的其他試劑。在此類應用中，套組可以包含以下任何一項或全部：合適之緩衝液、分離核酸之試劑、擴增核酸之試劑(如聚合酶、dNTP混合物)、核酸雜交試劑、核酸定序試劑、核酸定量試劑(如插層劑、偵測探針)、蛋白分離試劑、蛋白偵測試劑(如第二抗體)。通常，在本文所提供之任何方法中有用的試劑都包含在載體或分隔開的容器中。載體可為一個例如袋、盒、管、架子形式之容器或支持物，且視情況被分隔開。

【0335】 在某些實施方式中，本發明提供了本文中提供之第一試劑的用途，在用於本文提供之診斷方法之診斷試劑的製備中，視情況及第二試劑一起使用。

【0336】 在一些實施方式中，本發明亦提供了GREM1拮抗劑(例如，本文提供之抗體或其抗原結合片段)在製備用於治療或診斷受試者中表現GREM1之癌症之藥物中的用途，其中GREM1相關疾病或病症經確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0337】 在一些實施方式中，本發明亦提供了GREM1拮抗劑(例如，本文提供之抗體或抗原結合片段)在製備用於治療或診斷受試者中與GREM1相關之疾病或病症之藥物中的用途，其中GREM1相關疾病或病症經確定為PTEN及/或p53缺乏。

【0338】

實施例

雖然本發明已經參照特定實施方式(其中一些為較佳實施方式)具體地呈現及描述，但熟習此項技術者應理解，可以在不背離如本文所揭示的本發明之精神及範疇的情況下在其中進行形式及細節上之各種改變。

【0339】

實施例1：前列腺癌(PCa)中Gremlin1之上調與去勢抵抗性之發展及不良的疾病結果密切相關。

分泌蛋白為用於抗癌藥物開發的一組重要的潛在治療靶標。為了篩選在去勢抵抗前列腺癌(CRPC)中特異性上調之分泌蛋白，我們對已公佈之RNA定序資料集進行了資料挖掘。在激素難治性PCa中，Gremlin1之表現在編碼分泌蛋白之差異表現基因中位居首位(*Best, C.J等人之雄激素消融療法後原發性前列腺癌之分子改變(Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy)，《臨床癌症研究(Clin Cancer Res)》，11, 6823-6834 (2005)*)。對其他PCa資料集之進一步分析表明與未使用激素之PCa相比，在晚期轉移性CRPC中Gremlin1表現水準顯著高於初級PCa或者在激素難治性PCa之表現水準(基於*Yu, Y.P.等人之前列腺癌基因表現之改變預測腫瘤侵入及惡性腫瘤之前期發展(Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy)，《臨床腫瘤學雜誌(J Clin Oncol)》，22, 2790-2799 (2004)；Best, C.J.等人之雄激素消融療法後原發性前列腺癌之分子改變，《臨床癌症研究》，11, 6823-6834 (2005)*之定序資料)。重要的是，根據對前列腺癌(TCGA, Firehose Legacy)之資料分析，*GREM1*擴增與縮短的疾病/無進展生存期相關。然後，我們對上海交通大學醫學院附屬仁濟醫院之一大組139名人PCa患者進行了Gremlin1免

疫組化(IHC)染色。在這139例患者樣本中，60個樣品來自去勢抵抗性前列腺腫瘤患者。對IHC結果之定量研究表明與激素敏感之PCa (HSPC)相比，CRPC樣品中Gremlin1之染色強度顯著增強(圖1A、圖1B)。PCa中Gremlin1表現較高之患者具有顯著較短的總生存期(圖1H)。基於SU2C 2019 PCa資料集之定序資料(*A Robinson等人之《細胞(Cell)》，161(5), 1215-1228 (2015)*)，其亦揭示了*GREM1*轉錄升高的患者顯示出較短的總生存期。總體而言，Gremlin1在CRPC中上調，且與不良的疾病結果密切相關。

【0340】

實施例2：*GREM1*之轉錄受AR抑制，且在ADT後轉錄增加。

AR在PCa中起著核心作用。為了評估Gremlin1及AR信號傳導之間的關係，我們對CRPC樣本切片進一步進行Gremlin1及PSA (AR之典型下游靶標)進行IHC染色。統計學分析表明在具有PSA低染色強度之CRPC中Gremlin1表現明顯上調(圖1C)。此外，我們偵測到與由完整小鼠之異源移植體生成的對照LNCaP細胞株相比，來源於植入去勢小鼠中之異源移植體LNCaP腫瘤的去勢抵抗性LNCaP細胞株(稱為LNCaP R)中之GREM1顯著增加(圖2A)。然後，我們詢問GREM1之表現是否受到AR信號傳導之調控。我們利用AR表現慢病毒或CRISPR/Cas9方法以在LNCaP PCa細胞株中實現*AR*上調(圖2B)或敲除(圖2D)。免疫墨點及q-PCR實驗共同表明AR抑制了*GREM1*之轉錄(圖2B至圖2E)。該結論得到了AR促效劑R1881及拮抗劑恩雜魯胺治療實驗之支持(圖1D、圖1E)。

【0341】 此外，我們進行了螢光素酶報告蛋白測定。*GREM1*啟動子驅動之螢光素酶活性被R1881之治療極大地抑制，而被添加的恩雜魯胺增

強(圖1F)。ChIP實驗結果進一步表明AR與*GREM1*之啟動子區域結合(圖1G)。此等結果共同表明GREM1在CRPC中升高，並且受到AR之負調控。

【0342】

實施例3：雄激素剝奪時GREM1促進PCa細胞增殖及腫瘤生長。

轉移性前列腺癌為一種毀滅性的疾病，並且在藉由使用雄激素受體拮抗劑或化療之系列治療時大多數癌症發展。抵抗此等治療之關鍵細胞類型之一為具有幹細胞類似性質之細胞，該性質在懸浮培養中具有形成腫瘤球之能力。為了探索GREM1在CRPC進展中之作用，我們利用AR非依賴性CRPC細胞株PC3，以及AR依賴性PCa細胞株LNCaP及LAPC4。我們生成了GREM1表現缺失或增加的細胞亞系(圖3A、圖4A及圖5A)。PC3中*GREM1*敲除抑制了細胞之球形成能力、細胞生長及存活，然而與相應對照亞系相比，在培養基中GREM1過表現或添加100 ng/ml之GREM1蛋白導致顯著升高的細胞球形成能力及增殖能力(圖3B、圖3C、圖3D及圖4B)。此外，我們發現，在體內*GREM1*之敲除顯著地抑制了PC3腫瘤之生長，而在限制性稀釋測定中，*GREM1*過表現則促進了腫瘤之生長及腫瘤形成之發生率(圖3E、圖3F)。

【0343】 此外，在*Hi-Myc*小鼠(一種用於PCa之基因工程化小鼠模型(GEMM))中生成的PCa類器官中之GREM1外源表現促進了雄激素剝奪條件下之類器官生長(圖3G及圖3H)。*GREM1*敲除極大地增強了恩雜魯胺對AR依賴性LNCaP及LAPC4細胞之抑制作用，同時*GREM1*過表現或添加的GREM1蛋白導致LNCaP及LAPC4細胞中對恩雜魯胺治療之回應受到影響(圖4A至圖4D及圖5A至圖5D)。此等資料共同表明GREM1在PCa及去勢

抵抗性之發展中具有促進腫瘤的作用。

【0344】

實施例4：GREM1在PCa中之致瘤作用依賴於FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化。

為了闡明GREM1致瘤作用之潛在機制，我們進行RNA定序以比較*GREM1*過表現LNCaP亞系及其對照細胞之間的轉錄差異。我們在圖6A中列出了表現差異最顯著的基因集。在上調的信號傳導通路中FGFR及MAPK信號傳導最為活躍。進一步之基因集富集分析(GSEA)表明在用表現GREM1之慢病毒轉染的LNCaP細胞中，存在FGFR1信號傳導之富集及MAPK活性之活化(圖6B)。此外，除GREM1之上調之外(圖2A)，我們亦發現與未使用激素之LNCaP細胞相比，在去勢抵抗性LNCaP細胞中MAPK及FGFR1均被活化(圖7A)。鑒於最近的發現，FGF信號之活化對於AR非依賴性CRPC生長為必需的，這一點尤其相關。

【0345】 為了測試Gremlin1是否促進FGFR-MAPK信號傳導，我們首先對CRPC患者中四種FGFR之表現水準進行分析。基於SU2C CRPC群組之定序資料(*Robinson等人之《細胞》，161(5), 1215-1228 (2015)*)，*FGFR1*為CRPC中表現最豐富的FGFR。因此，我們主要檢查了GREM1治療後FGFR1之活化情況。我們用不同濃度(1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)之GREM1處理LNCaP及PC3，並檢查FGFR1、MEK及ERK之磷酸化水準。我們使用已知的FGFR1配體FGF1作為陽性對照。如圖6C所示，GREM1治療導致p-FGFR1、p-MEK1/2及p-ERK1/2以劑量依賴之方式增加。我們進一步發現GREM1對FGFR1-MAPK軸之活化係不依賴於BMP的，因為添加BMP4沒有改變GREM1刺激後FGFR1、MEK1/2及ERK1/2

之磷酸化水準(圖6D)。有趣的是，我們發現GREM1比FGF1誘導更長的MAPK信號傳導之活化。在加入GREM1達1小時後，回應於GREM1治療之MAPK之活化保持在較高水準，而在FGF1刺激後10分鐘內MAPK信號傳導被高度活化並且之後快速減小(圖6E、圖6F)。此外，GREM1之外源表現導致源自*Hi-myc*小鼠PCa模型之PCa類器官中的MAPK/FGFR1信號傳導軸之活化(圖7B)。

【0346】 MAPK信號傳導可以藉由FGFR及很多膜受體活化。為了偵測由GREM1之MAPK通路之活化是否藉由FGFR，我們藉由CRISPR/Cas9方法構築了*FGFR1*敲除之LNCaP亞系。如圖6G所示，經GREM1處理之ERK1/2及MEK1/2磷酸化可以藉由*FGFR1*之敲除而消除。此外，藉由*FGFR1*之敲除，可以消除GREM1介導的對PCa細胞生長及球形成之促進作用(圖8A至圖8E)。為了進一步測試GREM1之腫瘤促進作用是否藉由FGFR，我們利用了FGFR或EGFR之小分子抑制劑。藉由GREM1活化MAPK/FGFR1信號傳導軸可以被FGFR1抑制劑BGJ398而非EGFR抑制劑厄洛替尼來減弱(圖6H、圖6I)。此外，如8A、B所示，GREM1對PCa增殖及球形成之促進作用可以藉由採用FGFR抑制劑BGJ398或MEK抑制劑曲美替尼處理而顯著地減弱，但添加BMP4則不影響。此等結果表明Gremin1之致瘤作用係歸因於FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化。

【0347】

實施例5：GREM1為PCa中之一種新的FGFR1配體。

接下來，我們探究了GREM1活化FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之機制。我們進行表面電漿共振分析(Fortebio)，以首先評估GREM1是否可

以與FGFR1結合。如圖9A所示，FGFR1以高親和力(KD=1.06E-08 M)與固定在ForteBio感測器晶片上之GREM1結合。電腦模擬模擬了GREM1與FGFR1之胞外域結合作為二聚體(圖9B)。藉由在293T細胞及LNCaP細胞中均使用外源表現的Flag-標記之GREM1及HA標記之FGFR1的免疫共沈澱測定(圖9C)或LNCaP細胞中之內源性蛋白(圖9D)進一步證實了FGFR1及GREM1之間的結合。圖9F所示之下拉實驗支持了FGFR1及GREM1之間的直接締合。圖9E進一步表明藉由酶聯免疫吸附測定(ELISA)量測，Gremlin 1而非Gremlin 2或DAN蛋白家族之其他成員與FGFR1結合。此外，可以藉由添加過量的可溶性FGFR1來減弱FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路上GREM1之活化(圖9G)。

【0348】我們進行雙分子螢光互補(BiFC)測定來測試GREM1及FGFR1之相互作用。將與黃色螢光蛋白(YFP)編碼序列之片段融合的GREM1及FGFR1 cDNA單獨地或同時轉染至293T細胞。如圖9H所示，只有當GREM1及FGFR1質體轉染時，才能偵測到YFP信號。

【0349】與此一致，免疫螢光染色之共聚焦顯微鏡成像顯示在LNCaP-R細胞之膜上Gremlin1及FGFR1共定位(圖9I)。此外，競爭性ELISA實驗(圖9G)揭示了可溶性FGFR1可以競爭結合在Gremlin1及FGFR1之間。藉由施加過量的可溶性FGFR1，Gremlin1引起的FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路之活化可以被減弱(圖9G)。此等資料為Gremlin及FGFR1之間的特異性結合提供了強有力的證據，並支持了這種結合對於FGFR1及其下游MAPK信號傳導之活化係必需的這一概念(圖9G)。

【0350】為了進一步描述Gremlin1/FGFR1相互作用之模式，我們

在截短的FGFR1 (圖9J至圖9K)與Gremlin1或典型的FGFR1配體FGF1之間進行了免疫共沈澱。已明確定義FGFR1之胞外區由域1 (D1)、域2 (D2)及域3 (D3)組成。與之前的報導一致，D2及D3之間的連接子為FGF1及FGFR1之間的關鍵結合區域，我們發現D2或D3之缺失破壞了FGF1及FGFR1之免疫共沈澱。相反，只有D2缺失消除了Gremlin1及FGFR1之間的締合，此表明Gremlin1在D2處與FGFR1結合(圖9J至圖9K)。此外，我們對FGFR1 (C176及R248)與FGF1結合袋中之彼等以前確定的關鍵胺基酸殘基進行突變(圖9P)。正如所預期的那樣，FGFR1-C176G或FGFR1-R248Q確實破壞了FGF1及FGFR1之免疫共沈澱，而此兩種突變並不影響Gremlin1及FGFR1之間的相互作用(圖9P至圖9Q)。此等資料表明FGFR1以不同於其典型配體FGF1之結合模式的一種方式與Gremlin1結合。與此相一致的是，Fortebio測定、免疫螢光共染色及免疫共沈澱實驗共同證明添加Gremlin1並沒有競爭FGF1及FGFR1之締合，反之亦然(圖9R至圖9U)。因此，Gremlin1及FGF1可能結合在FGFR1之不同位點。然後，我們評估了已公佈的RNA-seq資料集中CRPC患者樣品中Gremlin1及各種FGF之表現水準(*Robinson等人之《細胞》，161(5), 1215-1228 (2015)*)。我們觀察到*GREM1*轉錄物高於FGF。此等資料共同表明，Gremlin1用作CRPC中FGFR1之主要配體。

【0351】下一個問題為破解Gremlin1/FGFR1相互作用之結構基礎。我們使用HDOCK平台(http://hdock.phys.hust.edu.cn/)對先前表徵之Gremlin1蛋白結構(PDB :5AEJ) (*Kisonaite等人之Gremlin-1之結構及其與BMP-2之相互作用分析(Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2)，《生物化學雜誌》，473, 1593-1604(2016)*)及

FGFR1胞外區(PDB: 3OJV) (*Beenken等人之纖維母細胞生長因子1 (FGF1) N端與FGF受體相互作用之可塑性為FGF1濫交之基礎(Plasticity in interactions of fibroblast growth factor 1 (FGF1) N terminus with FGF receptors underlies promiscuity of FGF1*，《生物化學雜誌》，*287, 3067-3078 (2012)*)進行對接。如圖9B所示，Gremlin1中兩簇帶正電的胺基酸殘基(相對於SEQ ID NO：69之Lys66-Arg67；R92-Lys123-Lys124-Arg148-Lys150-Arg153)及FGFR1之胞外域2被預測為Gremlin1及FGFR1之間的基本結合區域。然後，我們按照圖9L及圖9N所示進行誘變，以測試蛋白質結合模擬。Gremlin1上之Lys123Lys124突變為Ala123Ala124 (編號相對於SEQ ID NO：69)或FGFR1之E160A突變體嚴重損害了Gremlin1及FGFR1之間的免疫共沈澱(圖9M及圖9O)。對接模組突出顯示Gremlin1及FGFR1之間結合袋中之關鍵胺基酸殘基(圖9V)。因此，Gremlin1之Lys123-Lys124 (編號相對於SEQ ID NO：69)及FGFR1對應的Glu160為形成Gremlin1/FGFR1蛋白複合物之關鍵胺基酸殘基。

【0352】

實施例6：抗GREM1抗體顯著抑制*Pbsn-Cre4；PTEN$^{fl/fl}$；Trp53$^{fl/fl}$* GEMM中去勢抵抗性PCa之發展。

在CRPC中GREM1之上調及致瘤作用使其成為一個有前景的治療靶標。圖10O示出了顯示對*Pbsn-Cre4；PTEN$^{fl/fl}$；Trp53$^{fl/fl}$* GEMM治療之示意圖。如文所示，接受抗鼠Gremlin1抗體(抗m-GREM1抗體) (腹腔內，10 mg/kg)或IgG之小鼠，每週三次持續2個月，在2個月時，小鼠被去勢。為了靶向GREM1，我們開發了一種高親和力的鼠GREM1單株抗體，本發明中亦稱為替代抗體。該替代抗體不與Gremlin2或其他BMP拮抗劑

(諸如COCO及DAN)結合(圖10A)。為了測試抗mGREM1抗體對PCa之作用，我們利用了平均3個月發生自發性侵入性PCa之*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$ GEMM。以前已經證明*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$ PCa係新生的去勢抵抗性的。藉由免疫染色我們定量了完整或去勢的*Pbsn-Cre4；Pten*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$ PCa及野生型前列腺樣品中GREM1之表現水準。如圖10B所示，與野生型前列腺相比，在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤中GREM1高度上調，接下來係完整的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤，且GREM1在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤進一步富集。

【0353】E鈣黏附素及GREM1之免疫共染色表明在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$腫瘤中，Gremlin主要由腫瘤上皮細胞表現(圖11A)。值得注意的是，對*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠之幾個主要器官中*Grem1*之定量PCR分析表明*Grem1*在前列腺癌組織中的表現最高(圖1I)，這使得Gremlin1成為PCa可信的治療靶標。

【0354】我們將抗mGREM1抗體應用在去勢的*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠中，並且評估其在CRPC發展之體內作用。兩個月大的PTEN/P53$^{\Delta/\Delta}$小鼠被去勢，並施加抗GREM1抗體或對照IgG2a治療，每週三次，劑量為10 mg/kg，持續8週(圖10C)。去勢兩個月後，動物被處死用於分析。如圖10C、圖10D所示，所有對照IgG2a治療小鼠均罹患惡性CRPC。抗mGREM1抗體對PCa之生長具有明顯的抑制作用，這可以藉由顯著抑制總的腫瘤外觀、腫瘤重量及增殖性PCNA陽性細胞顯著減少得到證明(圖10E)。抗GREM1處理之*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠之前列腺切片的H&E染色大多表現為導管內增生，基底膜完整，這與注射

IgG2a小鼠之侵入性PCa表型形成了鮮明對比(圖10F)。在10 mg/kg劑量下，我們觀察到包含腸、肺、肝、脾、骨髓、腎等之主要器官無明顯差異，兩實驗組間外周血細胞計數亦無變化(圖11B、圖11C)，這表明抗mGREM1抗體具有較強的抗腫瘤作用，且無明顯副作用。

【0355】 為了理解抗mGREM1抗體對小鼠CRPC強效抑制作用之機制，我們對IgG2a或抗mGREM1抗體治療小鼠之前列腺樣品進行了RNA定序。KEGG及GESA分析證明抗mGREM1抗體治療組中FGFR及MAPK信號傳導係變化最顯著的信號傳導通路(圖10G、圖10H)。進一步之免疫染色及免疫墨點實驗證實投與抗mGREM1抗體可以導致FGFR1、MEK及ERK磷酸化水準顯著降低(圖10I、圖10J)。此等結果共同表明藉由抑制FGFR1/MAPK信號傳導通路，抗mGREM1抗體抑制*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$小鼠中CRPC之發展。

【0356】

實施例7：靶向GREM1之抗體在人PCa細胞株中具有很強的抗腫瘤作用。

測試14E3以靶向人PCa中之GREM1。該抗體對hGREM1之親和力及特異性藉由ELISA驗證(圖12A)。抗人GREM1抗體14E3對LNCaP及PC3細胞之球形成、增殖及誘導之凋亡具有抑制作用。該抗體增強了恩雜魯胺對AR依賴性LNCaP細胞之抗腫瘤作用(圖12B、圖12C、圖10K、圖10L)。生化分析證明在PC3及LNCaP細胞兩者中，抗GREM1抗體治療對FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路呈劑量依賴性抑制作用(圖12D，圖10M)。

【0357】 為了研究BMP信號傳導是否參與了14E3之抗腫瘤作用，藉

由CRISP/Cas9敲除*BMPRII*，14E3對PCa細胞之抑制作用並沒有消失，這表明BMP信號傳導不依賴於抗GREM1抗體之作用(圖17A、圖17B及圖17C)。

【0358】 為了測試14E3在體內對CRPC之作用，攜帶CRPC細胞株PC3異源移植體之裸小鼠腹腔內注射抗GREM1抗體或IgG2a，每週三次，持續2週(10 mg/kg體重)。14E3極大地抑制了PC3異源移植瘤之生長。在繼發性腫瘤傳代過程中，14E3對腫瘤之抑制作用更加明顯(圖12E、圖12F)。

【0359】 研究了14E3在具有去勢的PC3 CRPC模型中之腫瘤生長抑制活性。簡要地，將PC3細胞皮下移植入Balb/c裸小鼠中，每隻1×10^6個細胞，然後對小鼠進行去勢手術以製成CRPC (去勢抵抗性前列腺癌)模型。當腫瘤體積生長到100 mm^3 (第20天)時，採用同種型對照小鼠IgG2a或14E3雜交瘤抗體(mIgG2a)治療小鼠。每組8隻小鼠，以10 mg/kg腹腔內(i.p.)注射抗體，每週兩次。每週用卡尺(INSIZE)自兩個維度量測兩次腫瘤體積。圖13表明Gremlin抗體14E3降低了PC3腫瘤之生長並且延長荷瘤小鼠之生存期。

【0360】

實施例8：抗Gremlin1抗體在LNCaP PCa細胞中具有很強的抗腫瘤作用。

測試14E3以靶向LNCaP PCa細胞中之GREM1。圖14顯示14E3對AR依賴性LNCaP細胞之球形成及增殖具有抑制作用，並且增強恩雜魯胺之抗腫瘤作用(圖14A、B)。生化分析表明在LNCaP細胞中，14E3治療對FGFR1/MEK/ERK信號傳導通路具有劑量依賴性的抑制作用(圖14C)。圖

14D及圖10N顯示抗GREM1抗體(如14E3或抗mGREM1抗體)及恩雜魯胺之聯合療法對CRPC腫瘤抑制之協同作用。此等資料表明靶向GREM1之抗體可以作為一種有前景的治療人CRPC患者之方法。

【0361】

實施例9：14E3抑制GREM1介導之腫瘤細胞遷移。

收穫處於對數生長期之PC-3細胞，並將其重新懸浮在細胞培養基(含10% FBS之DMEM培養基)中。細胞未經處理，或用1 μg/ml Gremlin、10 μg/ml 14E3及10 μg/ml對照mIgG2a處理細胞3天。然後，將細胞以10^5個細胞/孔植入6孔細胞培養盤中。在細胞覆蓋孔底100%後，將培養基改為無血清培養基。用200 μl吸頭一次劃傷每個孔。藉由Image J軟體計算劃痕上生長之細胞面積，分析細胞之遷移率。

【0362】 如圖15所示，添加GREM1加速前列腺癌細胞之細胞遷移，並且14E3降低了這種加速，亦即抑制了GREM1介導之腫瘤細胞遷移。

【0363】

實施例10：在LNCaP及PC3懸浮培養中14E3抑制了GREM1誘導之EMT/幹細胞之形成。

為了評估gremlin1在調節腫瘤前列腺細胞生長中之作用，我們在一項涉及前列腺癌細胞LNCaP之測定中測試了本文提供之抗體。採用PSA啟動子驅動之GFP表現慢病毒質體轉染該細胞株。PSA被認為係前列腺細胞之分化標誌物，且PSA水準低之前列腺癌細胞代表分化差或未分化的前列腺癌細胞。此等細胞通常具有類似幹細胞之特性，並且具有更強的生長特性。LNCaP報告蛋白細胞測定簡述如下。

【0364】 LNCaP-PSA細胞以10000/孔植入至24孔盤中，RPMI 1640/10% FBS (GIBCO)、1% P/S (完全培養基)，37℃及5% CO_2孵育過夜。次日，移除培養基，將1 ug/ml之人gremlin (ACRO)或含有連續稀釋之抗體之人gremlin添加至細胞中。每三天更換一次培養基。在第7天自孔中移除培養基，用PBS洗滌兩次，使用FITC通道運行流式細胞儀(Bechman)。如圖16A所示，在對照孔(空白)低PSA的LNCaP群體之百分比為6%左右，並且百分比隨著添加GREM1以劑量依賴之方式增加，這表明GREM1促進前列腺癌細胞之侵入性。如圖16B所示，本文提供之雜交瘤抗體14E3以劑量依賴之方式中和gremlin介導之低PSA LNCAP群體之增加，這表明14E3能夠逆轉GREM1促進之侵入性。

【0365】 圖16C顯示用非BMP結合環區替代BMP結合環區並不影響GREM1介導之前列腺癌細胞(LNCaP)中$PSA^{-/lo}$細胞群體之百分比的增加。這表明GREM1促進癌細胞之侵入性係不依賴於GREM1上之BMP結合環區的。

【0366】

實施例11：抗GREM1抗體抑制源自人CRPC患者之類器官之生長的作用

然後，我們測試抗GREM1抗體是否對來自於患者之類器官(PDO)顯示抑制作用。PDO取自仁濟醫院PCa患者。簡要地，來自於九名CRPC患者之腫瘤組織藉由手術收穫，並且被切成1-5 mm^3，用HBSS洗滌一次，然後，該組織藉由使用膠原酶II+ 10 μM Y-27632在37℃下被消化成單細胞懸液且持續4小時，接下來，使用基礎培養基中和消化。之後，用1 ml TrypLE+10 μM Y-27632在37℃下進一步消化15分鐘，然後用含10%胎牛血清之培養基中和。將得到的細胞重懸在50%基質膠+50%培養基中，並

將50 ul之細胞懸液分散至96孔盤之每孔中。然後，在培養基中加入預溫的PDO培養基(B27、N乙醯半胱胺酸、EGF、Noggin、R-sponsdin 1、A83-1、FGF10、FGF2、前列腺素E2、菸醯胺、SB202190、DHT及Y27632)，並且每2-3天加入新鮮培養基。圖18A、圖18B、圖18C及圖18D顯示14E3以不同程度降低了這9個PDO中之7個類器官之生長，表明了14E3介導之腫瘤生長抑制的潛在機制，並指出了基於gremlin之抑制作用的治療潛力。

【0367】

實施例12：討論

隨著用於PCa之第二代ADT藥物之廣泛應用，AR非依賴性之CRPC數目顯著地增加。在本研究中，我們發現與未使用激素的或新診斷的PCa相比，CRPC中GREM1之表現異常升高。GREM1促進前列腺癌之進展及對雄激素剝奪之耐受。此等作用係藉由直接的GREM1-FGFR結合以活化FGFR/MAPK信號傳導通路來實現的。在GEMM鼠PCa模型、人PCa細胞株、患者來源之類器官及異種移植體中，GREM1阻斷抗體可以有效抑制PCa之去勢抵抗性之生長。此等結果共同強烈支持了GREM1/FGFR1/MAPK信號傳導軸促進PCa之進展，並指出Gremlin為一個重要且有前景的治療靶標。

【0368】第二代抗雄激素藥物已被證明觸發AR非依賴性CRPC之關鍵驅動因子上調。然而，AR信號傳導調節此等驅動因子之機制仍不完全清楚。我們發現在CRPC患者樣品中，*GREM1*與AR信號傳導通路呈負相關。AR活化或過表現導致了PCa細胞中*GREM1*表現之強烈下降。相反，當AR被恩雜魯胺敲除或抑制時，*GREM1*轉錄顯著地增加。CHIP及螢光

素酶報告蛋白測定資料共同支持GREM1之抑制係藉由在*GREM1*啟動子區域結合AR用於轉錄抑制來實現。此等結果表明*GREM1*之基因表現作為CRPC之一個強有力的驅動因子，在轉錄上受到AR之抑制。PCa去勢抵抗性之發生機制可歸納為兩大類：1)藉由AR擴增、突變或替代剪接重新活化AR信號傳導通路或糖皮質激素受體(GR)之上調；2)活化諸如FGF、PRC1、BCL2等替代信號傳導通路，促進AR非依賴性腫瘤生長及細胞死亡逃逸。我們發現，在GREM1過表現之前列腺癌細胞株中，FGFR/MAPK信號傳導通路被異常活化。鑒於最近發現FGF信號活化為AR非依賴性CRPC的一個重要分子特徵，並且為CRPC之AR非依賴性生長所必需的，這一點尤為相關。FGF-FGFR1信號軸在前列腺癌之骨轉移中之作用亦已有報導。在本研究中，我們發現GREM1以濃度依賴之方式引起FGFR1磷酸化及活化。Gremlin誘導之FGFR1磷酸化比FGF1刺激更持久。此外，根據SU2C PCa群組之定序資料，*GREM1*在CRPC中之RNA轉錄豐度高於其他FGF。因此，我們認為GREM1至少係導致CRPC中FGFR1/MAPK信號異常活化之主要原因之一。重要的是，藉由使用免疫共染色、雙FC、fortebio、co-IP、下拉及電腦模擬方法，我們提供了令人信服的證據，證明GREM1可以直接與FGFR1結合。因此，GREM1誘導的FGFR1之活化為配體-受體直接結合之結果。在PCa中，GREM1用作FGFR1之新配體。

【0369】以前GREM1被認為係BMP之典型拮抗劑。已報導根據自條件性敲除小鼠模型上之觀察，BMP信號傳導通路及下游靶標基因顯著地影響PCa之進展及轉移。然而，我們發現BMP4對FGFR/MAPK之活化及GREM1對PCa之腫瘤促進作用沒有顯著影響。此外，GREM1阻斷抗體

對PCa細胞之抑制作用不能被*BMPRII*敲除所覆蓋。然而，FGFR1之敲除可以徹底消除GREM1對PCa之積極作用。總體而言，FGFR/MAPK之活化及GREM1之CPRC促進的作用係不依賴於BMP信號傳導通路的。我們目前的工作確定了GREM1的一個全新功能，並且在FGFR配體中添加了一個新成員。更廣泛地說，FGFR信號通路在膀胱癌、胃癌、肺癌及乳癌等其他腫瘤中亦為關鍵的致癌驅動因子。需要進一步的研究來瞭解GREM1/FGFR/MAPK軸是否參與了其他類型癌症之腫瘤發生及進展。

【0370】 我們發現，藉由免疫染色在GEMM及人PCa樣品中腫瘤上皮細胞都表現GREM1。與此相一致，其他獨立實驗室報導了腫瘤細胞或腫瘤幹細胞在結腸癌及神經膠質瘤中高表現GREM1。然而，Julie B. Sneddon等人分析了774例不同腫瘤病例中*GREM1* RNA之表現，發現結腸癌、肺癌、胰臟癌及乳癌中超過50%之腫瘤基質細胞均為GREM1陽性。Michael Quante等人表示在胃癌模型中腫瘤相關纖維母細胞(CAF)中Gremlin顯著地增加。GREM1對CRPC之促進作用可能不僅藉由自分泌之方式作用於腫瘤細胞，還可能藉由調節腫瘤微環境為PCa細胞在惡劣條件(例如，雄激素剝奪)下之生長及逃逸細胞死亡創造一個適宜的生態位。

【0371】 分泌蛋白為一類重要的藥物靶標。在本研究中，我們開發了一種抗GREM1之單株抗體。基於人PCa細胞株、PDO及PDX之實驗以及*Pbsn-Cre4；PTEN*$^{fl/fl}$*；Trp53*$^{fl/fl}$鼠PCa模型之體內研究，我們證明了抗GREM1抗體具有顯著的抗腫瘤作用。抗GREM1抗體展示出了與ADT對PCa有較強的協同作用。但是，我們不得不考慮到GREM1在其他組織中亦有表現。研究已表明小鼠*GREM1*之習知敲除導致腸道發育異常及造血系統紊亂。在我們的研究中，我們仔細檢查了抗GREM1抗體治療後小鼠

之主要器官，包含腸道。以劑量10 mg/kg腹腔內注射，每週三次，我們未觀察到明顯的毒性作用，而且對主要器官及外周血細胞計數亦無明顯損害。此等觀察結果表明適當的給藥窗口可以避免不必要的副作用。

【0372】 經FDA批准之用於癌症療法之24種抗體藥物中，大多數靶向造血惡性腫瘤中之免疫檢查點蛋白或細胞表面蛋白，少數其他藥物阻斷HER2、EGFR、VEGF或VEGFR以治療少數實體瘤。包括PCa在內的「冷腫瘤」，具有低$CD8^+$細胞毒性T細胞浸潤，對免疫檢查點療法反應差。因此，確認新的抗體藥物治療「冷腫瘤」之新靶標具有重要的臨床意義。我們發現，GREM1/FGFR1/MAPK軸為CRPC之關鍵驅動因子，這不僅為理解去勢抵抗性發展之分子機制提供了見解，而且亦證明了GREM1作為一種新的藥物靶標之直接治療相關性。抗GREM1單株抗體對CRPC之治療具有很大的治療前景。

【0373】

實施例13：14E3可有效減少肺內PCa轉移之形成

為了評估gremlin1抗體對肺內前列腺癌轉移之影響，用組成型表現螢光素酶之質體轉染PC3細胞(ATCC)。自生長之對數階段收集PC3-luc細胞，並與1×10^6細胞懸浮於80ml鹼性培養基(DMEM)中。隨後將細胞懸液心內注射至BALB/C裸鼠心室(上海SLAC實驗動物)。以10mg/kg劑量腹腔注射Gremlin1雜交瘤抗體14E3或同型對照，每週2次，持續3週。每兩天量測一次體重。麻醉小鼠並投與以15mg/kg劑量之D-螢光素(賽默飛世爾(ThermoFisher)，L2916)，持續5min。使用體內成像系統(Caliper IVIS生物發光系統，Caliper LifeScience，美國)採集圖像。如圖19A、圖19B及圖19C之成像所示，14E3對平均輻射強度有明顯抑制作用，但不影響體

重，表明抗Gremlin1之抗體(例如14E3)能顯著降低心內注射之小鼠模型中PCa之轉移。根據圖19D及圖19E中微轉移之統計資訊，14E3可有效減少肺內PCa轉移之形成。

表5. 本申請中提及或使用之序列

SEQ ID NO	序列	註解
1	TYGMA	14E3/Hu14E3-Ha/Hu14E3-Hb/Hu14E3-Hc HCDR1
2	WINTLSGEPTYADDFKG	14E3/Hu14E3-Ha/Hu14E3-Hb/Hu14E3-Hc HCDR2
3	EPMDY	14E3/Hu14E3-Ha/Hu14E3-Hb/Hu14E3-Hc HCDR3
4	KSSQSLLDSDGKTYLS	14E3/Hu14E3-La/Hu14E3-Lb LCDR1
5	LVSKLDS	14E3/Hu14E3-La/Hu14E3-Lb LCDR2
6	WQGAHFPLT	14E3/Hu14E3-La/Hu14E3-Lb LCDR3
7	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGSTFTTYGMAWMKQAPGKGLTWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLKTSANTAYLQINNLKNEDAATYFCAREPMDYWGQGTSVIVSS	14E3 VH
8	DVVMTQTPLTLSITIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLLQRPDQSPKRLISLVSKLDSGVPDRITGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCWQGAHFPLTFGAGTKLELK	14E3 VL
9	CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGACTTCTGGATCTACGTTCACAACCTATGGAATGGCCTGGATGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAACGTGGATGGGCTGGATAAACACCCTCTCTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGAAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACGCGGCTACATATTTCTGTGCACGAGAACCAATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCCTCA	14E3 VHnu
10	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGATTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAATCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAGTTGGTTGTTACAGAGGCCAGACCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTGGTGTCCAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGA	14E3 VLnu

	TCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACAC TGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATTTG GGCATCTATTATTGCTGGCAAGGTGCACATTTTC CGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAG CTGAAA	
11	DYYMN	22F1/Hu22F1-Ha/Hu22F1-Hb/Hu22F1-Hc/Hu22F1-Hd HCDR1
12	DINPKDGDSGYSHKFKG	22F1/Hu22F1-Ha/Hu22F1-Hb/Hu22F1-Hc/Hu22F1-Hd HCDR2
13	GFTTVVARGDY	22F1/Hu22F1-Ha/Hu22F1-Hb/Hu22F1-Hc/Hu22F1-Hd HCDR3
14	KSSQSLLDSDGKTYLN	22F1/Hu22F1-La/Hu22F1-Lb LCDR1
15	LVSKLDS	22F1/Hu22F1-La/Hu22F1-Lb LCDR2
16	WQGTHFPYT	22F1/Hu22F1-La/Hu22F1-Lb LCDR3
17	EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYYM NWLKQSHGKSLEWIGDINPKDGDSGYSHKFKGK ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCASGFTT VVARGDYWGQGTTLTVSS	22F1 VH
18	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGFPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFG GGTKLEIK	22F1 VL
19	GAGGCCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACT GGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTG TAAGGCTTCTGGATACTCGTTCACTGACTACTAC ATGAACTGGCTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAG CCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAAAGAT GGTGATAGTGGTTACAGCCATAAGTTCAAGGGC AAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGC ACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCT GAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGCGGA TTTACCACGGTAGTAGCTAGGGGGGACTACTGG GGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	22F1 VHnu
20	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTG TCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTT GCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG GAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGC CAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATTTGG TGTCTAAACTGGACTCTGGATTCCCTGACAGGT TCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACAC TGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTG GGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTC CGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAA	22F1 VLnu

21	DDYMH	69H5 HCDR1
22	WIDPENGDTEYASKFQG	69H5 HCDR2
23	WATVPDFDY	69H5 HCDR3
24	KSSQSLLNRSNQKNYLA	69H5 LCDR1
25	FTSTRES	69H5 LCDR2
26	QQHYSTPFT	69H5 LCDR3
27	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYM HWVKRRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGK ATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTTWATVP DFDYWGQGTTLTVSS	69H5 VH
28	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNRSN QKNYLAWYQQKPGQSPKLLVHFTSTRESGVPDRF IGSGSGTDFTLTISNLQAEDLADYFCQQHYSTPFT FGSGTKLEIK	69H5 VL
29	GAGGTGCAGCTGCAACAGTCCGGCGCTGAACT GGTGAGGCCTGGAGCCTCCGTGAAGCTGTCCTG CACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACGACTA CATGCACTGGGTGAAGAGGAGGCCTGAGCAGG GCCTGGAGTGGATCGGCTGGATCGACCCCGAGA ACGGCGACACCGAGTACGCCTCCAAGTTCCAG GGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCCTCC AACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCTCCCTGACC TCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCACCACC TGGGCCACCGTGCCCGACTTCGACTACTGGGGA CAGGGCACCACCCTGACCGTGTCCAGC	69H5 VHnu
30	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCTCTCTGG CTATGTCAGTGGGACAGAAAGTGACCATGTCTT GCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGAACAGGTCCA ACCAGAAGAACTACCTGGCTTGGTACCAGCAG AAACCAGGACAGTCTCCTAAGCTGCTGGTGCAT TTTACCTCTACCAGGGAATCCGGAGTGCCAGAT AGATTTATCGGCTCTGGCTCCGGCACAGATTTTA CACTGACCATCTCCAATCTGCAGGCAGAAGATC TGGCTGACTACTTTTGCCAGCAGCACTACTCCA CCCCTTTTACCTTTGGCTCCGGCACCAAGCTGG AGATCAAG	69H5 VLnu
31	DFYMN	56C11 HCDR1
32	DINPNNGGTSYNQKFKG	56C11 HCDR2
33	DPIYYDYDEVAY	56C11 HCDR3
34	RSSQSLVHSNGNTYLH	56C11 LCDR1
35	KVSNRFS	56C11 LCDR2
36	SQSTHVPLT	56C11 LCDR3
37	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDFYM NWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFKGK ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDPIY YDYDEVAYWGQGTLVTVSA	56C11 VH
38	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGN TYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFG	56C11 VL

	AGTKLELK	
39	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGAGCT GGTGAAGCCTGGAGCCTCCGTGAAGATCTCCTG TAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTTCTA CATGAACTGGGTGAAGCAGTCCCACGGCAAGT CCCTGGAGTGGATCGGCGACATCAATCCCAACA ACGGCGGCACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAG GGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGTCCTC CAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGGTCCCTGAC CTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGACCCCATCTACTACGACTACGACGAGGTGGC CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACAGTGT CCGCC	56C11 VHnu
40	GATGTGGTGATGACACAGACACCTCTGTCTCTG CCAGTGTCTCTCGGAGATCAGGCTTCTATCTCTT GCAGATCCTCTCAGTCTCTGGTGCATTCCAACG GAAACACCTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAAC CAGGACAGTCTCCTAAGCTGCTGATCTACAAGG TGTCCAACAGGTTCTCCGGAGTGCCAGATAGAT TTTCCGGATCTGGATCTGGCACCGATTTTACCCT GAAGATCTCTAGAGTGGAAGCAGAGGATCTGG GAGTGTACTTTTGTAGCCAGTCTACCCACGTGC CTCTGACATTTGGAGCAGGAACAAAGCTGGAG CTGAAG	56C11 VLnu
41	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYG MAWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFK GRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREP MDYWGQGTMVTVSS	Hu14E3-Ha VH
42	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGAGCT GAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCACCTACG GCATGGCCTGGATGAGGCAGGCTCCTGGCCAGG GACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCCTGT CCGGCGAACCCACCTACGCCGACGACTTCAAG GGCAGGTTCGTGTTCTCCCTGGACACCAGCGTG TCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGAGCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAT GGTGACCGTGTCCTCC	Hu14E3-Ha VHnu
43	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGM AWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFKG RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREPM DYWGQGTMVTVSS	Hu14E3-Hb VH
44	CAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCT GAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACG GCATGGCCTGGATGAGGCAGGCTCCTGGACAG GGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCCTG TCCGGCGAGCCTACCTACGCCGACGACTTCAAG GGCAGGTTCGCCTTCTCCCTGGACACCTCCGTG	Hu14E3-Hb VHnu

	AGCACCGCCTACCTGCAGATCTCCAGCCTGAAG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGAGCCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAT GGTGACCGTGTCCAGC	
45	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGSTFTTYGM AWMKQAPGQGLTWMGWINTLSGEPTYADDFKG RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREPM DYWGQGTMVTVSS	Hu14E3-Hc VH
46	CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCAGCGAGCTC AAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGAAGGTGTCCTG CAAGGCCAGCGGCTCCACCTTCACCACATACGG CATGGCCTGGATGAAGCAGGCTCCTGGCCAGGG CCTGACCTGGATGGGATGGATCAACACCCTGTC CGGCGAGCCTACCTACGCCGATGACTTCAAGGG CAGGTTCGCCTTCTCCCTGGACACCTCCGTGTC CACCGCTTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGG AGCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCATGG TGACCGTGTCCTCC	Hu14E3-Hc VHnu
47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLSWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGAHFPLTFG QGTKLEIK	Hu14E3-La VL
48	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTATCTGTCTTGGCTGCAGCAGAGA CCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTACCTG GTGTCCAAGCTGGATTCTGGAGTGCCAGATAGA TTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGATTTCACC CTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGT GGGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAGCTCACTT CCCTCTGACATTTGGACAGGGAACAAAGCTGG AGATCAAG	Hu14E3-La VLnu
49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLSWLQQRPGQSPRRLISLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGAHFPLTFG QGTKLEIK	Hu14E3-Lb VL
50	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTATCTGTCTTGGCTGCAGCAGAGA CCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTCCCTG GTGTCTAAGCTGGATTCCGGAGTGCCAGATAGA TTTTCCGGATCTGGATCTGGCACCGATTTTACCC TGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGTG GGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAGCTCACTTC CCTCTGACATTTGGACAGGGAACAAAGCTGGA GATCAAG	Hu14E3-Lb VLnu
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGDSGYSHKFK	Hu22F1-Ha VH

	GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASG FTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	
52	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCTT GTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGATTACTA CATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGTCAAG GTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACCCCAAG GACGGCGACTCCGGCTATTCCCACAAGTTCAAG GGTCGTGTGACCATGACCAGGGACACGTCCACC AGCACCGTGTACATGGAGCTGTCCTCTTTAAGG TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGC GGATTCACCACCGTGGTGGCTAGGGGCGACTAT TGGGGCCAAGGTACCACCGTGACAGTGTCCAG C	Hu22F1-Ha VHnu
53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGDSGYSHKFK GRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASG FTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hb VH
54	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCTT GTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGATTACTA CATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGTCAAG GTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACCCCAAG GACGGCGACTCCGGCTATTCCCACAAGTTCAAG GGTCGTGTGACCATGACCGTGGACAAGTCCACC AGCACCGTGTACATGGAGCTGTCCTCTTTAAGG TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGC GGATTCACCACCGTGGTGGCTAGGGGCGACTAT TGGGGCCAAGGTACCACCGTGACAGTGTCCAG C	Hu22F1-Hb VHnu
55	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGDSGYSHKFK GRVTLTVDKSTSTVYMELRSLRSEDTAVYYCASG FTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hc VH
56	CAAGCTCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGT GAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTT GTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGACTACT ACATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGTCAA GGTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACCCCAA GGACGGCGACAGCGGCTACTCCCACAAGTTCA AGGGTCGTGTGACTTTAACCGTGGACAAGTCCA CCTCCACCGTCTACATGGAGCTGAGGTCTTTAA GGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCTA GCGGCTTCACCACCGTGGTGGCTCGTGGCGATT ACTGGGGACAAGGTACCACCGTGACCGTGTCCT CC	Hu22F1-Hc VHnu
57	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYY MNWLRQAPGQGLEWIGDINPKDGDSGYSHKFKG RATLTVDKSTSTVYMELRSLRSEDTAVYYCASGF TTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hd VH
58	CAAGCTCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT	Hu22F1-Hd VHnu

	GAAAAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTTACCGACTACT ACATGAACTGGCTGAGGCAAGCTCCCGGTCAA GGTCTGGAGTGGATCGGCGATATCAACCCCAAG GACGGCGACTCCGGCTACAGCCATAAGTTCAAG GGTCGTGCCACTTTAACCGTGGACAAGTCCACC AGCACCGTGTACATGGAGCTGAGGTCTTTAAGG TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCC GGCTTCACCACAGTGGTGGCTCGTGGCGACTAT TGGGGCCAAGGTACCACCGTGACCGTGAGCTC C	
59	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTF GGGTKVEIK	Hu22F1-La VL
60	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTACCTGAATTGGCTGCAGCAGAG ACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTACCT GGTGTCCAAGCTGGATTCTGGAGTGCCAGATAG ATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGATTTCACC CTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGT GGGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAACCCACTT CCCTTACACATTTGGAGGAGGCACAAAGGTGG AGATCAAG	Hu22F1-La VLnu
61	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGFPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFG GGTKVEIK	Hu22F1-Lb VL
62	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTG CCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCTCT TGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCCGAC GGAAAGACCTACCTGAATTGGCTGCAGCAGAG ACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATCTACCT GGTGTCCAAGCTGGATTCTGGATTCCCAGATAG ATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGATTTCACC CTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGT GGGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAACCCACTT CCCTTACACATTTGGAGGAGGCACAAAGGTGG AGATCAAG	Hu22F1-Lb VLnu
63	NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSF	BMP-結合環區
64	FSYSVPNTFPQSTESLVHCDS	DAN第63-83號胺基酸
65	MGWSCIILFLVATGVHS	信號肽
66	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAIP PPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTA MPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLK QTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEG SFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPELQPPTKKKRV TRVKQCRCISIDLD	人gremlin 1

67	MNRTAYTVGALLLLLGTLLPTAEGKKKGSQGAIP PPDKAQHNDSEQTQSPPQPGSRTRGRGQGRGTA MPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLK QTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEG SFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPELQPPTKKKRV TRVKQCRCISIDLD	小鼠gremlin 1
68	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAIP PPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTA MPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLK QTIHEEGCNSRTIINRFCYGQC FSYSVPNTFPQSTESLVHCDSCKPKKFTTMMVTL NCPELQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD	嵌合hGREM1
69	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNR GRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFY IPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPEL QPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD	不含信號肽之人Gremlin 1序列
70	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPPQPGSRTR GRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFY IPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPEL QPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD	不含信號肽之人鼠Gremlin 1序列
71	MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEG	人Gremlin 1信號肽
72	MNRTAYTVGALLLLLGTLLPTAEG	小鼠Gremlin 1信號肽
73	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPL PSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSS SVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPG TRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHE RCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRH SVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVC ACPGRDRRTEEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGR ERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPG GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD	p53蛋白
74	MTAIIKEIVS RNKRRYQEDG FDLDLTYIYP NIIAMGFPAE RLEGVYRNNI DDVVRFLDSK HKNHYKIYNL CAERHYDTAK NCRVAQYPF EDHNPPQLEL IKPFCEDLDQ WLSEDDNHVA AIHCKAGKGR TGVMICAYLL RGKFLKAQE ALDFYGEVRT RDKKGVTIPS RRYVYYYSY LLKNHLDYRP VALLFHKMMF ETIPMFSGGT CNPQFVVCQL KVKIYSSNSG PTRREDKFMY FEFPQPLPVC GDIKVEFFHK NKMLKKDKM FHFWVNTFFI PGPEETSEKV ENGSLCDQEI DSICSIERAD NDKEYLVLTL TKNDLDKANK DKANRYFSPN FKVKLYFTKT VEEPSNPEAS SSTSVTPDVS DNEPDHYRYS DTTDSDPENE	PTEN蛋白亞型1

	PFDEDQHTQI TKV	
75	SWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGA PVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDG VQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSS PSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKE TDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKT VKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYK VRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHT YQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFM CKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQIL KTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAG NSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIY CTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHSQMAV HKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSR LSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGK PLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKM LKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLG ACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEY CYNPSHNPEEQLSSKDLVSCAYQVARGMEYLASK KCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHHI DYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDV WSFGVLLWEIFTLGGSPYPGVPVEELFKLLKEGH RMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQ LVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPDTR SSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGL KRR	人FGFR1