



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111683965 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 25

(21) 申请号 201980012164.7

(22) 申请日 2019.02.14

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111683965 A

(43) 申请公布日 2020.09.18

(30) 优先权数据  
1802486.9 2018.02.15 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.08.06

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2019/053726 2019.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/158658 EN 2019.08.22

(73) 专利权人 UCB生物制药有限责任公司  
地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 G·C·G·戴维斯  
S·J·罗伯特斯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

专利代理师 傅宇昌

(51) Int.Cl.  
C07K 16/22 (2006.01)  
A61P 19/00 (2006.01)  
A61P 19/10 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 110099924 A, 2019.08.06  
US 2015158938 A1, 2015.06.11  
Hans-Jörg Sebold等. Inhibition of endogenous antagonists with an engineered BMP-2 variant increases BMP-2 efficacy in rat femoral defect healing. Acta Biomaterialia. 2012, 第3816-3820页, 摘要.

审查员 华菁菁

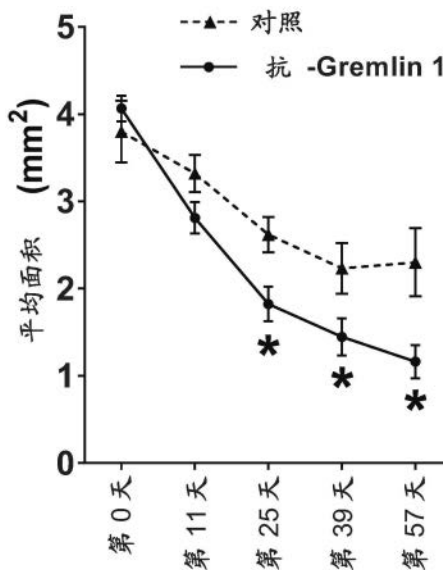
权利要求书1页 说明书33页  
序列表27页 附图7页

(54) 发明名称

用于治疗骨折或骨缺损的gremlin-1抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗骨折或骨缺损的方法。本发明公开了抗-gremlin-1抗体用于在节段性裂隙缺损中加速骨组织的愈合和桥接的有效用途;并且证明了gremlin-1活性抑制剂可以提供经改善的用于治疗或预防骨折不连合的疗法。



1. gremlin-1活性抑制剂在制备药物中的用途,所述药物用于治疗骨折或骨缺损,其中所述抑制剂为抗-gremlin-1抗体或者所述抗体的在功能上有活性的片段,其中所述抗体或者所述抗体的在功能上有活性的片段包含作为HCDR1的SEQ ID NO: 3或4的序列、作为HCDR2的SEQ ID NO: 5的序列、作为HCDR3的SEQ ID NO: 6的序列、作为LCDR1的SEQ ID NO: 7的序列、作为LCDR2的SEQ ID NO: 8的序列和作为LCDR3的SEQ ID NO: 9的序列。

2. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体的在功能上有活性的片段为Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或scFv。

3. 根据权利要求1或2的用途,其中所述抗体或者所述抗体的在功能上有活性的片段包含SEQ ID NO: 10的重链可变区(HCVR)和SEQ ID NO: 11的轻链可变区(LCVR)。

4. 根据权利要求1或2的用途,其中所述抗体或者所述抗体的在功能上有活性的片段包含:包含与SEQ ID NO: 10的序列具有至少95%同一性的序列的重链可变区,和包含与SEQ ID NO: 11的序列具有至少95%同一性的序列的轻链可变区。

5. 根据权利要求1的用途,其中所述骨折或骨缺损为延迟连合性或不连合性骨折。

6. 根据权利要求1的用途,其中所述骨折或骨缺损与影响骨完整性的疾病相关联。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述影响骨完整性的疾病为骨质疏松症、成骨不全、糖尿病、佩吉特骨病、类风湿性关节炎、强直性脊椎炎、多发性骨髓瘤、原发性骨癌、转移至骨的癌症、弥漫性特发性骨骼骨肥厚、骨髓炎、肾疾病、迪谢纳肌营养不良或重型地中海贫血。

## 用于治疗骨折或骨缺损的gremlin-1抑制剂

[0001] 本发明涉及用于治疗骨折或骨缺损的方法。本发明公开了抗-gremlin-1抗体用于在节段性裂隙缺损中加速骨组织的愈合和桥接的有效用途；并且证明了gremlin-1活性抑制剂可以提供经改善的用于治疗或预防骨折不连合的疗法。

### [0002] 发明背景

[0003] 骨折是骨组织中的破裂或断裂，并且可以是创伤性损伤（例如跌倒或碰撞）的结果，但是也可以作为影响骨完整性的疾病的结果而出现。

[0004] 非稳定型骨折通过软骨内骨化过程而愈合，其通过血凝块形成或血肿来开始。这与调节免疫细胞和周围的骨骼干细胞群体的免疫应答相偶联。随后，通过各种生长因子（包括转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Cho等人, 2002)、成纤维细胞生长因子 (FGF) (Schmid等人, 2009) 和骨形态发生蛋白 (BMP) (Yu等人, 2010)) 的作用，血肿被经矿化的软骨骨痂所替代。通过破骨细胞和成骨细胞的作用，经矿化的骨痂被编织骨所替代。最终的重塑阶段牵涉编织骨被板层骨替代。取决于患者的年龄和疾病状态，该过程的完成可以花上许多年。

[0005] 通常，骨折在临床上通过稳定化（经由使用支持物诸如夹板、铸件或支具）来治疗。在牵涉复杂骨折的极端情况下，外科手术干预可能是需要的，并且牵涉使用直接附着至骨的内部和外部固定器。即使有这些措施，在大约10%的患者中，组织修复过程仍是不足的 (Einhorn等人, 2014)，这导致延迟的骨愈合（在骨折后6个月未能达到连合）或不连合。不连合被定义为在9个月之内不完全愈合，并且组合有在连续三个月中未观察到与骨折愈合相关联的放射学特征 (Buza等人, 2016)。目前的用于修复不连合性骨折和危重骨缺损的外科手术技术在可得材料的数量和质量方面经常受到限制。通常使用的治疗牵涉自体或同种异体移植，然而这些分别带来供者部位发病 (Goulet等人, 1997) 和感染 (Bostrom等人, 2005) 的另外风险。

[0006] 骨缺损是由于创伤或疾病而引起的骨丢失。

[0007] 目前对于骨折和骨缺损的经改善的治疗存在大的未满足的医学需求。因此，本发明的目标是提供新的用于治疗骨折或骨缺损的方法。

[0008] 本发明提供了gremlin-1活性抑制剂，其用于在治疗骨折或骨缺损中使用。本发明公开了抗-gremlin-1抗体用于在节段性裂隙缺损中加速骨组织的愈合和桥接的有效用途；并且证明了gremlin-1活性抑制剂可以提供经改善的用于治疗或预防骨折不连合的疗法。

### [0009] 发明描述

[0010] 除非另外定义，在本文中所使用的科学和技术术语具有与本领域技术人员通常所理解的相同的含义。在本文中所提及的所有出版物都通过提及而合并入本文。

[0011] 将会意识到的是，可以将本文中所描述的任何实施方案进行组合。

[0012] 本发明提供了gremlin-1活性抑制剂，其用于在治疗骨折或骨缺损中使用。本发明还提供了gremlin-1活性抑制剂在制备药物中的用途，所述药物用于治疗骨折或骨缺损。本发明进一步提供了用于治疗骨折或骨缺损的方法，其包括施用治疗有效量的gremlin-1活性抑制剂。

[0013] Gremlin-1 (也称为Drm和CKTSF1B1) 为184个氨基酸的糖蛋白，其构成半胱氨酸结

分泌型蛋白的DAN家族的一部分(尤其与Cerberus和Dan一起)。Gremlin结合并且抑制BMP-2、4和7传导信号的能力,与经记录的可能通过VEGFR2的激动的促血管生成作用一起。Gremlin-1的主要作用是在发育中,其中它在肾脏形成期间和在肢芽形成期间是至关重要的。

[0014] 已知骨形态发生蛋白(BMP)信号传导控制软骨内骨形成,其中Gremlin 1(GREM1)通过其与BMP2、BMP4和BMP7的结合而成为该途径的天然拮抗物之一(Hsu等人,1998)。在成骨细胞中GREM1条件性缺失导致BMP信号传导/活性的敏化和增强的体内骨形成(Gazzerro等人,2007),而在相同细胞类型中的条件性过表达引起骨质减少和自发性骨折(Gazzerro等人,2005)。此外,虽然在BL6背景下整体敲除是胚胎致死性的,但是在C57BL/6/FVB混合型遗传背景下49%的幼鼠在出生后存活超过24小时,并且虽然发育性骨骼缺陷大量存在,但是可以观察到升高的骨形成率(Canalís等人,2012)。尽管知晓GREM1的该发育功能,但是没有数据暗示单独的该蛋白质的抑制将会增强生后骨折修复。实际上,虽然软骨内骨形成是在胚胎阶段时骨骼发生的主要机制,但是当与生后骨折修复相比较时,调节细胞募集的机制是不同的过程(Ferguson等人,1999)。炎症的作用已被指出是在成人骨修复中的关键因素,因此不能简单地将控制骨骼发生过程的发育因素外推至生后修复机制。

[0015] 在本发明中所使用的术语“Gremlin-1”典型地具有在UniProt条目060565中所示的序列(SEQ ID NO:1)。术语“Gremlin-1”也可以是指这样的Gremlin-1多肽,其:

[0016] (a) 包含具有或不具有N-末端信号肽的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由之组成,即可以包含SEQ ID NO:21中所显示的成熟肽序列或由之组成;或者

[0017] (b) 是相对于具有或不具有N-末端信号肽(SEQ ID NO:21中所显示的)的SEQ ID NO:1的氨基酸序列而言具有一个或多个氨基酸置换、修饰、缺失或插入的衍生物,其保留了Gremlin-1的活性,例如SEQ ID NO:20的序列,

[0018] (c) 其变体,此类变体典型地保留了与SEQ ID NO:1(或SEQ ID NO:20或21)的至少大约60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%或95%同一性(或甚至大约96%、97%、98%或99%同一性)。换言之,此类变体可以保留与SEQ ID NO:1的大约60%-大约99%同一性,合适地与SEQ ID NO:1的大约80%-大约99%的同一性,更合适地与SEQ ID NO:1的大约90%-大约99%同一性,和最合适地与SEQ ID NO:1的大约95%-大约99%同一性。下面进一步描述变体。

[0019] 如下面进一步所讨论的,残基号典型地基于SEQ ID NO:1的序列来进行引用。然而,技术人员可以容易地将残基编号外推至衍生物或变体序列,如上面所讨论的那样。在引用残基号时,本发明也包括在变体或衍生物序列上的这些残基。

[0020] 本发明的发明人已经结晶出了单独的和与称为Ab 7326的抗体(Fab片段)相复合的人Gremlin-1。Gremlin-1的结晶允许测定在BMP结合位点中的推定残基。进一步地,与Ab 7326(其是别构抑制性抗体)一起结晶允许测定在抗体表位中的残基(WO 2018/115017A2)。结合该表位的抗体具有作为在治疗骨折或骨缺损中的治疗性试剂的潜力。

[0021] Gremlin-1活性抑制剂

[0022] 根据本发明的gremlin-1活性抑制剂为降低或阻断gremlin-1的活性的试剂。根据本发明的抑制剂可以部分地或完全地抑制gremlin-1活性。本发明中使用的抑制剂包括但不限于能够与gremlin-1或与编码gremlin-1的核酸分子相结合或者能够抑制gremlin-1的

表达的抑制剂。此类抑制剂可以为(但不限于)蛋白质、多肽、肽、肽模拟物、核酸(例如,DNA、RNA、反义RNA和siRNA)、碳水化合物、脂质和小分子。

[0023] 在一个实施方案中,所述gremlin-1活性抑制剂为抗-gremlin-1抗体或者其在功能上有活性的片段、变体或衍生物。

[0024] 在本文中所提及的术语“抗体”包括完整抗体以及其任何抗原结合片段(即,“抗原结合部分”)或单链。抗体或免疫球蛋白典型地是指至少包含通过二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白,或者其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为HCVR或V<sub>H</sub>)和重链恒定区构成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或V<sub>L</sub>)和轻链恒定区构成。重链和轻链可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区可以进一步细分为高变区(称为互补性决定区(CDR)),其间插有更保守的区域(称为构架区(FR))。

[0025] 抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞),和经典补体的第一组分(C1q))的结合。

[0026] 用于在本发明中使用的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,并且典型地将会是单克隆抗体。用于在本发明中使用的抗体可以是嵌合抗体、CDR-移植型抗体、纳米抗体(nanobody)、人抗体或人源化抗体或者其中任何一种的抗原结合部分。

[0027] 多克隆抗体可以通过常规方法来产生,例如用目的抗原免疫接种合适的动物。随后可以从动物中取出血液并且纯化免疫球蛋白级分。

[0028] 针对Gremlin-1的抗体可以通过下述方式来获得:在动物的免疫接种是必需的情况下,向动物例如非人动物施用所述多肽,其中使用众所周知的和常规的实验方案,参见例如Handbook of Experimental Immunology,D.M.Weir(编辑),第4卷,Blackwell Scientific Publishers,Oxford,England,1986。可以对许多温血动物,例如兔、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、牛、骆驼、美洲驼或猪进行免疫接种。但是,兔、小鼠和大鼠通常是最合适的。

[0029] 单克隆抗体可以通过本领域中已知的任何方法来制备,例如杂交瘤技术(Kohler& Milstein,1975,Nature,256:495-497)、三源杂交瘤技术、人B-细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,1983,Immunology Today,4:72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,第77-96页,Alan R Liss,Inc.,1985)。

[0030] 用于在本发明中使用的抗体也可以通过使用单淋巴细胞抗体方法来产生,所述方法通过克隆和表达从为了特异性抗体的产生而选择出的单个淋巴细胞中产生的免疫球蛋白可变区cDNA,这通过例如由Babcock,J.等人,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93(15):7843-78481;WO 92/02551;WO 2004/051268;和WO 2004/106377所描述的方法。

[0031] 用于在本发明中使用的抗体也可以通过使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法来产生,并且包括由下列文献所公开的那些:Brinkman等人(J.Immunol.Methods,1995,182:41-50)、Ames等人(J.Immunol.Methods,1995,184:177-186)、Kettleborough等人(Eur.J.Immunol.1994,24:952-958)、Persic等人(Gene,1997 1879-18)、Burton等人(Advances in Immunology,1994,57:191-280);以及WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401;以及US 5,698,426、US 5,223,409、US 5,403,484、US 5,580,717、US 5,427,908、US 5,750,753、US 5,821,047、US 5,571,698、US 5,427,908、US 5,516,637、US 5,780,225、US 5,658,727、US 5,733,743和US 5,969,108。

[0032] 完全人的抗体为这样的那些抗体,其中重链和轻链两者的可变区和恒定区(当存在时)都是人来源的,或者与人来源的序列基本上相同,但不必需来自相同抗体。完全人的抗体的例子可以包括例如通过上面所描述的噬菌体展示方法所产生的抗体,和由其中鼠类免疫球蛋白可变区基因和任选地恒定区基因已被其人对对应物替代的小鼠所产生的抗体,例如如在EP 0546073、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、US 5,770,429、EP 0438474和EP 0463151中所概括地描述的。

[0033] 备选地,根据本发明的抗体可以通过这样的方法来产生,所述方法包括:用Gremlin-1免疫原免疫接种非人哺乳动物;从所述哺乳动物中获得抗体制备物;从中得到识别Gremlin-1的单克隆抗体。

[0034] 用于在本发明中使用的抗体分子可以包含具有全长重链和轻链的完全抗体分子或者其片段或抗原结合部分。术语抗体的“抗原结合部分”是指保留了选择性地与抗原相结合的能力的抗体的一个或多个片段。已显示,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。所述抗体及其片段和抗原结合部分可以为(但不限于)Fab,经修饰的Fab,Fab',经修饰的Fab',F(ab')<sub>2</sub>,Fv,单结构域抗体(例如,VH或VL或VHH),scFv,二价、三价或四价抗体,双-scFv,双链抗体,三链抗体,四链抗体,和上面任何一个的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法是本领域中众所周知的(参见例如Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。用于在本发明中使用的其他抗体片段包括在国际专利申请WO 2005/003169、WO 2005/003170和WO 2005/003171中所描述的Fab和Fab'片段,和在国际专利申请WO 2009/040562中所描述的Fab-dAb片段。多价抗体可以包含多特异性,或者可以是单特异性的(参见例如WO 92/22853和WO 2005/113605)。这些抗体片段可以通过使用本领域技术人员已知的常规技术来获得,并且可以就以与完整抗体相同的方式的有用性来筛选所述片段。

[0035] 在一个实例中,用于在本发明中使用的在功能上有活性的抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或scFv。

[0036] 考虑到可能需要的效应功能,可以选择用于在本发明中使用的抗体分子的恒定区结构域,如果存在的话。例如,所述恒定区结构域可以为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM结构域。特别地,当需要抗体效应功能时,可以使用人IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型的。备选地,当不需要抗体效应功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型。在一个实例中,所述同种型为IgG4P,如由Angal S.等人,Mol Immunol,Vol 30(1),第105-108页,1993所描述的。

[0037] 可以通过重组手段来制备、表达、产生或分离用于在本发明中使用的抗体,例如(a)从对于目的免疫球蛋白基因来说是转基因或转染色体的动物或由其制备的杂交瘤中分离抗体,(b)从经转化从而表达目的抗体的宿主细胞中(例如从转染瘤中)分离抗体,(c)从重组的组合抗体文库中分离抗体,和(d)通过牵涉将免疫球蛋白基因序列剪接为其他DNA序列的任何其他手段来制备、表达、产生或分离抗体。

[0038] 用于在本发明中使用的抗体可以为抗体或人源化抗体。在本文中所使用的术语“人抗体”意欲包括这样的抗体,其具有其中构架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。进一步地,如果所述抗体包含恒定区,那么所述恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。用于在本发明中使用的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列所编码的氨基酸

残基(例如,通过体外随机或位点专一诱变或者通过体内体细胞突变而引入的突变)。然而,在本文中所使用的术语“人抗体”不意欲包括这样的抗体,其中源自另一哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已被移植到人构架序列上。

[0039] 这样的人抗体可以为人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可以由杂交瘤来产生,所述杂交瘤包括与无限增殖化细胞相融合的从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞。

[0040] 人抗体可以通过人淋巴细胞的体外免疫接种以及随后用EB病毒转化淋巴细胞来制备。

[0041] 术语“衍生物”是指所述抗体的任何经修饰的形式,例如所述抗体与另一试剂或效应分子的缀合物。

[0042] 效应分子可以包含单个效应分子,或者两个或更多个这样的分子,其如此地进行连接以便形成可以附着至用于在本发明中使用的抗体的单个部分。在希望获得与效应分子相连接的抗体片段的情况下,这可以通过标准的化学或重组DNA程序来制备,其中将抗体片段直接地或通过偶联试剂连接至效应分子。用于将此类效应分子缀合至抗体的技术是本领域中众所周知的(参见,Hellstrom等人,Controlled Drug Delivery,第2版,Robinson等人,编辑,1987,第623-53页;Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.,62:119-58;和Dubowchik等人,1999,Pharmacology and Therapeutics,83,67-123)。特别的化学程序包括例如在WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476和WO 2003/031581中所描述的那些。备选地,在所述效应分子为蛋白质或多肽的情况下,所述连接可以通过使用重组DNA程序来实现,例如如在WO 86/01533和EP 0392745中所描述的那样。

[0043] 所述效应分子可以增加所述抗体的体内半寿期,和/或降低所述抗体的免疫原性,和/或增强抗体跨越上皮屏障至免疫系统的递送。合适的该类型的效应分子的例子包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,例如在WO 2005/117984中所描述的那些。

[0044] 术语“人源化抗体”意欲是指CDR-移植型抗体分子,其中源自另一哺乳动物物种例如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人构架序列上。另外的构架区修饰可以在人构架序列之内进行。

[0045] 在本文中所使用的术语“CDR-移植型抗体分子”是指这样的抗体分子,其中重链和/或轻链包含一个或多个被移植到受者抗体(例如,人抗体)的重链和/或轻链可变区构架中的来自供者抗体(例如,鼠类或大鼠单克隆抗体)的CDR(包括,如果希望,一个或多个经修饰的CDR)。关于综述,参见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。在一个实施方案中,不是转移整个CDR,而是仅将来自任一个在本文中上面所描述的CDR的特异性决定残基中的一个或多个转移至人抗体构架(参见例如,Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。在一个实施方案中,仅将来自一个或多个在本文中上面所描述的CDR的特异性决定残基转移至人抗体构架。在另一个实施方案中,仅将来自每一个在本文中上面所描述的CDR的特异性决定残基转移至人抗体构架。

[0046] 当移植CDR或特异性决定残基时,考虑到所述CDR所源自的供者抗体的类别/类型,可以使用任何合适的受者可变区构架序列,包括小鼠、灵长类和人构架区。合适地,用于在本发明中使用的CDR-移植型抗体具有这样的可变结构域,其包含人受者构架区以及在上面

所描述的CDR或特异性决定残基中的一个或多个。因此,在一个实施方案中提供了这样的中和性CDR-移植型抗体,其中可变结构域包含人受者构架区和非人供者CDR。

[0047] 可以在本发明中使用的人构架的例子为KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY和POM (Kabat等人,同上)。例如,KOL和NEWM可以用于重链,REI可以用于轻链,以及EU、LAY和POM可以用于重链和轻链两者。备选地,可以使用人种系序列;这些例如在<http://www.vbase2.org/>处是可得的(参见Retter等人,Nucl.Acids Res. (2005) 33(增刊1),D671-D674)。

[0048] 在用于在本发明中使用的CDR-移植型抗体中,受者重链和轻链不是必需需要源自相同的抗体,并且如果希望,可以包含具有源自不同链的构架区的复合链。

[0049] 此外,在用于在本发明中使用的CDR-移植型抗体中,构架区不需要具有与受者抗体的那些完全相同的序列。例如,可以将不常见的残基改变为对于那种受者链类别或类型来说更经常出现的残基。备选地,可以改变在受者构架区中的所选择的残基,从而使得它们相应于在供者抗体中的相同位置处发现的残基(参见Reichmann等人,1998,Nature,332,323-324)。此类改变应当保持在对于恢复供者抗体的亲和力来说必需的最小程度。用于选择可能需要改变的在受者构架区中的残基的实验方案阐述在WO 91/09967中。

[0050] 本领域技术人员还将会理解,抗体可以经历各种各样的翻译后修饰。这些修饰的类型和程度经常取决于用于表达所述抗体的宿主细胞系以及培养条件。此类修饰可以包括在糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬氨酸脱酰胺中的变化。一种常见的修饰是羧基末端碱性残基(例如赖氨酸或精氨酸)的丢失,其归因于羧肽酶的作用(如在Harris,RJ.Journal of Chromatography705:129-134,1995中所描述的)。

[0051] 在一个实施方案中,所述抗体重链包含CH1结构域,并且所述抗体轻链包含CL结构域( $\kappa$ 或 $\lambda$ )。

[0052] 生物分子,例如抗体或片段,包含酸性和/或碱性官能团,由此给予该分子以正或负的净电荷。总的“所观察到的”电荷的量将会取决于该实体的绝对氨基酸序列、在3D结构中荷电基团的局部环境和该分子的环境条件。等电点(pI)是特定分子或表面不携带净电荷时所处的pH。在一个实施方案中,根据本公开内容的抗体或片段具有至少7的等电点(pI)。在一个实施方案中,所述抗体或片段具有至少8,例如8.5、8.6、8.7、8.8或9的等电点。在一个实施方案中,所述抗体的pI为8。可以使用程序例如\*\*ExPASy [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)(参见Walker,The Proteomics Protocols Handbook,Humana Press (2005),571-607)来预测所述抗体或片段的等电点。

[0053] 用于在本发明中使用的抗体可以包含SEQ ID NO:4至6中的至少一个、至少两个或所有三个重链CDR序列(分别为HCDR1/HCDR2/HCDR3)。这些是实施例的Ab7326抗体的HCDR1/HCDR2/HCDR3序列,其通过使用Kabat方法学来确定。

[0054] 用于确定CDR序列的Kabat和Chothia方法(以及其他技术)是本领域中众所周知的。CDR序列可以通过使用任何合适的方法来确定,并且在本发明中,虽然典型地采用Kabat,但是也可以使用其他技术。在本情形下,SEQ ID NO:3表示Ab7326 HCDR1序列,如通过使用组合式Chothia&Kabat定义所确定的。

[0055] 用于在本发明中使用的抗体可以包含SEQ ID NO:7至9中的至少一个、至少两个或所有三个轻链CDR序列(分别为LCDR1/LCDR2/LCDR3)。这些是Ab7326的LCDR1/LCDR2/LCDR3

序列,通过使用Kabat方法学。

[0056] 在一个实施方案中,所述抗体至少包含SEQ ID NO:6的HCDR3序列。

[0057] 典型地,所述抗体包含至少一个选自SEQ ID NO:4至6的重链CDR序列和至少一个选自SEQ ID NO:7至9的轻链CDR序列。所述抗体可以包含至少两个选自SEQ ID NO:4至6的重链CDR序列和至少两个选自SEQ ID NO:7至9的轻链CDR序列。典型地,所述抗体包含SEQ ID NO:4至6的所有三个重链CDR序列(分别为HCDR1/HCDR2/HCDR3)和SEQ ID NO:7至9的所有三个轻链CDR序列(分别为LCDR1/LCDR2/LCDR3)。所述抗体可以为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

[0058] 所述抗体可以包含SEQ ID NO:10或12的重链可变区(HCVR)序列(Ab7326变体1和2的HCVR)。所述抗体可以包含SEQ ID NO:11或13的轻链可变区(LCVR)序列(Ab7326变体1和2的LCVR)。所述抗体优选地包含SEQ ID NO:10或12的重链可变区序列和SEQ ID NO:11或13的轻链可变区序列(尤其是SEQ ID NO:10/11或12/13的HCVR/LCVR对)。

[0059] Ab7326变体1和2的差异在于如下的在重链可变区中的单个氨基酸和在轻链可变区中的单个氨基酸:

[0060] • 重链可变区变体1在位置6处具有谷氨酸(E)(SEQ ID NO:10),

[0061] • 重链可变区变体2在位置6处具有谷氨酰胺(Q)(SEQ ID NO:12),

[0062] • 轻链可变区变体1在位置7处具有丝氨酸(S)(SEQ ID NO:11),

[0063] • 轻链可变区变体2在位置7处具有苏氨酸(T)(SEQ ID NO:13)。

[0064] 因此,在一个实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:10的重链可变区(HCVR)序列,其中在位置6处的谷氨酸残基被置换为谷氨酰胺残基(E6Q),其中残基编号按照SEQ ID NO:10。

[0065] 在一个实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:12的重链可变区(HCVR)序列,其中在位置6处的谷氨酰胺残基被置换为谷氨酸残基(Q6E),其中残基编号按照SEQ ID NO:12。

[0066] 在一个实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:11的轻链可变区(LCVR)序列,其中在位置7处的丝氨酸残基被置换为苏氨酸残基(S7T),其中残基编号按照SEQ ID NO:11。

[0067] 在一个实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:13的轻链可变区(LCVR)序列,其中在位置7处的苏氨酸残基被置换为丝氨酸残基(T7S),其中残基编号按照SEQ ID NO:13。

[0068] 在一个实施方案中,所述抗体包含作为HCDR1的SEQ ID NO:3或4的序列、作为HCDR2的SEQ ID NO:5的序列、作为HCDR3的SEQ ID NO:6的序列、作为LCDR1的SEQ ID NO:7的序列、作为LCDR2的SEQ ID NO:8的序列和作为LCDR3的SEQ ID NO:9的序列;并且其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:10的序列具有至少95%同一性(例如,至少95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:11的序列具有至少95%同一性(例如,至少95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

[0069] 在一个实施方案中,所述抗体包含作为HCDR1的SEQ ID NO:3或4的序列、作为HCDR2的SEQ ID NO:5的序列、作为HCDR3的SEQ ID NO:6的序列、作为LCDR1的SEQ ID NO:7的序列、作为LCDR2的SEQ ID NO:8的序列和作为LCDR3的SEQ ID NO:9的序列;并且其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:12的序列具有至少95%同一性(例如,至少95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:13的序列具有至少95%同一性(例如,至少95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

- [0070] 所述抗体可以包含下列的重链(H-链)序列:
- [0071] SEQ ID NO:14,小鼠全长IgG1重链变体1,或者
- [0072] SEQ ID NO:28,小鼠全长IgG1重链变体2,或者
- [0073] SEQ ID NO:30,人全长IgG1重链变体1,或者
- [0074] SEQ ID NO:16,人全长IgG1重链变体2,或者
- [0075] SEQ ID NO:22,人全长IgG4P重链变体1,或者
- [0076] SEQ ID NO:34,人全长IgG4P重链变体2,或者
- [0077] SEQ ID NO:18,Fab重链变体1,或者
- [0078] SEQ ID NO:32,Fab重链变体2。
- [0079] 所述抗体可以包含下列的轻链(L-链)序列:
- [0080] SEQ ID NO:15,小鼠全长IgG1轻链变体1,或者
- [0081] SEQ ID NO:29,小鼠全长IgG1轻链变体2,或者
- [0082] SEQ ID NO:31,人全长IgG1轻链变体1,或者
- [0083] SEQ ID NO:17,人全长IgG1轻链变体2,或者
- [0084] SEQ ID NO:23,人全长IgG4P轻链变体1,或者
- [0085] SEQ ID NO:35,人全长IgG4P轻链变体2,或者
- [0086] SEQ ID NO:19,Fab轻链变体1,或者
- [0087] SEQ ID NO:33,Fab轻链变体2。
- [0088] 在一个实施方案中,所述抗体包含下列的重链/轻链序列对:
- [0089] SEQ ID NO:14/15,小鼠全长IgG1变体1,或者
- [0090] SEQ ID NO:28/29,小鼠全长IgG1变体2,或者
- [0091] SEQ ID NO:30/31,人全长IgG1变体1,或者
- [0092] SEQ ID NO:16/17,人全长IgG1变体2,或者
- [0093] SEQ ID NO:22/23,人全长IgG4P变体1,或者
- [0094] SEQ ID NO:34/35,人全长IgG4P变体2,或者
- [0095] SEQ ID NO:18/19,Fab轻链变体1,或者
- [0096] SEQ ID NO:32/33,Fab轻链变体2。
- [0097] 相应序列的变体形式可以互换。例如,所述抗体可以包含下列的重链/轻链序列对:
- [0098] SEQ ID NO:14/29,小鼠全长IgG1重链变体1/轻链变体2,或者
- [0099] SEQ ID NO:28/15,小鼠全长IgG1重链变体2/轻链变体1,或者
- [0100] SEQ ID NO:30/17,人全长IgG1重链变体1/轻链变体2,或者
- [0101] SEQ ID NO:16/31,人全长IgG1重链变体2/轻链变体1,或者
- [0102] SEQ ID NO:22/35,人全长IgG4P重链变体1/轻链变体2,或者
- [0103] SEQ ID NO:34/23,人全长IgG4P重链变体2/轻链变体1,或者
- [0104] SEQ ID NO:18/33,Fab重链变体1/轻链变体2,或者
- [0105] SEQ ID NO:32/19,Fab重链变体2/轻链变体1。
- [0106] 所述抗体可以为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。
- [0107] 备选地,所述抗体可以为或者可以包含上面所记述的特定序列之一的变体。例如,

变体可以为任何上述氨基酸序列的置换、缺失或添加变体。

[0108] 变体抗体可以包含相对于上面所讨论的特定序列而言的1、2、3、4、5、直至10、直至20或更多个(典型地,直至最大50个)氨基酸置换和/或缺失。“缺失”变体可以包含单个氨基酸的缺失,小的氨基酸组(例如2、3、4或5个氨基酸)的缺失,或者更大氨基酸区域的缺失,例如特定氨基酸结构域或其他特征的缺失。“置换”变体典型地牵涉一个或多个氨基酸被替换为相同数目的氨基酸以及进行保守氨基酸置换。例如,氨基酸可以被置换为具有相似特性的备选氨基酸,例如另一个碱性氨基酸、另一个酸性氨基酸、另一个中性氨基酸、另一个荷电氨基酸、另一个亲水氨基酸、另一个疏水氨基酸、另一个极性氨基酸、另一个芳族氨基酸或另一个脂族氨基酸。可以用于选择合适的取代基的20种主要氨基酸的一些特性如下:

[0109] 表1:氨基酸特性

[0110]	<b>Ala</b>	脂族的、疏水的、中性的	<b>Met</b>	疏水的、中性的
	<b>Cys</b>	极性的、疏水的、中性的	<b>Asn</b>	极性的、亲水的、中性的
	<b>Asp</b>	极性的、亲水的、荷电的(-)	<b>Pro</b>	疏水的、中性的
	<b>Glu</b>	极性的、亲水的、荷电的(-)	<b>Gln</b>	极性的、亲水的、中性的
	<b>Phe</b>	芳族的、疏水的、中性的	<b>Arg</b>	极性的、亲水的、荷电的(+)
	<b>Gly</b>	脂族的、中性的	<b>Ser</b>	极性的、亲水的、中性的
	<b>His</b>	芳族的、极性的、亲水的、荷电的(+)	<b>Thr</b>	极性的、亲水的、中性的
	<b>Ile</b>	脂族的、疏水的、中性的	<b>Val</b>	脂族的、疏水的、中性的
	<b>Lys</b>	极性的、亲水的、荷电的(+)	<b>Trp</b>	芳族的、疏水的、中性的
	<b>Leu</b>	脂族的、疏水的、中性的	<b>Tyr</b>	芳族的、极性的、疏水的

[0111] “衍生物”或“变体”通常包括那些,其中代替天然出现的氨基酸,出现在序列中的氨基酸为其结构类似物。在序列中所使用的氨基酸也可以是经衍生化的或经修饰的,例如经标记的,条件是所述抗体的功能没有显著地不利地受到影响。

[0112] 上面所描述的衍生物和变体可以在所述抗体的合成期间或通过产生后修饰来制备,或者当所述抗体以重组形式时,通过使用已知的位点专一诱变、随机诱变或者核酸的酶促切割和/或连接的技术来制备。

[0113] 变体抗体可以具有与在本文中所公开的氨基酸序列(特别是HCVR/LCVR序列以及H-链和L-链序列)具有多于大约60%,或多于大约70%,例如75%或80%,典型地多于大约85%,例如多于大约90%或95%氨基酸同一性的氨基酸序列。进一步地,所述抗体可以为这样的变体,其与在本文中所公开的HCVR/LCVR序列以及H-链和L-链序列具有多于大约60%,或多于大约70%,例如75%或80%,典型地多于大约85%,例如多于大约90%或95%氨基酸同一性,而同时保留了对于这些序列所公开的精确CDR。变体可以保留与在本文中所公开的HCVR/LCVR序列以及H-链和L-链序列的至少大约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性(在一些情况下,同时保留精确的CDR)。

[0114] 典型地,变体保留大约60%-大约99%同一性,大约80%-大约99%同一性,大约

90% - 大约99%同一性,或大约95% - 大约99%同一性。该氨基酸同一性水平可以见于跨越相关SEQ ID NO序列的全长或在该序列的一部分上,例如跨越大约20、30、50、75、100、150、200或更多个氨基酸,取决于全长多肽的大小。

[0115] 与氨基酸序列相关联,“序列同一性”是指当使用ClustalW (Thompson等人,1994,同上)以下列参数进行评估时,具有所陈述的值的序列:

[0116] 成对比对参数-方法:精确,矩阵:PAM,缺口开放罚分:10.00,缺口延伸罚分:0.10;

[0117] 多重比对参数-矩阵:PAM,缺口开放罚分:10.00,关于延迟的%同一性:30,惩罚末端缺口:开,缺口分开距离:0,负矩阵:无,缺口延伸罚分:0.20,残基特异性缺口罚分:开,亲水缺口罚分:开,亲水残基:GPSNDQEK R。在特定残基处的序列同一性意欲包括只是被衍生化了的相同残基。

[0118] 因此,提供了具有特定序列的抗体以及保持这些链的功能或活性的衍生物和变体用于在本发明中使用。

[0119] 在本文中所使用的“衍生物”意欲包括反应性衍生物,例如硫羟基选择性的反应性基团例如马来酰亚胺。所述反应性基团可以直接地或通过连接体区段连接至聚合物。将会意识到的是,此类基团的残基在一些情况下将会作为在抗体片段和聚合物之间的连接基团而成为产物的一部分。

[0120] 所述聚合物可以为合成的或天然出现的聚合物,例如任选地经取代的直链或支化链的聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧亚烷基聚合物,或者支化或非支化的多糖,例如同多糖或杂多糖。

[0121] 可以在合成聚合物上存在的特别的任选的取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基基团。

[0122] 合成聚合物的特别的例子包括任选地经取代的直链或支化链的聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇或其衍生物,尤其是任选地经取代的聚乙二醇例如甲氧基聚乙二醇或其衍生物。

[0123] 特别的天然出现的聚合物包括乳糖、直链淀粉、右旋糖酐、糖原或其衍生物。

[0124] 聚合物的大小可以按所希望的进行变动,但通常将会在500Da至50000Da,例如5000至40000Da,例如20000至40000Da的平均分子量范围内。特别地,可以基于所想要的产物的用途,例如定位至某些组织的能力或延长循环半寿期的能力,来选择聚合物大小(关于综述,可参见Chapman,2002,Advanced Drug Delivery Reviews,54,531-545)。因此,例如,在产物意欲离开循环并穿透组织的情况下,可能有利的是使用小分子量聚合物(例如,具有大约5000Da的分子量)。对于其中产物保留在循环中的应用,可能有利的是使用较高分子量聚合物(例如,具有在20000Da至40000Da的范围内的分子量)。

[0125] 合适的聚合物包括聚亚烷基聚合物,例如聚乙二醇,或尤其是甲氧基聚乙二醇或其衍生物,其尤其具有在大约15000Da至大约40000Da的范围内的分子量。

[0126] 在一个实例中,将用于在本发明中使用的抗体附着至聚乙二醇(PEG)部分。在一个特别的实例中,所述抗体为抗体片段,并且PEG分子可以通过任何位于所述抗体片段中的可得的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如,任何游离的氨基、亚氨基、硫羟基、羟基或羧基基团)来进行附着。此类氨基酸可以天然地出现在所述抗体片段中,或者可以通过使用重组DNA方法而改造入所述片段中(参见例如US 5,219,996;US 5,667,425;W098/25971;

WO2008/038024)。在一个实例中,所述抗体分子为经修饰的Fab片段,其中所述修饰为向其重链的C-末端添加一个或多个氨基酸以允许附着效应分子。合适地,所述另外的氨基酸形成经修饰的铰链区,其包含一个或多个半胱氨酸残基,所述效应分子可以附加至所述半胱氨酸残基。可以使用多个位点来附着两个或更多个PEG分子。

[0127] 抗体可以与上面在H-链/L-链、HCVR/LCVR或CDR序列方面进行定义的那些竞争结合Gremlin-1,或者结合与它们相同的表位。特别地,抗体可以与包含SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列组合的抗体竞争结合Gremlin-1,或者结合与之相同的表位。抗体可以与包含SEQ ID NO:10/11或12/13的HCVR和LCVR序列对或者SEQ ID NO:14/15或16/17的全长链的抗体竞争结合Gremlin-1,或者结合与之相同的表位。

[0128] “表位”是被抗体所结合的抗原的区域。表位可以被定义为结构的或功能的。功能表位通常为结构表位的子集,并且具有直接有助于相互作用的亲和力的那些残基。表位也可以是构象的,即由非线性氨基酸组成。在某些实施方案中,表位可以包括决定子,其是分子例如氨基酸、糖侧链、磷酸基基团或磺酰基基团的在化学上有活性的表面集群,并且在某些实施方案中,可以具有特别的三维结构特征和/或特别的电荷特征。

[0129] 通过使用本领域中已知的常规方法,可以容易地测定抗体是否结合至与参考抗体相同的表位或者与参考抗体竞争结合。例如,为了测定受试抗体是否结合与用于在本发明中使用的参考抗体相同的表位,允许所述参考抗体在饱和条件下与蛋白质或肽相结合。接下来,评估受试抗体与所述蛋白质或肽相结合的能力。如果所述受试抗体在用所述参考抗体进行饱和结合后能够与所述蛋白质或肽相结合,那么可以得出结论,所述受试抗体结合与所述参考抗体不同的表位。另一方面,如果所述受试抗体在用所述参考抗体进行饱和结合后不能够与所述蛋白质或肽相结合,那么所述受试抗体可能结合与由本发明的参考抗体所结合的表位相同的表位。

[0130] 为了测定抗体是否与参考抗体竞争结合,在两个方向上执行上面所描述的结合方法学。在第一个方向上,允许所述参考抗体在饱和条件下与蛋白质/肽相结合,随后评估所述受试抗体与所述蛋白质/肽分子的结合。在第二个方向上,允许所述受试抗体在饱和条件下与所述蛋白质/肽相结合,随后评估所述参考抗体与所述蛋白质/肽的结合。如果在这两个方向上都是仅第一(饱和)抗体能够与所述蛋白质/肽相结合,那么得出结论,所述受试抗体和所述参考抗体竞争结合所述蛋白质/肽。如由技术人员将会意识到的,与参考抗体竞争结合的抗体可以不必需结合与所述参考抗体相同的表位,但是可以通过结合重叠或邻近表位而在空间上阻断所述参考抗体的结合。

[0131] 两种抗体结合相同或重叠的表位,如果每种抗体竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合。即1-倍、5-倍、10-倍、20-倍或100-倍过量的一种抗体抑制另一种抗体的结合至少50%、75%、90%或甚至99%,如在竞争性结合测定法中所测量的(参见例如,Junghans等人,Cancer Res,1990:50:1495-1502)。备选地,两种抗体具有相同的表位,如果基本上所有的减少或消除一种抗体的结合的在抗原中的氨基酸突变都减少或消除另一种抗体的结合。两种抗体具有重叠的表位,如果一些减少或消除一种抗体的结合的氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合。

[0132] 然后,可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析)以确认所观察到的所述受试抗体的结合的缺乏是否事实上是由于结合与所述参考抗体相同的表位,或者空间阻

断(或另一种现象)是否对于所观察到的结合的缺乏负有责任。该种类的实验可以通过使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或者本领域中可得的任何其他定量或定性抗体结合测定法来进行。

[0133] 已发现实施例的抗-gremlin-1抗体,Ab7326,结合Gremlin-1的下列残基:Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175;其中Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175存在于一个Gremlin-1单体上,和Ile131存在于第二个Gremlin-1单体上。编号基于SEQ ID NO:1的UniProt条目060565。如在实施例部分中所讨论的,这些表位残基是通过使用在4Å下的NCONT分析从Gremlin-1-Ab7326Fab复合物中鉴定出的。

[0134] 因此,用于在本发明中使用的抗体可以与包含至少一个选自下列的残基的表位相结合:Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175(残基编号基于SEQ ID NO:1)。用于在本发明中使用的抗体可以结合包含这些残基中的2、3、4、5、6、7、8或所有9个残基(优选地,至少5个残基)的表位。

[0135] 用于在本发明中使用的抗体还可以识别其中Ile131存在于与其他残基不同的Gremlin-1单体上的表位。

[0136] 虽然这些残基对于人Gremlin-1的特定序列而提供的,但是技术人员可以通过使用常规技术将这些残基的位置外推至其他相应的Gremlin序列。因此,还提供了与包含在这些其他Gremlin序列内的相应残基的表位相结合的抗体用于在本发明中使用。

[0137] 为了筛选与特定表位相结合的抗体,可以进行常规的交叉阻断测定法,例如在Antibodies,Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harb.,NY)中所描述的那种。其他方法包括丙氨酸扫描突变体、肽印迹(Reineke(2004)Methods Mol Biol 248:443-63)或肽切割分析。另外,可以采用诸如表位切除、表位提取和抗原的化学修饰的方法(Tomer(2000)Protein Science 9:487-496)。此类方法是本领域中众所周知的。

[0138] 也可以通过x-射线晶体学分析来测定抗体表位。因此,可以通过结合至Gremlin-1的抗体的x-射线晶体学分析来评估用于在本发明中使用的抗体。特别地,可以以这种方式通过测定在抗体互补位残基的4Å之内的在Gremlin-1上的残基来鉴定表位。

[0139] 可以通过例如标准ELISA或Western印迹法,就与Gremlin-1的结合来测试抗体。ELISA测定法也可以用于筛选显示与靶蛋白质的阳性反应性的杂交瘤。抗体的结合选择性也可以通过监测所述抗体与表达靶蛋白质的细胞的结合来测定。因此,筛选方法可以包括通过进行ELISA或Western印迹或者通过流式细胞术来鉴定能够结合Gremlin-1的抗体的步骤。

[0140] 抗体可以选择性地(或特异性地)识别Gremlin-1。抗体,或其他化合物,“选择性地结合”或“选择性地识别”蛋白质,当它以优先或高亲和力与所述蛋白质(对于其来说它是选择性的)相结合,但基本上不结合或以低亲和力结合其他蛋白质时。抗体的选择性可以通过下述方式来进行进一步地研究:测定所述抗体是否与上面所讨论的其他相关蛋白质相结合,或者它是否区分它们。用于在本发明中使用的抗体典型地识别人Gremlin-1。

[0141] 抗体也可以具有对于相关蛋白质,或者对于人Gremlin-1和对于来自其他物种的Gremlin-1的交叉反应性。

[0142] 通过“特异性的(或选择性的)”,将会理解,所述抗体与目的蛋白质相结合,而与任何其他分子没有显著的交叉反应性。可以通过在本文中所描述的任何合适的方法来评估交叉反应性。抗体的交叉反应性可以被认为是显著的,如果所述抗体与其他分子以它与目的蛋白质相结合的强度的至少大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或100%相结合。特异性的(或选择性的)抗体可以与另一分子以它与目的蛋白质相结合的强度的小于大约90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%或20%相结合。所述抗体可以与其他分子以它与目的蛋白质相结合的强度的小于大约20%、小于大约15%、小于大约10%或小于大约5%、小于大约2%或小于大约1%相结合。

[0143] 因此,适合于在本发明中使用的抗体可以具有对于(人)Gremlin-1的高亲和力结合。所述抗体可以具有<1nM,优选地<500pM的解离常数( $K_D$ )。在一个实例中,所述抗体具有小于200pM的解离常数( $K_D$ )。在一个实例中,所述抗体具有小于100pM的解离常数( $K_D$ )。可以使用各种各样的方法来测定抗体对于其靶抗原的结合亲和力,例如表面等离子体共振测定法、饱和测定法或免疫测定法例如ELISA或RIA,如本领域技术人员所众所周知的。用于测定结合亲和力的一种示例性方法为在BIAcore™ 2000仪器(Biacore AB, Freiburg, Germany)上通过表面等离子体共振分析,其中使用CM5传感器芯片,如由Krininger等人,(2007) Mol. Immunol. 2月,44(5):916-25(Epub2006年5月11)所描述的。

[0144] 实施例的抗-Gremlin-1抗体,Ab7326,是Gremlin-1活性的别构抑制剂,其与远离BMP结合位点的表位相结合(WO 2018/115017A2)。Ab7326与Gremlin-1以格外高的亲和力( $K_D$ 值<100pM)相结合,并且预期其对于在本发明中使用来说是特别有用的。

[0145] Gremlin-1活性抑制剂可以对于Gremlin-1的任何功能具有影响,但是典型地减少Gremlin-1与BMP(BMP 2、4和/或7)的结合。Gremlin-1是BMP的负调节物,并且如此经减少的结合增加通过BMP的信号传导。

[0146] 可以通过本领域中已知的任何方法来检测BMP结合和信号传导。本申请的实施例描述了两种用于测试试剂是否减少gremlin-1与BMP的结合的功能测定法。实施例3描述了Id1报道基因测定法,其中Id1基因是BMP信号传导的靶基因。在该测定法中信号的增加可以用于测定试剂是否减少Gremlin-1与BMP的结合。实施例5描述了SMAD磷酸化测定法。SMAD1、5和8在BMP信号传导后被磷酸化。因此,SMAD磷酸化的增加可以用于测定试剂是否减少Gremlin-1与BMP的结合。

[0147] 一旦鉴定和选择出了合适的抗体,就可以通过本领域中已知的方法来鉴定所述抗体的氨基酸序列。可以通过使用简并引物来克隆编码所述抗体的基因。可以通过常规方法重组地产生所述抗体。

[0148] 编码Ab7326的全长重链和轻链的DNA序列的例子提供在序列表中:

[0149] • SEQ ID NO:24(人IgG1重链DNA变体1),

[0150] • SEQ ID NO:25(人IgG1轻链DNA变体1),

[0151] • SEQ ID NO:26(人IgG4P重链DNA变体1),

[0152] • SEQ ID NO:27(人IgG4P轻链DNA变体1)。

[0153] 药用组合物、用量和按剂量给药制度

[0154] 用于在本发明中使用的gremlin-1活性抑制剂可以提供在药用组合物中。所述药

用组合物通常将会是无菌的,并且典型地将会包含在药学上可接受的承载体和/或辅助剂。用于在本发明中使用的药用组合物可以另外包含在药学上可接受的辅助剂和/或载体。

[0155] 用于在本发明中使用的药用组合物可以包含一种或多种在药学上可接受的盐。“在药学上可接受的盐”是指保留了亲本分子的所希望的生物学活性并且不给予任何不希望的毒理学效应的盐。此类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。

[0156] 在本文中所使用的“在药学上可接受的载体”包括任何和所有的在生理学上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。所述载体可以适合于肠胃外施用途径,例如静脉内、肌内、真皮内、眼内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。备选地,所述载体可以适合于非肠胃外施用,例如局部、表皮或粘膜施用途径。所述载体可以适合于口服施用。取决于施用途径,可以将所述抑制剂包覆在材料中以保护它免于酸和其他可以使所述抑制剂失活的天然条件的作用。

[0157] 在药学上可接受的载体包含水性载体或稀释剂。可以在用于在本发明中使用的药用组合物之中采用的合适的水性载体的例子包括水、经缓冲的水和盐水。其他载体的例子包括乙醇,多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油例如橄榄油,和可注射有机酯例如油酸乙酯。在许多情况下,将会希望在所述组合物中包括等渗剂,例如糖,多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇,或氯化钠。

[0158] 典型地,药用组合物在制备和贮存条件下必须是无菌的和稳定的。可以将所述组合物配制为溶液、微乳状液、脂质体或其他适合于高药物浓度的有序结构。

[0159] 用于在本发明中使用的药用组合物可以包含另外的活性成分。

[0160] 还设想了试剂盒,其包含用于在根据本发明的治疗方法中使用的gremlin-1活性抑制剂和说明书。

[0161] 可以为了治疗性和/或预防性治疗而施用用于在本发明中使用的试剂或者其制剂或组合物。

[0162] 在治疗性应用中,向已经罹患病症或状况的受试者以足以治愈、减轻或部分地停止所述状况或者一种或多种其症状的量施用试剂。这样的治疗性治疗可以导致症状严重度的降低,或者无症状期的频率或持续时间的增加。将足够能够完成此的量定义为“治疗有效量”。

[0163] 在预防性应用中,向处于病症或状况风险中的受试者以足以防止或减少所述状况的后续影响或者一种或多种其症状的量施用试剂。将足够能够完成此的量定义为“预防有效量”。对于每种目的的有效量将会取决于疾病或损伤的严重度以及受试者的体重和一般状态。

[0164] 用于进行施用的受试者可以为人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、狗、猫、马、绵羊、牛、鸡、两栖类、爬行类等。对人进行施用是典型的。

[0165] 可以使用本领域中已知的各种各样方法中的一种或多种,通过一种或多种施用途径来施用用于在本发明中使用的试剂或药用组合物。如技术人员将会意识到的,施用的途径和/或方式将会取决于所希望的结果而变动。关于用于在本发明中使用的试剂或药用组合物的施用途径的例子包括肠胃外途径,例如静脉内、肌内、真皮内、眼内、腹膜内、皮下或脊柱施用途径,例如通过注射或输注。备选地,试剂或药用组合物可以通过非肠胃外途径

(例如局部、表皮或粘膜施用途径)来进行施用。所述试剂或药用组合物可以用于口服施用。

[0166] 用于在本发明中使用的抑制性试剂或药用组合物的合适的用量可以由熟练的医学从业者来确定。在用于在本发明中使用的药用组合物中的活性成分的实际用量水平可以发生变动,以便获得对于取得所希望的关于特定患者、组合物和施用方式的治疗应答来说有效而对于患者无毒性的活性成分的量。所选择的用量水平将会取决于各种各样的药物代谢动力学因素,包括所采用的特定组合物的活性,施用途径,施用时间,所采用的特定化合物的排泄率,治疗持续时间,正在进行治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、一般健康和先前病史,以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0167] 合适的剂量可以在例如大约0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约1000 $\text{mg}/\text{kg}$ 待治疗的患者的体重,典型地大约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约100 $\text{mg}/\text{kg}$ 体重的范围内。例如,合适的用量可以为大约1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约10 $\text{mg}/\text{kg}$ 体重/日或者大约10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约5 $\text{mg}/\text{kg}$ 体重/日。

[0168] 可以调整按剂量给药制度以提供最佳的所希望的应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单剂量,可以随时间施用几个分开的剂量,或者可以如治疗情形所指示的按比例减少或增加剂量。在本文中所使用的“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗的受试者的单位用量的在物理上分立的单位;每个单位包含与所要求的药学载体相联合的预先确定量的活性试剂(其是为产生所希望的治疗效果而计算出的)。

[0169] 施用可以以单剂量或多剂量。多剂量可以通过相同或不同的途径和向相同或不同的位置进行施用。备选地,剂量可以通过持续释放制剂,在这种情况下需要较不频繁的施用。用量和频次可以取决于所述抑制性试剂在患者中的半寿期和所希望的治疗持续时间而变动。

[0170] 用于在本发明中使用的试剂、制剂或药用组合物可以与一种或多种其他治疗试剂一起共施用。可以以许多不同的方式来实现两种或更多种试剂的联合施用。两者可以在单一组合物中一起进行施用,或者它们可以在分开的组合物中作为联合疗法的一部分进行施用。例如,可以将一种在另一种之前、之后或同时地进行施用。

#### [0171] 治疗适应症

[0172] 提供了根据本发明的gremlin-1活性抑制剂用于治疗骨折或骨缺损。骨折是骨组织中的破裂或断裂,并且可以是创伤性损伤(例如跌倒或碰撞)的结果,但是也可以作为影响骨完整性的疾病的结果而出现。骨缺损是由于创伤或疾病而引起的骨丢失。

[0173] 所述骨折可以是身体中任何骨的骨折。

[0174] 所述骨缺损可以是身体的任何骨中的骨缺损。

[0175] 在一个实施方案中,所述骨折是延迟连合性或不连合性骨折。延迟连合性骨折被定义为在骨折后6个月之内未能达到连合的骨折。不连合性骨折被定义为在9个月之内不完全愈合,并且组合有在连续三个月中未观察到与骨折愈合相关联的放射学特征。(Einhorn等人,2014;Buza等人,2016)。倾向于延迟连合或不连合发展的骨折的例子包括胫骨、远端桡骨、股骨颈和舟骨。

[0176] 在一个实施方案中,所述骨折或骨缺损作为影响骨完整性的疾病的结果而出现。影响骨完整性的疾病的例子包括但不限于,骨质疏松症、成骨不全、糖尿病、佩吉特骨病、类风湿性关节炎、强直性脊椎炎、多发性骨髓瘤、原发性骨癌(例如,骨肉瘤、尤因肉瘤和软骨肉瘤)、转移至骨的癌症(例如,乳腺癌、前列腺癌和肺癌)、弥漫性特发性骨骼骨肥厚、骨髓

炎、肾疾病、迪谢纳肌营养不良和重型地中海贫血。

[0177] 附图

[0178] 图1显示了在HEK-ID1报道基因测定法中关于源自免疫接种的抗体的信号恢复百分比。

[0179] 图2显示了在HEK-ID1报道基因测定法中关于源自文库的抗体的信号恢复百分比。

[0180] 图3显示了关于HEK-ID1报道基因测定法的结果,其中具有人Gremlin (图3A) 和小鼠Gremlin (图3B) 的滴定,以及抗体7326 (显示为抗体PB376) 在恢复BMP信号传导中的效应。

[0181] 图4显示了Gremlin-Fab复合物的结构模型,其中突出显示了可能的BMP结合区域和Fab表位。

[0182] 图5显示了在所获取的X-射线图像中在骨折修复期间没有骨痂/骨组织的区域的检查。没有组织的在缺损内的区域通过使用定义图像分析 (definiens image analysis) 来进行定量,并且随后在对照和经抗-gremlin 1治疗的组之间进行比较。结果呈现为10只大鼠的平均值 $\pm$ SD/组。 $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ ,如通过Mann-Whitney U检验所测量的。

[0183] 图6显示了在3mm股骨缺损内的LMB (低矿物质骨;新形成的骨) 和HMB (高矿物质骨;成熟骨) 的检查。图版A:股骨缺损区域的3D $\mu$ Ct分析,以检测新形成的骨或成熟骨。测量了骨体积/组织体积的百分比,并且在对照与用抗-gremlin 1进行的治疗之间比较了所有受试者(总的)。还进行了在分开为低应答者(LR-不完全桥接)和高应答者(HR-完全桥接)的动物中在对照与经抗-gremlin 1治疗的组之间的比较。结果呈现为平均值 $\pm$ SD。 $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ ,如通过Mann-Whitney U检验所测量的。图版B:代表性的 $\mu$ Ct,其图解说明了在对照中和在抗-gremlin 1治疗后LR和HR组的3D骨体积重现。

[0184] 图7显示了股骨缺损的组织形态计量学分析。在对照与经抗-gremlin 1治疗的组之间比较了骨体积/组织体积的百分比(BV/TV(%))、骨小梁数目(Tb.N)和骨小梁分离度(Tb.Sp)。结果呈现为10只大鼠的平均值 $\pm$ SD/组。 $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ ,如通过Mann-Whitney U检验所测量的。

[0185] 图8显示了总BV/TV%的3D $\mu$ CT分析和2D组织形态计量学分析的相关性。在两个组中对于在3mm股骨缺损内的LMB (低矿物质骨;新形成的骨) 和HMB (高矿物质骨;成熟骨) 进行了相互关联,并且与2D组织形态计量学得分数据(n=20)进行了比较。Pearson得分表明了3D $\mu$ CT分析和2D组织形态计量学分析之间BV/TV%的显著相关性。

[0186] 下面的实施例举例说明本发明。

## 实施例

[0187] 实施例1-蛋白质表达、纯化、重折叠和结构测定

[0188] 蛋白质表达和内含体制备

[0189] 使用BamHI/XhoI将经截短的人Gremlin-1编码序列(SEQ ID NO:20) (其为了在大肠杆菌(E.coli)中表达而进行了优化)克隆到经修饰的pET32a载体(Merck Millipore)中,从而产生编码具有N-末端6His-TEV标签的Gremlin序列的载体(pET-hGremlin1)。

[0190] 所表达的序列:

[0191] MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTI

INRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLQPPTKKKRVTQKRCRCSIDL; SEQ ID NO:2 (其中6His-TEV标签的非-Gremlin残基以斜体显示)。序列编号基于UniProt 060565和SEQ ID NO:1。

[0192] 将pET-hGremlin1质粒DNA用于转化BL21 (DE3) 细胞。从LB/Amp琼脂平板上挑取单个氨苄青霉素抗性菌落,并且用于接种100ml的LB/Amp起始培养物。在37°C下摇动(200rpm) 16小时后,将25ml的起始培养物用于接种500mL的2xTY/Amp培养基。在37°C下摇动该培养物(250rpm),直至取得3的OD<sub>600</sub>。随后,给该培养物补充以20mL的MOPS+甘油补料混合物(1M MOPS pH 7.4,40%甘油,0.5%MgSO<sub>4</sub>,0.42%MgCl<sub>2</sub>),用300μM IPTG进行诱导,并且在17°C、180rpm下进一步温育16小时。在离心机中收获细胞(在4°C下,4,000g 20分钟)。

[0193] 将细胞粒状沉淀重悬浮在处于4°C的裂解缓冲液(PBS pH 7.4,0.35mg/ml溶菌酶,10μg/ml DNA酶,和3mM MgCl<sub>2</sub>)中,并且通过在4°C下以3,500g离心30分钟来收获不溶性级分。将形成粒状沉淀的内含体洗涤三次,这通过下述方式来进行:重悬浮在洗涤缓冲液(50mM Tris,500mM NaCl,0.5%Triton X-100,pH 8.0)中来,随后以21,000g离心15分钟。另外的两次洗涤使用没有Triton X-100的洗涤缓冲液来进行。

[0194] 增溶

[0195] 将内含体重悬浮在变性缓冲液(8M尿素,100mM Tris,1mM EDTA,10mM Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>,和100mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>,pH 8.5)中,在室温下搅拌16小时,并且通过以21,000g离心15分钟来使其澄清。

[0196] 重折叠前纯化

[0197] 将溶解的内含体加载到在8M尿素、50mM MES、200mM NaCl、1mM EDTA(pH 6.0)中进行平衡的Sephacryl S-200 26/60柱(120mL)上。用6M尿素、20mM MES(pH 6.0)稀释包含Gremlin-1蛋白的级分,并且加载到HiTrap SP HP阳离子交换柱上并用1M NaCl梯度在10个柱体积(10CV)内进行洗脱。汇集包含经纯化的、变性的hGremlin-1蛋白的级分。

[0198] 重折叠

[0199] 将变性的经纯化的Gremlin-1蛋白逐滴添加到重折叠缓冲液(50mM Tris,pH 8.5,150mM NaCl,5mM GSH和5mM GSSG、0.5mM半胱氨酸,5mM EDTA,0.5M精氨酸)中至0.1mg/ml的最终浓度,并且在4°C下在具有连续搅拌的情况下温育5天。在5天后,将Gremlin-1蛋白逆20mM HEPES、100mM NaCl(pH 7.5)进行透析。

[0200] 在透析后,将蛋白质施加至肝素HiTrap柱,并且使用0-100%肝素洗脱缓冲液(20mM HEPES,1M NaCl,pH 7.5)的梯度在20CV内进行洗脱。正确折叠的蛋白质在1M NaCl下洗脱,而任何错误折叠的蛋白质在更低的盐浓度下洗脱。

[0201] 将在1M NaCl下洗脱出的蛋白质浓缩,并且在用20mM Hepes(pH 7.5)、1M NaCl进行平衡的S75 26/60柱上进一步进行纯化。

[0202] 蛋白质通过SDS PAGE进行表征(在凝胶中移动),被证明具有所预期的分子量和正确的二硫键排列(使用液相色谱法-质谱法(LC-MS)),并且在细胞测定法(ID1报道基因测定法)中被证明是有活性的。

[0203] Gremlin 1结构测定

[0204] 通过以1:1的比例混合6.6mg/ml的Gremlin 1溶液与0.1M柠檬酸(pH 4)、1M氯化锂和27%聚乙二醇(PEG)6000,使用悬滴法来使Gremlin 1蛋白晶体生长。在数据收集之前,通

过向结晶缓冲液添加20%甘油来对晶体进行冷冻保护。在Diamond Light Source收集衍射数据,并且使用XDS (Kabsch,Wolfgang (2010) Acta Crystallographica Section D 66, 125-132) 进行处理。衍射数据统计概括在下表中。

[0205] 表2:衍射数据统计

	<b>衍射统计</b>	
	<b>波长 (Å)</b>	<b>0.97949</b>
	<b>空间群</b>	<b>C2</b>
	<b>晶胞尺寸</b>	<b>a= 84.55 Å, b= 107.22 Å, c= 77.09 Å; α= 90.00°, β= 120.43°, γ= 90.00°</b>
	<b>分辨率范围* (Å)</b>	<b>26.19-2.72 ( 2.79-2.72 )</b>
[0206]	<b>完整度 (%)</b>	<b>98.5 ( 99.0 )</b>
	<b>多重性</b>	<b>3.4 ( 3.4 )</b>
	<b>I/σ</b>	<b>9.6 ( 2.0 )</b>
	<b>R<sub>合并</sub></b>	<b>0.095 ( 0.622 )</b>
	<b>精修统计</b>	
	<b>分辨率范围 (Å)</b>	<b>26.19-2.72</b>
	<b>R<sub>cryst</sub></b>	<b>0.24</b>
	<b>R<sub>free</sub></b>	<b>0.29</b>
[0207]	<b>R.m.s.d.键 (Å) **</b>	<b>0.013</b>
	<b>R.m.s.d.角 (°)</b>	<b>1.782</b>

[0208] \*括号中的值相应于最高分辨率壳

[0209] \*\*r.m.s.d均方根偏差

[0210] 使用Phaser (McCoy等人, J Appl Cryst (2007), 40, 658-674) 和从专有的Gremlin-1/Fab复合物坐标可得的Gremlin-1模型,通过分子替换来解析Gremlin-1结构。所得的Gremlin-1模型包含被组织为两个二聚体的四个拷贝的Gremlin 1单体。用Coot (Emsley等人, Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66(4), 486-501) 来进行模型校正,并且通过使用Refmac (Murshudov等人, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2011, 67 (Pt 4): 355-367) 来精修坐标。用Molprobity (Chen等人, (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66: 12-21) 来验证最终的坐标。在上面的表2中显示了模型精修统计的概括。

[0211] 实施例2-在Gremlin-1上的BMP结合残基

[0212] 如上面所讨论的, Gremlin-1属于在一个亚群内的骨形态发生蛋白 (BMP) 拮抗剂蛋白质家族 (称为DAN家族)。在DAN家族中, Gremlin-1与Gremlin-2 (PRDC) 共享最大的同源性。

[0213] 在实施例1中所解析的**2.7 Å**人Gremlin-1结构与所发表的小鼠Gremlin-2结构 (Nolan等人, (2013), Structure, 21, 1417-1429) 共同分享许多特征。总体的折叠是非常相似的,其中两个拷贝的Gremlin-1形成以拱形排列的反向平行的非共价二聚体。每个单体采

取特征性的指-腕-指排列,其中胱氨酸结基元朝向腕末端,与指相对。蛋白质之间的序列同一性为52%,其中在这两个结构中可见的序列之内上升至67%。最高度保守的区域位于广泛的二聚体界面中,其中所有关键的接触残基都是100%保守的。

[0214] 已经通过使用诱变(Nolan等人,(2013),Structure,21,1417-1429;和Nolan等人,(2014)J.Biol.Chem.290,4759-4771)鉴定出了在BMP2、4和7结合小鼠Gremlin-2(PRDC)和DAN(NBL1)中所牵涉的残基。所预测的BMP结合表位包括在二聚体的凸出表面上的横跨两个单体的疏水斑片。通过诱变鉴定出了六个残基:Trp72、Phe96、Tyr98、Phe104、Tyr105和Phe117,并且它们在人Gremlin-1中是100%保守的(编号基于小鼠Gremlin-2序列)。同源性程度延伸至侧链的布置,其在这两种蛋白质中采取相同的构象。

[0215] 在Gremlin PDB文件中所使用的氨基酸编号与在所发表的小鼠Gremlin-2结构中的编号相匹配,基于结构比对。当描述结构时,这使得氨基酸的类似比较成为可能。然而,为了清楚起见,下面显示了被鉴定为在BMP结合中发挥作用的关键残基,其中具有基于PDB文件和SEQ ID NO:1的UniProt文件(在括号中)的编号:Trp72(93)、Phe96(117)、Tyr98(119)、Phe104(125)、Tyr105(126)和Phe117(138)。

[0216] 在小鼠Gremlin-2和人Gremlin-1两者中,疏水性BMP结合表位部分地被由每种蛋白质的N-末端残基形成的 $\alpha$ 螺旋所隐藏。已提出了BMP结合的模型,根据该模型,N-末端可以弯曲,从而暴露完整的BMP结合界面(Nolan等人,(2013),Structure,21,1417-1429)。在本分析中,在重现表面以揭示在每种蛋白质上BMP结合面的相似性之前,从人Gremlin-1和小鼠Gremlin-2结构中去除N-末端残基。

[0217] 文献仅描述了对于BMP结合具有效应的六个残基的诱变。可能的是,实际的BMP表位覆盖较大的表面面积,包括相邻的氨基酸。通过突出显示在Gremlin-1的表面上在经突变的那些的6Å之内的所有残基,揭示出了Gremlin-1的更大区域,其可以潜在地被治疗剂所靶向。该更广泛的区域包括人Gremlin-1的下列氨基酸:

[0218] Asp92-Leu99

[0219] Arg116-His130

[0220] Ser137-Ser142

[0221] Cys176-Cys178

[0222] (编号基于SEQ ID NO:1)。

[0223] 通过将所发表的信息与人Gremlin-1的晶体结构信息相组合,鉴定出了人Gremlin-1的这样的区域,其提供自身作为用于阻断其与BMP的相互作用的治疗性干预的潜在途径。

[0224] 实施例3-Hek Id1报道基因测定法

[0225] 背景

[0226] Hek Id1报道基因测定法使用克隆12Hek293-Id1报道细胞。该细胞系用Id1转录因子稳定地进行转染。Id1是在BMP信号传导途径中的转录因子。已知Gremlin结合BMP,阻止与其受体的结合,从而减少来自该报道基因的萤光素酶信号。因此,使用该报道基因测定法,可能的是筛选抗-Gremlin抗体并且看是否存在任何阻断Gremlin与BMP的相互作用的抗体。如果存在该相互作用的阻断,那么在那些细胞中看到萤光素酶信号的恢复。

[0227] 方法

[0228] 在包含10%FCS、1x L-谷氨酰胺和1x NEAA的DMEM中培养克隆12细胞。还在潮霉素B(200 $\mu$ g/ml)存在下使细胞生长以确保细胞不丢失Id1基因表达。在包含0.5%FCS、1x L-谷氨酰胺和1x NEAA的DMEM中对细胞进行检定。对于细胞处于该测定法中的短时间,潮霉素B不是需要的。

[0229] 将细胞在PBS中进行洗涤,使用细胞解离缓冲液提升起来,旋转沉降,并计数,之后以 $5 \times 10^4$ /孔接种在70 $\mu$ l中( $7.14 \times 10^5$ /ml的密度)。所使用的平板为白色的、不透明的、经聚-D-赖氨酸包被的96-孔无菌平板。细胞进入培养箱大约3-4小时以沉降下来。在4mM HCl中将BMP异二聚体重构至200 $\mu$ g/ml。使用玻璃小瓶在测定法介质中将BMP稀释至10 $\mu$ g/ml以给出新的工作储备液。

[0230] 在聚丙烯平板中,将Gremlin-1进行1:2稀释以用于8-点剂量反应曲线,其中具有1 $\mu$ g/ml的最高最终剂量。

[0231] 每个孔添加另外的20 $\mu$ l培养基的体积,并且将平板在37 $^{\circ}$ C下温育45分钟。

[0232] 除了仅包含细胞的孔之外,将以100x制备的BMP添加至所有孔。用测定法介质将所有孔补足至60 $\mu$ l并且在37 $^{\circ}$ C下温育另外45分钟。

[0233] 在温育后,将30 $\mu$ l的样品转移至测定法平板的每个孔,并且在测量荧光信号之前温育20-24小时。

[0234] 事先在室温下解冻Cell Steady Glo。在添加该试剂之前将测定法平板冷却至室温大约10-15分钟。通过下述方式来检测萤光素酶信号:在室温下在摇床上添加Cell Steady Glo试剂(100 $\mu$ l)20分钟,并且在Synergy 2上通过使用cell titre glo实验方案来测量发光。

[0235] 从包含BMP的孔中产生最大信号,和从仅包含细胞的孔中产生最小信号。

[0236] 结果

[0237] 在Hek-Id1报道基因测定法中测试了Gremlin-1全长和截短形式以确认针对BMP4/7的阻断活性。

[0238] 基于在该测定法中的最大和最小信号来计算来自剂量反应测定法的抑制百分比,并且使用4-参数逻辑拟合来拟合数据。基于该曲线的拐点来计算IC<sub>50</sub>。

[0239] 表3:在Hek-Id1报道基因测定法中关于全长Gremlin-1和经截短的Gremlin-1的效力结果

	Hek-Id1 报道基因测定法	N	几何平均值 (nM)	95% CI (或其中 N=<4 的范围)
[0240]	全长 Gremlin 1	2	1.6	1.3-1.9
	经截短的 Gremlin 1	2	1.7	1.1-2.5

[0241] 结论

[0242] 在Hek-Id1报道基因测定法中,Gremlin 1能够抑制BMP 4/7信号传导。

[0243] 实施例4-抗-Gremlin-1抗体的产生

[0244] 通过如在实施例1中所描述的那样使用经纯化的gremlin-1进行免疫接种和通过文库淘选来得到抗-Gremlin-1抗体。作为具有从血液捐赠中扩增出的V-区的幼稚人文库,在内部产生文库。

[0245] 从第一轮免疫接种,免疫接种产生了26种不同的结合Gremlin-1的抗体。将这些抗体扩大并进行纯化以用于在筛选测定法中进行测试。

[0246] 使用来自R&D Systems的重组人Gremlin,从该文库中淘选出25种人和小鼠交叉反应性抗体。选择10种抗体用于扩大并进行纯化(作为scFv)以用于在筛选测定法中进行测试。

[0247] 实施例5-抗-Gremlin-1抗体的筛选

[0248] 使用在实施例3中所描述的Hek-Id1报道基因测定法并且通过测量SMAD磷酸化来筛选抗体。在BMP信号传导后,SMAD 1、5和8被磷酸化。因此,Gremlin-1的抑制剂增加SMAD磷酸化。

[0249] 在A549细胞上或人肺成纤维细胞上进行SMAD磷酸化测定法。使用MSD来测定磷酸化水平。

[0250] 结果

[0251] 在Hek-Id1报道基因测定法中,用源自免疫接种的抗体不存在明显的命中(所测试的抗体对于BMP4/7异二聚体是10倍过量)。结果显示在图1中。

[0252] 与此相反,在Hek-Id1报道基因测定法中,许多源自文库的抗体能够恢复信号(50倍过量的抗体,具有50% gremlin剂量)(图2)。在这些之中,Ab2416和Ab2417包含高水平的内毒素。Ab7326在10倍过量和80%抑制Gremlin-1浓度下保持阻断能力。

[0253] 在图3A(人gremlin)和3B(小鼠Gremlin)中呈现了另外的结果。这些图显示了直至15nM的Ab7326(标注为PB376)的滴度。当被人(1.3nM的 $IC_{50}$ )或小鼠(0.2nM Gremlin的 $IC_{50}$ )阻断时,Ab7326显示出恢复BMP的信号传导。作为人和小鼠IgG1,抗体都起作用。

[0254] 下面呈现了小鼠和人全长IgG1的序列。为了合成小鼠和人全长IgG1蛋白,将源自文库的Ab7326可变区再克隆到包含合适的抗体恒定结构域的载体中。

[0255] 因为Ab7326来自幼稚人文库(其中Ab作为scFv被克隆),所以为了作为全长Ab或Fab来再克隆7326可变区,需要使用引物/简并引物的汇集物来PCR扩增VH和VK。然后,消化扩增出的PCR产物并且同时克隆到小鼠和人载体中。由于通过引物/简并引物的汇集物来扩增VH和VK,因而获得产物的两种变体形式,其差异在于源自在PCR过程中退火的细微不同的引物的单个氨基酸残基。

[0256] 重链可变区的两种变体形式的差异在于在位置6处的单个氨基酸,和轻链可变区的两种变体形式的差异在于在位置7处的单个氨基酸,如下所显示的:

[0257] • 重链可变区变体1在位置6处具有谷氨酸(E),

[0258] • 重链可变区变体2在位置6处具有谷氨酰胺(Q),

[0259] • 轻链可变区变体1在位置7处具有丝氨酸(S),

[0260] • 轻链可变区变体2在位置7处具有苏氨酸(T)。

[0261] 小鼠全长IgG1-重链变体1(SEQ ID NO:14)

- [0262] QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL  
**VDPEDGETIY AEKFQGRVTI** TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**  
**RGS**SYYPNH **FDY**WGQGLV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG  
CLVKGYFPEP VVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP  
SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPKDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD  
VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST  
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFAP APIEKTISKI KGRPKAPQVY  
TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAA NYKNTQPIMD  
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTTEK SLSHSPGK
- [0263] 小鼠全长IgG1-轻链变体1 (SEQ ID NO:15)  
DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP  
KLLIY**WASTR** **ESG**VPDRFSG SSGGTDFTLT INSLQAEDVA VFYFC**QQYYDT**  
**PT**FGQGRLE IKRTDAAPT V SIFPPSSEQL TSGGASVVCF LNNFYPKDIN  
VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKDYSTYSM SSTLTITLTKDE YERHNSYTCE  
ATHKTSTSPI VKSFNRNEC
- [0264] 小鼠全长IgG1-重链变体2 (SEQ ID NO:28)  
QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL  
**VDPEDGETIY AEKFQGRVTI** TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**  
**RGS**SYYPNH **FDY**WGQGLV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG  
CLVKGYFPEP VVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP  
[0265] SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPKDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD  
VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST  
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFAP APIEKTISKI KGRPKAPQVY  
TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAA NYKNTQPIMD  
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTTEK SLSHSPGK
- [0266] 小鼠全长IgG1-轻链变体2 (SEQ ID NO:29)  
DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP  
KLLIY**WASTR** **ESG**VPDRFSG SSGGTDFTLT INSLQAEDVA VFYFC**QQYYDT**  
[0267] **PT**FGQGRLE IKRTDAAPT V SIFPPSSEQL TSGGASVVCF LNNFYPKDIN  
VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKDYSTYSM SSTLTITLTKDE YERHNSYTCE  
ATHKTSTSPI VKSFNRNEC
- [0268] 人全长IgG1-重链变体1 (SEQ ID NO:30)  
QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL  
**VDPEDGETIY AEKFQGRVTI** TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**  
**RGS**SYYPNH **FDY**WGQGLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG  
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLV SVTVPSSSL  
[0269] GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCPAPAE LLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE  
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSL  
SPGK
- [0270] 人全长IgG1-轻链变体1 (SEQ ID NO:31)

[0271] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INC**KSSQSVL** **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP  
KLLIY**WASTR** **ESGVPDRFSG** SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**  
**PTFGQGTRLE** IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
VQWKVDNALQ **SGNSQESVTE** QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

[0272] 人全长IgG1-重链变体2 (SEQ ID NO:16)

QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGY**TFT** **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL  
**VDPEDGETIY** **AEKFQGRVTI** TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**  
**RGSGSYYPNH** **FDYWGQGLTV** TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG  
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSL SVVTVPSSSL  
 [0273] GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSLSL  
SPGK

[0274] 人全长IgG1-轻链变体2 (SEQ ID NO:17)

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INC**KSSQSVL** **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP  
KLLIY**WASTR** **ESGVPDRFSG** SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**  
 [0275] **PTFGQGTRLE** IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
VQWKVDNALQ **SGNSQESVTE** QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

[0276] 使用Kabat方法来确定抗体CDR (在上面的序列中以粗体突出显示)。使用Chothia定义的另外的HCDR1残基是斜体。恒定区序列加有下划线。

[0277] 在下面的表4中显示了用抗-Gremlin 1抗体的p-SMAD信号传导的恢复。

[0278] 表4:p-SMAD信号传导的恢复

	2417	2418	2419	2481	2482	2483	2484	7326	8427
<b>BMP 2</b>	<b>109.1%</b>	58.2%	32.6%	40.4%	35.3%	43.1%	<b>104.0%</b>	<b>107.2%</b>	51.3%
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	<b>2.8%</b>	1.9%	1.4%	0.6%	0.8%	2.1%	<b>2.7%</b>	<b>3.5%</b>	1.4%
<b>BMP 4</b>	<b>109.6%</b>	71.3%	31.7%	60.1%	54.4%	72.5%	<b>105.2%</b>	<b>110.0%</b>	78.2%
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	<b>3.0%</b>	3.1%	1.2%	2.2%	1.3%	2.1%	<b>3.3%</b>	<b>3.8%</b>	2.5%
<b>BMP 7</b>	<b>111.5%</b>	<b>99.5%</b>	53.8%	64.4%	52.3%	66.2%	<b>105.2%</b>	<b>108.0%</b>	72.6%
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	<b>3.8%</b>	<b>3.2%</b>	3.4%	1.3%	1.1%	1.2%	<b>4.3%</b>	<b>3.2%</b>	2.5%
<b>BMP-2/7</b>	<b>119.3%</b>	78.6%	50.8%	53.7%	47.6%	56.1%	<b>120.4%</b>	<b>128.5%</b>	62.8%
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	<b>2.6%</b>	3.6%	2.7%	3.1%	1.5%	2.5%	<b>4.4%</b>	<b>2.9%</b>	2.5%
<b>BMP4/7</b>	<b>113.7%</b>	78.0%	61.4%	48.3%	41.7%	50.8%	<b>112.4%</b>	<b>127.0%</b>	63.3%
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	<b>3.1%</b>	4.0%	4.0%	2.1%	1.7%	1.7%	<b>2.5%</b>	<b>3.1%</b>	2.1%

[0280] 结果显示为相对于仅BMP (对照BMP) 而言的SMAD磷酸化百分比。使用来自特异性肺

纤维化患者的肺成纤维细胞来进行实验。将rhGremlin-1和抗-Gremlin-1抗体在室温下预温育45分钟。然后,将rhGremlin-1和抗-Gremlin-1抗体与BMP一起添加至细胞30分钟。

[0281] 然后,表5显示了SMAD磷酸化测定法中的进一步结果,其中探究了用抗-Gremlin-1抗体顶替来自Gremlin 1-BMP复合物的BMP-2或BMP4/7。使用来自特发性肺纤维化患者的肺成纤维细胞再次进行实验。将rhBMP-2或rhBMP 4/7与rhGremlin-1一起在室温下预温育1小时。将BMP-2-Gremlin-1或BMP4/7-Gremlin-1复合物与不同浓度的抗-Gremlin-1抗体一起在4℃下温育过夜。抗体浓度表示在平板上的最终浓度。

[0282] 表5:用抗-Gremlin-1抗体顶替来自Gremlin 1-BMP复合物的BMP-2或BMP4/7

		81.3 μg/ml	40.6 μg/ml	20.3 μg/ml	10.2 μg/ml	5.1 μg/ml	2.55 μg/ml	1.27 μg/ml	0.63 μg/ml
[0283]	<b>2484</b> <b>BMP 2</b> <b>50 ng/ml</b>	100.3% +/- 3.5%	98.8% +/- 2.7%	97.0% +/- 2.9%	93.5% +/- 2.6%	86.4% +/- 2.0%	79.9% +/- 1.9%	66.5% +/- 2.8%	54.8% +/- 0.3%
	<b>2484</b> <b>BMP4/7</b> <b>50 ng/ml</b>	136.4% +/- 4.2%	133.2% +/- 1.0%	121.4% +/- 1.4%	108.1% +/- 4.9%	86.6% +/- 4.4%	74.7% +/- 2.2%	65.8% +/- 0.6%	60.7% +/- 1.5%
	<b>7326</b> <b>BMP 2</b> <b>50 ng/ml</b>	103.7% +/- 1.1%	101.5% +/- 2.4%	99.4% +/- 3.8%	103.8% +/- 2.4%	100.3% +/- 2.2%	103.2% +/- 4.3%	102.8% +/- 2.8%	97.0% +/- 2.9%
	<b>7326</b> <b>BMP4/7</b> <b>50 ng/ml</b>	133.7% +/- 0.8%	132.3% +/- 1.8%	130.3% +/- 4.2%	125.6% +/- 10.0%	121.4% +/- 4.2%	120.9% +/- 3.3%	111.1% +/- 2.3%	102.0% +/- 4.5%

[0284] 表5中所显示的结果证明了Ab7326可以顶替来自Gremlin1-BMP复合物的已经复合的BMP-2或BMP4/7。Ab7326能够以相比于比较抗体2484而言低得多的浓度来实现该顶替。这提供了证据证明Ab7326是别构抑制剂,这与我们的发现(对于Ab7326的结合位点远离已知的在gremlin-1上的BMP结合区域)相一致。因此,Ab7326能够接近别构结合位点,甚至当BMP与gremlin-1相复合时,从而导致显著地经改善的gremlin活性的抑制。

[0285] 实施例6-获得与7326Fab相复合的Gremlin-1的晶体结构

[0286] 以2.1Å的分辨率解析了与Ab7326 Fab相复合的人Gremlin-1的晶体结构。下面显示了Fab序列:

[0287] 重链:SEQ ID NO:18

[0288] QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVE  
PKSC

[0289] 轻链:SEQ ID NO:19

[0290] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0291] 然后,使用CCP4软件NCONT来鉴定在Gremlin-1和Fab之间在4Å下的所有接触。鉴定出了下列残基:Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175(编号基于SEQ ID NO:1的UniProt序列)(在与小鼠Gremlin-2的编号相匹配的结构文件中被编号为Ile110、Lys126、Lys127、Phe128、Thr129、Thr130、Arg148、Lys153和Gln154)。

[0292] 图4显示了Gremlin-Fab复合物的结构模型,其中相对于BMP结合区域显示了Fab表位残基。

[0293] Ab7326为以别构方式起作用的抑制性抗体,即它远离BMP结合区域进行结合。

[0294] 实施例7-关于抗-Gremlin-1抗体Ab7326与Gremlin-1的结合的亲和力测量

[0295] 方法

[0296] 在Biacore T200系统(GE Healthcare Bio-Sciences AB)上,使用表面等离子体共振(SPR)技术,通过生物分子相互作用分析来测定抗-Gremlin mIgG对于人Gremlin 1的亲和力。通过经固定化的抗小鼠-Fc表面来捕获抗-Gremlin mIgG,并且在经捕获的mIgG上滴定Gremlin 1。

[0297] 使用600秒活化和钝化注射,通过胺偶联化学,以在10mM NaAc (pH5.0)中的50µg/ml将捕获配体(山羊抗小鼠IgG的亲纯的F(ab')<sub>2</sub>片段,Fc片段特异性的,115-006-071, Jackson ImmunoResearch Inc.)固定化在CM4传感器芯片的流动池2上,至~1600应答单位(RU)的水平。使用HBS-EP+缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.05%表面活性剂P20)作为运行缓冲液,以10µl/分钟的流速。通过活化和钝化表面来在流动池1上制备参考表面,像对于流动池2那样,但省略捕获配体。

[0298] 测定法缓冲液为HBS-EP+加上额外的150mM NaCl从而给出300mM的最终NaCl浓度加上1%CMD40。使抗-Gremlin mIgG(以在运行缓冲液中的5µg/ml)的60秒注射通过流动池1和2从而给出在经固定化的抗小鼠IgG,Fc表面上的大约100RU的捕获水平。从5nM开始(使用2倍稀释度)在运行缓冲液中滴定重组人Gremlin 1,并且以30µl/分钟的流速注射通过流动池1和2持续3分钟,随后为是5分钟解离期。还包括仅缓冲液的对照。通过60秒注射50mM HCl、30秒注射5mM NaOH和30秒注射50mM HCl,以10µl/分钟的流速来使表面再生。

[0299] 使用Biacore T200评价软件来测定动力学数据。

[0300] 亲和力测量在25°C下进行。

[0301] 结果

[0302] 发现结合亲和力(视为关于5次测定的平均K<sub>d</sub>值)在100pM以下。

[0303] 实施例8-gremlin-1活性的抑制在骨折修复的体内模型中加速愈合和桥接

[0304] 8.1.材料和方法

[0305] 大鼠骨折模型和药物施用

[0306] 长骨节段性缺损模型已被广泛用于骨愈合和再生的研究(Sato等人,2014)。在本研究中,在10周龄雄性大鼠中产生3mm股骨缺损,并且通过使用8-孔PEEK板(RIS.602.105, RISystem,Switzerland)来使其稳定。在将骨钻孔并用螺钉固定之前,在骨干中部用钳子将所述板固定至骨。使用0.44mm吉利线锯产生3mm骨折裂隙。使用Faxitron (MX-20-DC5, Faxitron Bioptics LLC,USA)通过X-射线成像来对缺损大小/一致性/固定进行质量控制,将该时间点定义为第0天。

[0307] 在第1天开始每周按剂量给药,持续8周的时间段,如在表1中所概述的。

[0308] 随后,在该研究的活体阶段期间,在第11、25、39和57天获取X-射线图像,以便评估骨痂形成和愈合进展。

[0309] 使用定义图像分析来定量在所捕获的X-射线图像中没有骨组织的缺损的面积。

[0310] 表6:治疗组

组	动物数目	治疗	剂量	按剂量给药制度	时间
[0311] 1	10	载料	载料: 1 ml, s.c.	一次/周	总共 57 天
2	10	抗-Gremlin-1	30 mg/kg, 1 ml, s.c.	一次/周	

[0312] 骨折愈合的微型CT分析

[0313] 使用微型CT(SkyScan 1076)以17.2 $\mu$ m分辨率扫描股骨(骨折侧)。获取在中心具有骨折的骨痂的大约15mm的区域。使用Skyscan NRECON软件(1.7.10)来重构扫描,然后进一步分割经重构的片层以排除在从股骨骨折缺损的中点计算的3mm规定区域处的固定钢钉。

[0314] 通过SkyScan软件(v.1.13.1)来进行以3D的骨折骨痂的组织形态计量学分析。确定在3mm股骨骨折缺损内的中点,并且对于所测量的每个肢体分割离该中点远侧和近侧1.5mm的片层。随后,按照两个所定义的阈值(一个描绘低矿物化骨痂(因此定量新形成的骨),和另一个定义成熟骨)来进行经重构的数据集组的二值化以及分割。对于被归类为低应答者(基于满足股骨缺损的不完全桥接的标准)或高应答者(展示出骨折位点的桥接)的动物的股骨进行这些数据的进一步分割。

[0315] 骨折的组织形态计量学分析

[0316] 将股骨在10%中性缓冲的福尔马林中固定24小时,脱水,并且在低温下包埋在甲基丙烯酸甲酯(MMA)中。用甲苯胺蓝对50 $\mu$ m厚的切片进行染色以定量愈合性裂隙缺损的骨成分。

[0317] 对于骨折缺损位点的骨小梁骨测量组织形态计量学参数。测量通过图像分析来进行。

[0318] 统计学分析

[0319] 结果呈现为平均值 $\pm$ SD。用GraphPad Prism软件,通过使用双尾Mann Whitney U检验来进行统计学分析,除非另外说明。

[0320] 8.2.结果

[0321] 在该研究的活体阶段期间获得的X-射线图像的分析表明,抗-gremlin-1抗体加速骨折愈合,其中在25天后对照组和治疗组显著地相异( $P < 0.05$ )。该效应对于该研究的其余部分是明显的(图5)。

[0322] 定期样品的微型CT分析揭示了,用抗-gremlin-1抗体进行治疗(30mg/kg/每周一次)导致在骨折骨痂位点内新形成的骨的增加( $P = 0.06$ )。

[0323] 没有干预,在该模型中不连合性骨折的发生率为大约60%(Sato等人,2014)。为了测试gremlin-1抑制是否减少不连合发展的发生率,将动物归类为低应答者(LR)和高应答者(HR)。Gremlin-1抑制导致相比于对照而言在低应答者组中在LMB(低矿物质骨;新形成的骨)( $P < 0.01$ )和HMB(高矿物质骨;成熟骨)( $P < 0.01$ )内骨体积/组织体积的百分比(BV/TV%)

的显著增加,因此表明可能形成不连合的群组的逐步修复。

[0324] 另外,响应于抗-gremlin-1治疗,在高应答者组中存在朝向增加的LMB和HMB BV/TV%的趋势(非显著的)(图6A,LR和HR的代表性图像显示在图6B中)。

[0325] 在骨折位点的组织学切片上进行骨参数的二维组织形态计量学分析(图7)。相比于对照而言,用抗-gremlin-1抗体进行治疗显著地增加骨体积/组织体积的百分比(BV/TV%)( $P<0.05$ )。抗-gremlin-1显著地增加了骨小梁数目(Tb.N)( $P<0.001$ ),并且显著地降低了骨小梁分离度(Tb.Sp)( $P<0.01$ ),这表明了由于用抗-gremlin-1进行治疗而引起的增加的骨小梁骨。

[0326] 通过比较在 $\mu$ Ct分析和骨折切片的二维组织形态计量学分析中所划分的LMB和HMB组,在二维组织形态计量学分析和三维 $\mu$ CT分析之间进行相互关联(图8)。通过Pearson相关性所测量的比较揭示了在LMB组( $P<0.0001$ )和HMB组( $P<0.0001$ )中在组织形态计量学和 $\mu$ CT分析之间的正的且显著的相关性,因此验证了来自每个数据集组的数据。

[0327] 8.3. 结论

[0328] 使用中和性抗-gremlin-1抗体的gremlin-1活性的抑制导致加速的骨折修复,其中在25天(3个剂量的抗体)后在对照组和治疗组之间具有明显的显著差异。另外,骨折位点的定期分析表明了低应答者动物中增强的骨组织形成,否则这些动物可能形成不连合。因此,gremlin-1活性的抑制对于预防或治疗不连合性骨折来说是有前景的疗法,并且对于治疗倾向于不连合发展的骨折例如胫骨、远端桡骨、股骨颈和舟骨来说可能具有特别的价值。

[0329] 序列表

[0330] SEQ ID NO:1(人Gremlin-1;Uniprot ID:060565)

[0331] MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTAMP  
GEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKP  
KKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

[0332] SEQ ID NO:2(具有N-末端标签的在晶体学中所使用的人经截短的Gremlin-1)

[0333] MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTI  
INRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

[0334] SEQ ID NO:3(Ab7326 HCDR1,组合式Kabat&Chothia)

[0335] GYTFTDYMH

[0336] SEQ ID NO:4(Ab7326 HCDR1,Kabat)

[0337] DYYMH

[0338] SEQ ID NO:5(Ab7326 HCDR2,Kabat)

[0339] LVPEDGETIYAEKFQG

[0340] SEQ ID NO:6(Ab7326 HCDR3,Kabat)

[0341] DARGSGSYYPNHFYD

[0342] SEQ ID NO:7(Ab7326 LCDR1,Kabat)

[0343] KSSQSVLYSSNNKNYLA

[0344] SEQ ID NO:8(Ab7326 LCDR2,Kabat)

[0345] WASTRES

- [0346] SEQ ID NO:9 (Ab7326 LCDR3, Kabat)  
[0347] QQYYDTPT  
[0348] SEQ ID NO:10 (Ab7326重链可变区变体1)  
[0349] QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSS  
[0350] SEQ ID NO:11 (Ab7326轻链可变区变体1)  
[0351] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK  
[0352] SEQ ID NO:12 (Ab7326重链可变区变体2)  
[0353] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSS  
[0354] SEQ ID NO:13 (Ab7326轻链可变区变体2)  
[0355] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK  
[0356] SEQ ID NO:14 (小鼠全长IgG1重链变体1)  
[0357] QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM  
VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSVTVPSSTWVPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIKVP  
RDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVT CVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST  
FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPED  
ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK  
[0358] SEQ ID NO:15 (小鼠全长IgG1轻链变体1)  
[0359] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTDAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYF  
KDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC  
[0360] SEQ ID NO:16 (人全长IgG1重链变体2)  
[0361] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEV  
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
[0362] SEQ ID NO:17 (人全长IgG1轻链变体2)  
[0363] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
[0364] SEQ ID NO:18 (Fab重链变体1)  
[0365] QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEV  
PKSC

[0366] SEQ ID NO:19 (Fab轻链变体1)

[0367] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0368] SEQ ID NO:20 (没有N-末端标签的在晶体学中所使用的人经截短的Gremlin-1)

[0369] AMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEE  
GSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

[0370] SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:1的成熟的Gremlin-1序列,缺乏氨基酸1-21的信号肽)

[0371] KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDW  
CKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRV  
TRVKQCRCISIDL

[0372] SEQ ID NO:22 (人IgG4P重链变体1)

[0373] QVQLVESGAEVKPKGATVKISCKVSGYFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHNKPSNTKVDKRV  
SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0374] SEQ ID NO:23 (人IgG4P轻链变体1)

[0375] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0376] SEQ ID NO:24 (人IgG1重链DNA变体1)

[0377] caagtgaactggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccggagccactgtgaagatctcttgcaa  
agtgtccggctacacctcaccgactattacatgcactgggtccagcagccactgggaagggccttgagtggatg  
ggtctggtcgatcccaggacggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgcgtcaccatcaccgccgaca  
cttccaccgacaccgcgtacatggagctgtccagcttgaggtccaggacacagccgtgtactactgcgccacgga  
tgctcggggaagcggcagctactaccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtctcgagc  
gcttctacaaagggcccctccgtgttcccgtcgtcctcatcaggaagctaccagcggaggcactgcggctctcg  
ggttcctcgtgaaggactacttcccggagccgggtgaccgtgtcgtggaacagcggagccctgaccagcggggtgca  
caccttccggccgtcttgagtcagtcagcggcctttactccctgtcatcagtggtgactgtcccgtccagctcattg  
ggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaacctagcaaaccaaggttgacaagaaagtcgagcccaaat  
cgtgtgacaagactcacacttgcgcctgcccggcaccgaactgctgggaggtcccagcgtcttctgttccc  
tccaaagccgaaagacacgctgatgatctcccgcaccccgaggtcacttgcgtggtcgtggacgtgtcacatgag  
gaccagaggtgaagttcaattggtacgtggatggcgtcgaagtcacaaatgccaaaactaagcccagagaagaac  
agtacaattcgacctaccgcgtcgtgtccgtgctcacgggtgttcgcatcaggattggctgaacgggaaggaatacaa  
gtgcaaagtgccaacaaggcgtgccggcaccgatcgagaaaactatctccaaagcgaaggacagcctagggaa

cctcaagtctacacgctgccaccatcacgggatgaactgactaagaatcaagtctcactgacttgtctggtgaagg  
ggttttacctagcgacattgccgtggagtggaatccaacggccagccagagaacaactacaagactaccctcc  
agtgtcgcactcggatggatcgttcttcttactcgaagctcaccgtggataagtcccgggtggcagcagggaaac  
gtgttctcctgctcggatgatgcatgaagccctccataaccactatacccaaaagtcgctgtccctgtcgcgggaa  
ag

[0378] SEQ ID NO:25(人IgG1轻链DNA变体1)

[0379] gacattgtgatgaccagtcctcccgattcgcttgcggtgtccctgggagaacgggccaccattaactg  
caagagctcacagtccgtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggtatcagcagaagcctggacag  
cctccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccggggtgccgtagattctccggatcgggttcgg  
gcactgacttactctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtactacga  
caccgacctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtacgggtggccgctccctccgtgttcatcttccca  
ccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgtcgtgtgctgctgaacaacttctaccccgaggcca  
aggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaagga  
cagcactactccctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaa  
gtgaccaccaggccctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc

[0380] SEQ ID NO:26(人IgG4P重链DNA变体1)

[0381] caagtgaactggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccggagccactgtgaagatctcttgcaa  
agtgtccggctacacctcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacctgggaaggccttgagtggatg  
ggtctggtcgcgtcccaggacggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgcgtccatcaccgccgaca  
cttccaccgacaccgctacatggagctgtccagcttgaggtccgaggacacagccgtgtactactgcgccacgga  
tgctcggggaagcggcagctactacccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtctcgagc  
gcttctacaaagggccccctccgtgttccctctggcccccttgctcccgggtccacctccgagtctaccgccgctctgg  
gctgcctggtaaggactacttcccagccccgtgacagtgctcctggaactctggcgcctgacctccggcgtgca  
caccttccctgccgtgctgagtcctccggcctgtactccctgtcctccgctcgtgacctgacctcctccagcctg  
ggcaccaagacctacacctgtaactggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaagt  
acggccctccctgccccctgccccctgaatttctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcc  
caaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtgacctgcgtgggtggacgtgtcccaggaagatcccgag  
gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaact  
ccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggt  
gtccaacaaggcctgccccagcatcgaagaccatctccaaggccaaggccagccccgagccccaggtg  
tacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggttctacc  
cctccgacattgccgtggaatgggagtcacaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctgga  
cagcagcggctccttcttctgtactctcggctgacctggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctcc  
tgctccgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag

[0382] SEQ ID NO:27(人IgG4P轻链DNA变体1)

[0383] gacattgtgatgaccagtcctcccgattcgcttgcggtgtccctgggagaacgggccaccattaactg  
caagagctcacagtccgtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggtatcagcagaagcctggacag  
cctccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccggggtgccgtagattctccggatcgggttcgg  
gcactgacttactctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtactacga

caccccgacctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtacgggtggccgctccctccgtgttcatcttccca  
ccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctacccccgagggcca  
aggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaagga  
cagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaa  
gtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc

[0384] SEQ ID NO:28 (小鼠全长IgG1重链变体2)

[0385] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHF DYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM  
VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIKVP  
RDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTIITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST  
FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPED  
ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

[0386] SEQ ID NO:29 (小鼠全长IgG1轻链变体2)

[0387] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYP  
KDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNREK

[0388] SEQ ID NO:30 (人全长IgG1重链变体1)

[0389] QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHF DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE  
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0390] SEQ ID NO:31 (人全长IgG1轻链变体1)

[0391] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0392] SEQ ID NO:32 (Fab重链变体2)

[0393] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHF DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE  
PKSC

[0394] SEQ ID NO:33 (Fab轻链变体2)

[0395] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0396] SEQ ID NO:34 (人IgG4P重链变体2)

[0397] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT  
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHF DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST

AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0398] SEQ ID NO:35(人IgG4P轻链变体2)

[0399] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0400] 参考文献

[0401] Bostrom, M.P. & Seigerman, D.A. (2005), HSS journal: The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery 1, 9-18. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study.

[0402] Buza, J.A., 3rd & Einhorn, T. (2016), Clinical cases in mineral and bone metabolism: The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases 13, 101-105. Bone healing in 2016.

[0403] Canalis, E., Parker, K. & Zanotti, S. (2012), J. Cell Physiol 227, 269-277. Gremlin1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis.

[0404] Cho, T.J., Gerstenfeld, L.C. & Einhorn, T.A. (2002), Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research 17, 513-520. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing.

[0405] Einhorn, T.A. & Gerstenfeld, L.C. (2015), Nat. Rev. Rheumatol. 11, 45-54. Fracture healing: mechanisms and interventions.

[0406] Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. & Helms, J.A. (1999), Mechanisms of development 87, 57-66. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?

[0407] Gazzo, E. 等人, (2005), Endocrinology 146, 655-665. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia.

[0408] Gazzo, E. 等人, (2007), J. Biol. Chem. 282, 31549-31557. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass.

[0409] Goulet, J.A., Senunas, L.E., DeSilva, G.L. & Greenfield, M.L. (1997), Clinical Orthopaedics and Related Research, 76-81. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment.

[0410] Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M. & Harland, R.M. (1998), Mol. Cell 1, 673-683. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel

family of secreted proteins that antagonize BMP activities.

[0411] Sato,K.,Watanabe,Y.,Harada,N.,Abe,S.,Matsushita,T.,Yamanaka,K.,Kaneko,T.,&Sakai,Y.(2014)Tissue Eng Part C.Methods 20,1037-1041.

[0412] Schmid,G.J.,Kobayashi,C.,Sandell,L.J.&Ornitz,D.M.(2009),Developmental Dynamics:An Official Publication of the American

[0413] Association of Anatomists 238,766-774.Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice.

[0414] Yu,Y.Y.等人,(2010),Bone 46,841-851.Immunolocalization of BMPs,BMP antagonists,receptors,and effectors during fracture repair.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> UCB Biopharma SPRL
- [0003] <120> 用于治疗骨折或骨缺损的gremlin-1抑制剂
- [0004] <130> PF0117-WO-PCT
- [0005] <160> 35
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 184
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> 重组序列
- [0013] <400> 1
- [0014] Met Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly
- [0015] 1                      5                      10                      15
- [0016] Thr Leu Leu Pro Ala Ala Glu Gly Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala
- [0017]                      20                      25                      30
- [0018] Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln
- [0019]                      35                      40                      45
- [0020] Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg
- [0021]                      50                      55                      60
- [0022] Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala
- [0023] 65                      70                      75                      80
- [0024] Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr
- [0025]                      85                      90                      95
- [0026] Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr
- [0027]                      100                      105                      110
- [0028] Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro
- [0029]                      115                      120                      125
- [0030] Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys
- [0031]                      130                      135                      140
- [0032] Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu
- [0033] 145                      150                      155                      160
- [0034] Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys
- [0035]                      165                      170                      175
- [0036] Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp
- [0037]                      180
- [0038] <210> 2
- [0039] <211> 139
- [0040] <212> PRT
- [0041] <213> 人工序列

[0042] <220>  
 [0043] <223> 重组序列  
 [0044] <400> 2  
 [0045] Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu  
 [0046] 1 5 10 15  
 [0047] Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Met Pro Gly Glu Glu Val Leu Glu Ser Ser  
 [0048] 20 25 30  
 [0049] Gln Glu Ala Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp  
 [0050] 35 40 45  
 [0051] Cys Lys Thr Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn  
 [0052] 50 55 60  
 [0053] Ser Arg Thr Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe  
 [0054] 65 70 75 80  
 [0055] Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys  
 [0056] 85 90 95  
 [0057] Ser Phe Cys Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn  
 [0058] 100 105 110  
 [0059] Cys Pro Glu Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val  
 [0060] 115 120 125  
 [0061] Lys Gln Cys Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp  
 [0062] 130 135  
 [0063] <210> 3  
 [0064] <211> 10  
 [0065] <212> PRT  
 [0066] <213> 人工序列  
 [0067] <220>  
 [0068] <223> 重组序列  
 [0069] <400> 3  
 [0070] Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His  
 [0071] 1 5 10  
 [0072] <210> 4  
 [0073] <211> 5  
 [0074] <212> PRT  
 [0075] <213> 人工序列  
 [0076] <220>  
 [0077] <223> 重组序列  
 [0078] <400> 4  
 [0079] Asp Tyr Tyr Met His  
 [0080] 1 5  
 [0081] <210> 5  
 [0082] <211> 17  
 [0083] <212> PRT

[0084]	<213>	人工序列
[0085]	<220>	
[0086]	<223>	重组序列
[0087]	<400>	5
[0088]		Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
[0089]	1	5 10 15
[0090]		Gly
[0091]	<210>	6
[0092]	<211>	15
[0093]	<212>	PRT
[0094]	<213>	人工序列
[0095]	<220>	
[0096]	<223>	重组序列
[0097]	<400>	6
[0098]		Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp Tyr
[0099]	1	5 10 15
[0100]	<210>	7
[0101]	<211>	17
[0102]	<212>	PRT
[0103]	<213>	人工序列
[0104]	<220>	
[0105]	<223>	重组序列
[0106]	<400>	7
[0107]		Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
[0108]	1	5 10 15
[0109]		Ala
[0110]	<210>	8
[0111]	<211>	7
[0112]	<212>	PRT
[0113]	<213>	人工序列
[0114]	<220>	
[0115]	<223>	重组序列
[0116]	<400>	8
[0117]		Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[0118]	1	5
[0119]	<210>	9
[0120]	<211>	8
[0121]	<212>	PRT
[0122]	<213>	人工序列
[0123]	<220>	
[0124]	<223>	重组序列
[0125]	<400>	9

[0126]	Gln Gln Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr
[0127]	1 5
[0128]	<210> 10
[0129]	<211> 124
[0130]	<212> PRT
[0131]	<213> 人工序列
[0132]	<220>
[0133]	<223> 重组序列
[0134]	<400> 10
[0135]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0136]	1 5 10 15
[0137]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0138]	20 25 30
[0139]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0140]	35 40 45
[0141]	Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
[0142]	50 55 60
[0143]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[0144]	65 70 75 80
[0145]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0146]	85 90 95
[0147]	Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp
[0148]	100 105 110
[0149]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0150]	115 120
[0151]	<210> 11
[0152]	<211> 112
[0153]	<212> PRT
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>
[0156]	<223> 重组序列
[0157]	<400> 11
[0158]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0159]	1 5 10 15
[0160]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
[0161]	20 25 30
[0162]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0163]	35 40 45
[0164]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0165]	50 55 60
[0166]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0167]	65 70 75 80

[0168] Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln  
 [0169] 85 90 95  
 [0170] Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 [0171] 100 105 110  
 [0172] <210> 12  
 [0173] <211> 124  
 [0174] <212> PRT  
 [0175] <213> 人工序列  
 [0176] <220>  
 [0177] <223> 重组序列  
 [0178] <400> 12  
 [0179] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0180] 1 5 10 15  
 [0181] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0182] 20 25 30  
 [0183] Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0184] 35 40 45  
 [0185] Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
 [0186] 50 55 60  
 [0187] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 [0188] 65 70 75 80  
 [0189] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0190] 85 90 95  
 [0191] Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp  
 [0192] 100 105 110  
 [0193] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0194] 115 120  
 [0195] <210> 13  
 [0196] <211> 112  
 [0197] <212> PRT  
 [0198] <213> 人工序列  
 [0199] <220>  
 [0200] <223> 重组序列  
 [0201] <400> 13  
 [0202] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0203] 1 5 10 15  
 [0204] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 [0205] 20 25 30  
 [0206] Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0207] 35 40 45  
 [0208] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0209] 50 55 60

[0210]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0211]	65 70 75 80
[0212]	Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
[0213]	85 90 95
[0214]	Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0215]	100 105 110
[0216]	<210> 14
[0217]	<211> 448
[0218]	<212> PRT
[0219]	<213> 人工序列
[0220]	<220>
[0221]	<223> 重组序列
[0222]	<400> 14
[0223]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0224]	1 5 10 15
[0225]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0226]	20 25 30
[0227]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0228]	35 40 45
[0229]	Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
[0230]	50 55 60
[0231]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[0232]	65 70 75 80
[0233]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0234]	85 90 95
[0235]	Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp
[0236]	100 105 110
[0237]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
[0238]	115 120 125
[0239]	Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn
[0240]	130 135 140
[0241]	Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
[0242]	145 150 155 160
[0243]	Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
[0244]	165 170 175
[0245]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
[0246]	180 185 190
[0247]	Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val
[0248]	195 200 205
[0249]	Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
[0250]	210 215 220
[0251]	Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser

[0252]	225	230	235	240
[0253]	Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu			
[0254]		245	250	255
[0255]	Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro			
[0256]		260	265	270
[0257]	Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala			
[0258]		275	280	285
[0259]	Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val			
[0260]		290	295	300
[0261]	Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe			
[0262]		305	310	315
[0263]	Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
[0264]		325	330	335
[0265]	Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile			
[0266]		340	345	350
[0267]	Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys			
[0268]		355	360	365
[0269]	Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp			
[0270]		370	375	380
[0271]	Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp			
[0272]		385	390	395
[0273]	Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser			
[0274]		405	410	415
[0275]	Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly			
[0276]		420	425	430
[0277]	Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			
[0278]		435	440	445
[0279]	<210> 15			
[0280]	<211> 219			
[0281]	<212> PRT			
[0282]	<213> 人工序列			
[0283]	<220>			
[0284]	<223> 重组序列			
[0285]	<400> 15			
[0286]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0287]		1	5	10
[0288]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser			
[0289]		20	25	30
[0290]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
[0291]		35	40	45
[0292]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
[0293]		50	55	60

[0294]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0295]	65 70 75 80
[0296]	Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
[0297]	85 90 95
[0298]	Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0299]	100 105 110
[0300]	Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
[0301]	115 120 125
[0302]	Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
[0303]	130 135 140
[0304]	Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
[0305]	145 150 155 160
[0306]	Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0307]	165 170 175
[0308]	Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
[0309]	180 185 190
[0310]	Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
[0311]	195 200 205
[0312]	Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[0313]	210 215
[0314]	<210> 16
[0315]	<211> 454
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 人工序列
[0318]	<220>
[0319]	<223> 重组序列
[0320]	<400> 16
[0321]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0322]	1 5 10 15
[0323]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0324]	20 25 30
[0325]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0326]	35 40 45
[0327]	Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
[0328]	50 55 60
[0329]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[0330]	65 70 75 80
[0331]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0332]	85 90 95
[0333]	Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp
[0334]	100 105 110
[0335]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

[0336]	115	120	125
[0337]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
[0338]	130	135	140
[0339]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
[0340]	145	150	155
[0341]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
[0342]		165	170
[0343]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		175
[0344]		180	185
[0345]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		190
[0346]		195	200
[0347]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		205
[0348]		210	215
[0349]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		220
[0350]		225	230
[0351]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		235
[0352]		245	250
[0353]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		255
[0354]		260	265
[0355]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		270
[0356]		275	280
[0357]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		285
[0358]		290	295
[0359]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		300
[0360]		305	310
[0361]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		315
[0362]		325	330
[0363]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		335
[0364]		340	345
[0365]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		350
[0366]		355	360
[0367]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		365
[0368]		370	375
[0369]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		380
[0370]		385	390
[0371]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		395
[0372]		405	410
[0373]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		415
[0374]		420	425
[0375]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		430
[0376]		435	440
[0377]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		445

[0378] 450  
 [0379] <210> 17  
 [0380] <211> 219  
 [0381] <212> PRT  
 [0382] <213> 人工序列  
 [0383] <220>  
 [0384] <223> 重组序列  
 [0385] <400> 17  
 [0386] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0387] 1 5 10 15  
 [0388] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 [0389] 20 25 30  
 [0390] Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0391] 35 40 45  
 [0392] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0393] 50 55 60  
 [0394] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 [0395] 65 70 75 80  
 [0396] Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln  
 [0397] 85 90 95  
 [0398] Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 [0399] 100 105 110  
 [0400] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 [0401] 115 120 125  
 [0402] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 [0403] 130 135 140  
 [0404] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 [0405] 145 150 155 160  
 [0406] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 [0407] 165 170 175  
 [0408] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 [0409] 180 185 190  
 [0410] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 [0411] 195 200 205  
 [0412] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 [0413] 210 215  
 [0414] <210> 18  
 [0415] <211> 227  
 [0416] <212> PRT  
 [0417] <213> 人工序列  
 [0418] <220>  
 [0419] <223> 重组序列

[0420] <400> 18  
 [0421] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0422] 1 5 10 15  
 [0423] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0424] 20 25 30  
 [0425] Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0426] 35 40 45  
 [0427] Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
 [0428] 50 55 60  
 [0429] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 [0430] 65 70 75 80  
 [0431] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0432] 85 90 95  
 [0433] Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp  
 [0434] 100 105 110  
 [0435] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 [0436] 115 120 125  
 [0437] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 [0438] 130 135 140  
 [0439] Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 [0440] 145 150 155 160  
 [0441] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 [0442] 165 170 175  
 [0443] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 [0444] 180 185 190  
 [0445] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 [0446] 195 200 205  
 [0447] Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 [0448] 210 215 220  
 [0449] Lys Ser Cys  
 [0450] 225  
 [0451] <210> 19  
 [0452] <211> 219  
 [0453] <212> PRT  
 [0454] <213> 人工序列  
 [0455] <220>  
 [0456] <223> 重组序列  
 [0457] <400> 19  
 [0458] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0459] 1 5 10 15  
 [0460] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 [0461] 20 25 30

[0462]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0463]	35 40 45
[0464]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0465]	50 55 60
[0466]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0467]	65 70 75 80
[0468]	Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
[0469]	85 90 95
[0470]	Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0471]	100 105 110
[0472]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0473]	115 120 125
[0474]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0475]	130 135 140
[0476]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0477]	145 150 155 160
[0478]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0479]	165 170 175
[0480]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0481]	180 185 190
[0482]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0483]	195 200 205
[0484]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0485]	210 215
[0486]	<210> 20
[0487]	<211> 118
[0488]	<212> PRT
[0489]	<213> 人工序列
[0490]	<220>
[0491]	<223> 重组序列
[0492]	<400> 20
[0493]	Ala Met Pro Gly Glu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala Leu His
[0494]	1 5 10 15
[0495]	Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr Gln Pro
[0496]	20 25 30
[0497]	Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr Ile Ile
[0498]	35 40 45
[0499]	Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro Arg His
[0500]	50 55 60
[0501]	Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys Lys Pro
[0502]	65 70 75 80
[0503]	Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu Leu Gln

[0504]		85		90		95
[0505]	Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys Arg Cys					
[0506]		100		105		110
[0507]	Ile Ser Ile Asp Leu Asp					
[0508]		115				
[0509]	<210> 21					
[0510]	<211> 160					
[0511]	<212> PRT					
[0512]	<213> 人工序列					
[0513]	<220>					
[0514]	<223> 重组序列					
[0515]	<400> 21					
[0516]	Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln					
[0517]	1	5		10		15
[0518]	His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg					
[0519]		20		25		30
[0520]	Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu					
[0521]		35		40		45
[0522]	Val Leu Glu Ser Ser Gln Glu Ala Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr					
[0523]		50		55		60
[0524]	Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His					
[0525]		65		70		75
[0526]	Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly					
[0527]		85		90		95
[0528]	Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly					
[0529]		100		105		110
[0530]	Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met					
[0531]		115		120		125
[0532]	Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys					
[0533]		130		135		140
[0534]	Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp					
[0535]		145		150		155
[0536]	<210> 22					
[0537]	<211> 451					
[0538]	<212> PRT					
[0539]	<213> 人工序列					
[0540]	<220>					
[0541]	<223> 重组序列					
[0542]	<400> 22					
[0543]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[0544]	1	5		10		15
[0545]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr					

[0546]	20	25	30
[0547]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
[0548]	35	40	45
[0549]	Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe		
[0550]	50	55	60
[0551]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr		
[0552]	65	70	75
[0553]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0554]	85	90	95
[0555]	Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp		
[0556]	100	105	110
[0557]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
[0558]	115	120	125
[0559]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu		
[0560]	130	135	140
[0561]	Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
[0562]	145	150	155
[0563]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
[0564]	165	170	175
[0565]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
[0566]	180	185	190
[0567]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn		
[0568]	195	200	205
[0569]	Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser		
[0570]	210	215	220
[0571]	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly		
[0572]	225	230	235
[0573]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0574]	245	250	255
[0575]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln		
[0576]	260	265	270
[0577]	Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0578]	275	280	285
[0579]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr		
[0580]	290	295	300
[0581]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0582]	305	310	315
[0583]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile		
[0584]	325	330	335
[0585]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0586]	340	345	350
[0587]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		

[0588]	355	360	365
[0589]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0590]	370	375	380
[0591]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0592]	385	390	395
[0593]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
[0594]	405	410	415
[0595]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0596]	420	425	430
[0597]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0598]	435	440	445
[0599]	Leu Gly Lys		
[0600]	450		
[0601]	<210> 23		
[0602]	<211> 219		
[0603]	<212> PRT		
[0604]	<213> 人工序列		
[0605]	<220>		
[0606]	<223> 重组序列		
[0607]	<400> 23		
[0608]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0609]	1	5	10
[0610]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
[0611]	20	25	30
[0612]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0613]	35	40	45
[0614]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[0615]	50	55	60
[0616]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0617]	65	70	75
[0618]	Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln		
[0619]	85	90	95
[0620]	Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
[0621]	100	105	110
[0622]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0623]	115	120	125
[0624]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0625]	130	135	140
[0626]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0627]	145	150	155
[0628]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0629]	165	170	175

[0630] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 [0631] 180 185 190  
 [0632] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 [0633] 195 200 205  
 [0634] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 [0635] 210 215  
 [0636] <210> 24  
 [0637] <211> 1362  
 [0638] <212> DNA  
 [0639] <213> 人工序列  
 [0640] <220>  
 [0641] <223> 重组序列  
 [0642] <400> 24  
 [0643] caagtgaac tgggtgaatc cggggccgaa gtgaaaaagc ccggagccac tgtgaagatc 60  
 [0644] tcttgcaaag tgtccgcta caccttacc gactattaca tgcactgggt ccagcaggca 120  
 [0645] cctgggaagg gccttgagt gatgggtctg gtgatcccg aggacggcga aactatctac 180  
 [0646] gccgagaagt tccagggtcg cgtcaccatc accgccgaca cttccaccga caccgcgtac 240  
 [0647] atggagctgt ccagcttgag gtccgaggac acagccgtgt actactgcgc cacggatgct 300  
 [0648] cggggaagcg gcagctacta cccgaaccac ttcgactact ggggacaggg cactctcgtg 360  
 [0649] actgtctcga gcgcttctac aaagggccccc tccgtgttcc cgctcgtcc atcatcgaag 420  
 [0650] tctaccagcg gaggcactgc ggctctcggg tgcctcgtga aggactactt cccggagccg 480  
 [0651] gtgaccgtgt cgtggaacag cggagccctg accagcgggg tgcacacctt tccggccgtc 540  
 [0652] ttgcagtcaa gcggccttta ctccctgtca tcagtgggtga ctgtcccgtc cagctcattg 600  
 [0653] ggaacccaaa cctacatctg caatgtgaat cacaaacctg gcaacaccaa ggttgacaag 660  
 [0654] aaagtcgagc ccaaatcgtg tgacaagact cacacttgtc cgccgtgccc ggcacccgaa 720  
 [0655] ctgtctggag gtcccagcgt ctttctgttc cctccaaagc cgaaagacac gctgatgatc 780  
 [0656] tcccgcacc cggaggtcac ttgcgtggtc gtggacgtgt cacatgagga cccagagggt 840  
 [0657] aagtcaatt ggtacgtgga tggcgtcga gtccacaatg ccaaaactaa gccagagaa 900  
 [0658] gaacagtaca attcgacct cgcgctcgtg tccgtgetca cgggtgttga tcaggattgg 960  
 [0659] ctgaacggga aggaatacaa gtgcaaagt tccaacaagg cgctgccggc accgatcgag 1020  
 [0660] aaaactatct ccaaacgaa gggacagcct agggaacctc aagtctacac gctgccacca 1080  
 [0661] tcacgggatg aactgactaa gaatcaagtc tcaactgactt gtctggtgaa ggggttttac 1140  
 [0662] cctagcgaca ttgccgtgga gtgggaatcc aacggccagc cagagaacaa ctacaagact 1200  
 [0663] acccctccag tgctcgactc ggatggatcg ttcttcttt actcgaagct caccgtggat 1260  
 [0664] aagtcccgtt ggcagcagg aaacgtgttc tctgtctcgg tgatgcatga agccctccat 1320  
 [0665] aaccactata cccaaaagtc gctgtccctg tcgccgggaa ag 1362  
 [0666] <210> 25  
 [0667] <211> 657  
 [0668] <212> DNA  
 [0669] <213> 人工序列  
 [0670] <220>  
 [0671] <223> 重组序列

[0672] <400> 25  
[0673] gacattgtga tgaccagtc ccccgattcg cttgcggtgt ccctgggaga acgggccacc 60  
[0674] attaactgca agagtcaca gtccgtctg tattcatcga acaacaagaa ttacctgca 120  
[0675] tggatcagc agaagcctgg acagcctccc aagctgctca tctactgggc tagcaccgc 180  
[0676] gaatccgggg tgccggatag attctccgga tcgggttcgg gcactgactt cactctgact 240  
[0677] atcaactcac tgcaagccga ggatgtcgcg gtgtacttct gtcagcagta ctacgacacc 300  
[0678] ccgacctttg gacaaggcac cagactggag attaagcgta cggtaggccc tccctccgtg 360  
[0679] ttcatcttcc caccctccga cgagcagctg aagtccgca ccgctccgt cgtgtgacctg 420  
[0680] ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgccctgcag 480  
[0681] tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540  
[0682] tcctccacce tgacctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600  
[0683] gtgaccacc aggccctgtc cagccccgtg accaagtct tcaaccgggg cgagtgc 657  
[0684] <210> 26  
[0685] <211> 1353  
[0686] <212> DNA  
[0687] <213> 人工序列  
[0688] <220>  
[0689] <223> 重组序列  
[0690] <400> 26  
[0691] caagtgaac tgggtggaatc cggggccgaa gtgaaaaagc ccggagccac tgtgaagatc 60  
[0692] tcttgcaaag tgtccggta caccttacc gactattaca tgcactgggt ccagcaggca 120  
[0693] cctgggaagg gccttgagtg gatgggtctg gtcgatcccg aggacggcga aactatctac 180  
[0694] gccgagaagt tccagggtcg cgtcaccatc accgccgaca cttccaccga caccgcgtac 240  
[0695] atggagctgt ccagcttgag gtccgaggac acagccgtgt actactgcgc cacggatgct 300  
[0696] cggggaagcg gcagctacta cccgaaccac ttcgactact ggggacaggg cactctcgtg 360  
[0697] actgtctcga gcgttctac aaagggtccc tccgtgtcc ctctggcccc ttgctcccgg 420  
[0698] tccacctccg agtctaccgc cgctctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgagccc 480  
[0699] gtgacagtgt cctggaactc tggcgcctg acctccggcg tgcacacctt ccctgccgtg 540  
[0700] ctgcagtcct ccggcctgta ctccctgtcc tccgtctgta ccgtgccctc ctccagcctg 600  
[0701] ggcaccaaga cctacacctg taactggac cacaagcct ccaacaccaa ggtggacaag 660  
[0702] cgggtggaat ctaagtacgg ccctccctgc cccccctgcc ctgccctga atttctgggc 720  
[0703] ggaccttccg tgttctgtt cccccaaag cccaaggaca ccctgatgat ctcccggacc 780  
[0704] cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccaggaag atcccaggt ccagttcaat 840  
[0705] tggtagctgg acggcgtgga agtgcacaat gccaaagaca agcccagaga ggaacagttc 900  
[0706] aactccacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accagactg gctgaacggc 960  
[0707] aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag ggcctgccct ccagcatcga aaagaccatc 1020  
[0708] tccaaggcca agggccagcc ccgagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagccaggaa 1080  
[0709] gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtca agggcttcta cccctccgac 1140  
[0710] attgccgtgg aatgggagtc caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200  
[0711] gtgctggaca gcgacggctc cttcttctg tactctcggc tgaccgtgga caagtcccgg 1260  
[0712] tggcaggaag gcaactctt ctctgtctcc gtgatgcag aggccctgca caaccactac 1320  
[0713] acccagaagt ccctgtccct gagcctgggc aag 1353

[0714] <210> 27  
 [0715] <211> 657  
 [0716] <212> DNA  
 [0717] <213> 人工序列  
 [0718] <220>  
 [0719] <223> 重组序列  
 [0720] <400> 27  
 [0721] gacattgtga tgaccagtc ccccgattcg cttgcggtgt ccctgggaga acgggccacc 60  
 [0722] attaactgca agagctcaca gtccgtcctg tattcatcga acaacaagaa ttacctcgca 120  
 [0723] tggatcagc agaagcctgg acagcctccc aagctgctca tctactgggc tagcaccgcg 180  
 [0724] gaatccgggg tgccgatag attctccgga tccgggttcgg gcaactgact cactctgact 240  
 [0725] atcaactcac tgcaagccga ggatgtcgcg gtgtacttct gtcagcagta ctacgacacc 300  
 [0726] ccgaccttg gacaaggcac cagactggag attaagcgtg cgggtggccgc tcctccctg 360  
 [0727] ttcattctcc caccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt cgtgtgcctg 420  
 [0728] ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgccctgcag 480  
 [0729] tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540  
 [0730] tcctccacc tgaccctgac caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600  
 [0731] gtgaccacc agggcctgac cagccccgtg accaagtcct tcaaccgggg cgagtgc 657  
 [0732] <210> 28  
 [0733] <211> 448  
 [0734] <212> PRT  
 [0735] <213> 人工序列  
 [0736] <220>  
 [0737] <223> 重组序列  
 [0738] <400> 28  
 [0739] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0740] 1 5 10 15  
 [0741] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0742] 20 25 30  
 [0743] Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0744] 35 40 45  
 [0745] Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
 [0746] 50 55 60  
 [0747] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 [0748] 65 70 75 80  
 [0749] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0750] 85 90 95  
 [0751] Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp  
 [0752] 100 105 110  
 [0753] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr  
 [0754] 115 120 125  
 [0755] Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn

[0756]	130	135	140
[0757]	Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro		
[0758]	145	150	155 160
[0759]	Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr		
[0760]		165	170 175
[0761]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val		
[0762]		180	185 190
[0763]	Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val		
[0764]		195	200 205
[0765]	Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg		
[0766]	210	215	220
[0767]	Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser		
[0768]	225	230	235 240
[0769]	Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu		
[0770]		245	250 255
[0771]	Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro		
[0772]		260	265 270
[0773]	Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala		
[0774]		275	280 285
[0775]	Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val		
[0776]	290	295	300
[0777]	Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe		
[0778]	305	310	315 320
[0779]	Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[0780]		325	330 335
[0781]	Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile		
[0782]		340	345 350
[0783]	Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys		
[0784]		355	360 365
[0785]	Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp		
[0786]	370	375	380
[0787]	Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp		
[0788]	385	390	395 400
[0789]	Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser		
[0790]		405	410 415
[0791]	Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly		
[0792]		420	425 430
[0793]	Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
[0794]		435	440 445
[0795]	<210> 29		
[0796]	<211> 219		
[0797]	<212> PRT		

[0798] <213> 人工序列  
 [0799] <220>  
 [0800] <223> 重组序列  
 [0801] <400> 29  
 [0802] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0803] 1 5 10 15  
 [0804] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 [0805] 20 25 30  
 [0806] Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0807] 35 40 45  
 [0808] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0809] 50 55 60  
 [0810] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 [0811] 65 70 75 80  
 [0812] Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln  
 [0813] 85 90 95  
 [0814] Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 [0815] 100 105 110  
 [0816] Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 [0817] 115 120 125  
 [0818] Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 [0819] 130 135 140  
 [0820] Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 [0821] 145 150 155 160  
 [0822] Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 [0823] 165 170 175  
 [0824] Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 [0825] 180 185 190  
 [0826] Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 [0827] 195 200 205  
 [0828] Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 [0829] 210 215  
 [0830] <210> 30  
 [0831] <211> 454  
 [0832] <212> PRT  
 [0833] <213> 人工序列  
 [0834] <220>  
 [0835] <223> 重组序列  
 [0836] <400> 30  
 [0837] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0838] 1 5 10 15  
 [0839] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

[0840]		20		25		30													
[0841]	Tyr	Met	His	Trp	Val	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			
[0842]			35					40					45						
[0843]	Gly	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Ala	Glu	Lys	Phe			
[0844]		50						55					60						
[0845]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr			
[0846]	65						70					75				80			
[0847]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[0848]					85					90						95			
[0849]	Ala	Thr	Asp	Ala	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Asn	His	Phe	Asp			
[0850]			100						105							110			
[0851]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys			
[0852]			115						120							125			
[0853]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly			
[0854]		130							135							140			
[0855]	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro			
[0856]	145						150					155				160			
[0857]	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr			
[0858]					165						170					175			
[0859]	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val			
[0860]			180							185						190			
[0861]	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn			
[0862]			195							200						205			
[0863]	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro			
[0864]		210								215						220			
[0865]	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu			
[0866]	225						230						235			240			
[0867]	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp			
[0868]					245							250				255			
[0869]	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp			
[0870]			260													265			
[0871]	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly			
[0872]			275													280			
[0873]	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn			
[0874]			290													295			
[0875]	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp			
[0876]	305						310						315			320			
[0877]	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro			
[0878]					325								330			335			
[0879]	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu			
[0880]			340													345			
[0881]	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn			

[0882]	355	360	365
[0883]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
[0884]	370	375	380
[0885]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
[0886]	385	390	395
[0887]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
[0888]	405	410	415
[0889]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[0890]	420	425	430
[0891]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[0892]	435	440	445
[0893]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0894]	450		
[0895]	<210> 31		
[0896]	<211> 219		
[0897]	<212> PRT		
[0898]	<213> 人工序列		
[0899]	<220>		
[0900]	<223> 重组序列		
[0901]	<400> 31		
[0902]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0903]	1	5	10
[0904]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
[0905]	20	25	30
[0906]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0907]	35	40	45
[0908]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[0909]	50	55	60
[0910]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0911]	65	70	75
[0912]	Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln		
[0913]	85	90	95
[0914]	Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
[0915]	100	105	110
[0916]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0917]	115	120	125
[0918]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0919]	130	135	140
[0920]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0921]	145	150	155
[0922]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0923]	165	170	175

[0924]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0925]	180 185 190
[0926]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0927]	195 200 205
[0928]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0929]	210 215
[0930]	<210> 32
[0931]	<211> 227
[0932]	<212> PRT
[0933]	<213> 人工序列
[0934]	<220>
[0935]	<223> 重组序列
[0936]	<400> 32
[0937]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0938]	1 5 10 15
[0939]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0940]	20 25 30
[0941]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0942]	35 40 45
[0943]	Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
[0944]	50 55 60
[0945]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[0946]	65 70 75 80
[0947]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0948]	85 90 95
[0949]	Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp
[0950]	100 105 110
[0951]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[0952]	115 120 125
[0953]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
[0954]	130 135 140
[0955]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[0956]	145 150 155 160
[0957]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[0958]	165 170 175
[0959]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[0960]	180 185 190
[0961]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
[0962]	195 200 205
[0963]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
[0964]	210 215 220
[0965]	Lys Ser Cys

[0966] 225  
 [0967] <210> 33  
 [0968] <211> 219  
 [0969] <212> PRT  
 [0970] <213> 人工序列  
 [0971] <220>  
 [0972] <223> 重组序列  
 [0973] <400> 33  
 [0974] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0975] 1 5 10 15  
 [0976] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 [0977] 20 25 30  
 [0978] Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0979] 35 40 45  
 [0980] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0981] 50 55 60  
 [0982] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 [0983] 65 70 75 80  
 [0984] Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln  
 [0985] 85 90 95  
 [0986] Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 [0987] 100 105 110  
 [0988] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 [0989] 115 120 125  
 [0990] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 [0991] 130 135 140  
 [0992] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 [0993] 145 150 155 160  
 [0994] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 [0995] 165 170 175  
 [0996] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 [0997] 180 185 190  
 [0998] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 [0999] 195 200 205  
 [1000] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 [1001] 210 215  
 [1002] <210> 34  
 [1003] <211> 451  
 [1004] <212> PRT  
 [1005] <213> 人工序列  
 [1006] <220>  
 [1007] <223> 重组序列

[1008] <400> 34  
 [1009] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1010] 1 5 10 15  
 [1011] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [1012] 20 25 30  
 [1013] Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [1014] 35 40 45  
 [1015] Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
 [1016] 50 55 60  
 [1017] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 [1018] 65 70 75 80  
 [1019] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1020] 85 90 95  
 [1021] Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Asn His Phe Asp  
 [1022] 100 105 110  
 [1023] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 [1024] 115 120 125  
 [1025] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
 [1026] 130 135 140  
 [1027] Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 [1028] 145 150 155 160  
 [1029] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 [1030] 165 170 175  
 [1031] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 [1032] 180 185 190  
 [1033] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn  
 [1034] 195 200 205  
 [1035] Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser  
 [1036] 210 215 220  
 [1037] Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly  
 [1038] 225 230 235 240  
 [1039] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 [1040] 245 250 255  
 [1041] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln  
 [1042] 260 265 270  
 [1043] Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 [1044] 275 280 285  
 [1045] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr  
 [1046] 290 295 300  
 [1047] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 [1048] 305 310 315 320  
 [1049] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile

[1050]		325		330		335
[1051]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
[1052]		340		345		350
[1053]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					
[1054]		355		360		365
[1055]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
[1056]		370		375		380
[1057]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
[1058]		385		390		395
[1059]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val					
[1060]		405		410		415
[1061]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
[1062]		420		425		430
[1063]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
[1064]		435		440		445
[1065]	Leu Gly Lys					
[1066]		450				
[1067]	<210> 35					
[1068]	<211> 219					
[1069]	<212> PRT					
[1070]	<213> 人工序列					
[1071]	<220>					
[1072]	<223> 重组序列					
[1073]	<400> 35					
[1074]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly					
[1075]	1	5		10		15
[1076]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser					
[1077]		20		25		30
[1078]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln					
[1079]		35		40		45
[1080]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val					
[1081]		50		55		60
[1082]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr					
[1083]		65		70		75
[1084]	Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln					
[1085]		85		90		95
[1086]	Tyr Tyr Asp Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys					
[1087]		100		105		110
[1088]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu					
[1089]		115		120		125
[1090]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe					
[1091]		130		135		140

---

[1092] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
[1093] 145 150 155 160  
[1094] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
[1095] 165 170 175  
[1096] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
[1097] 180 185 190  
[1098] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
[1099] 195 200 205  
[1100] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
[1101] 210 215

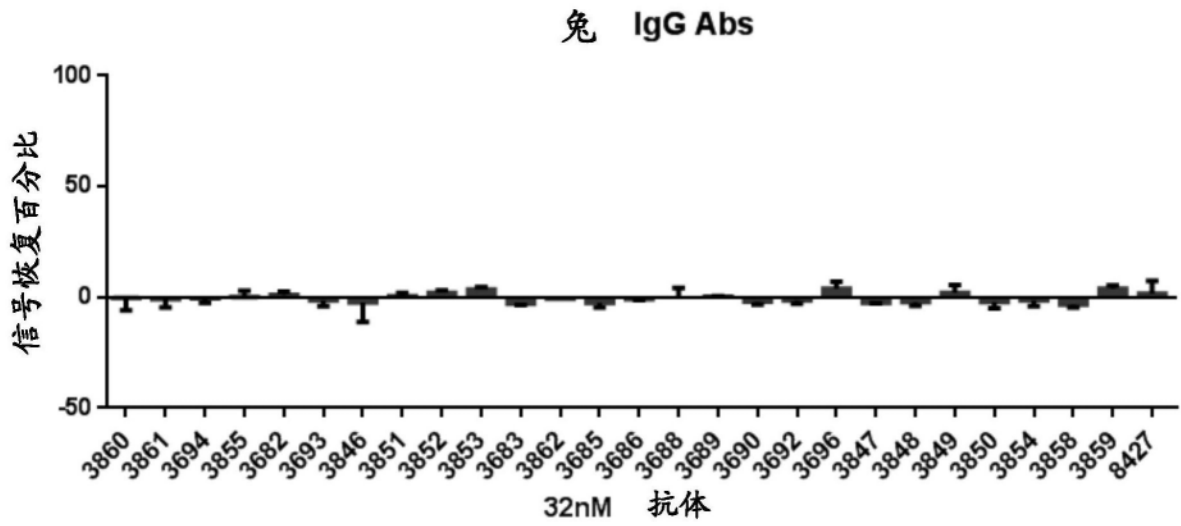


图1

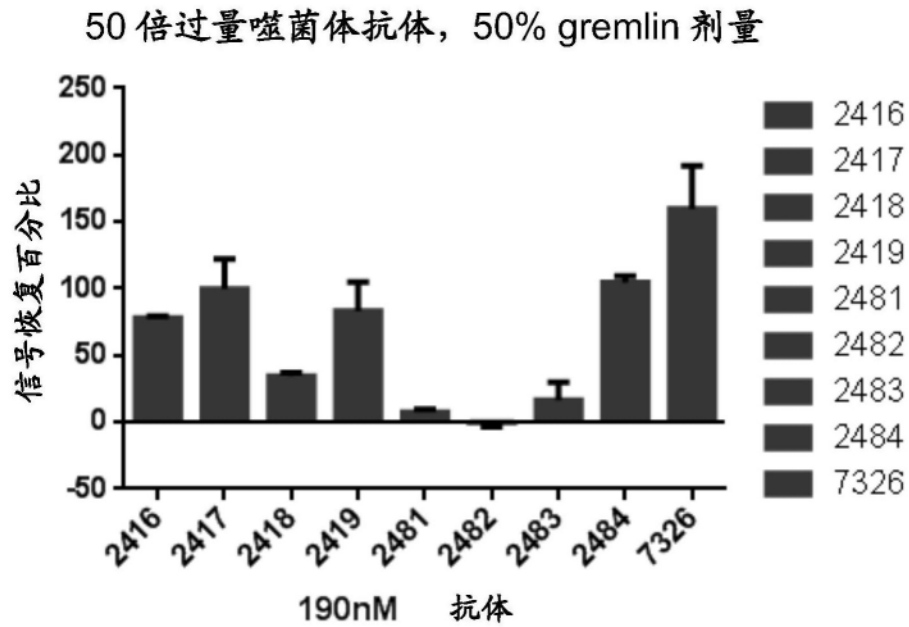
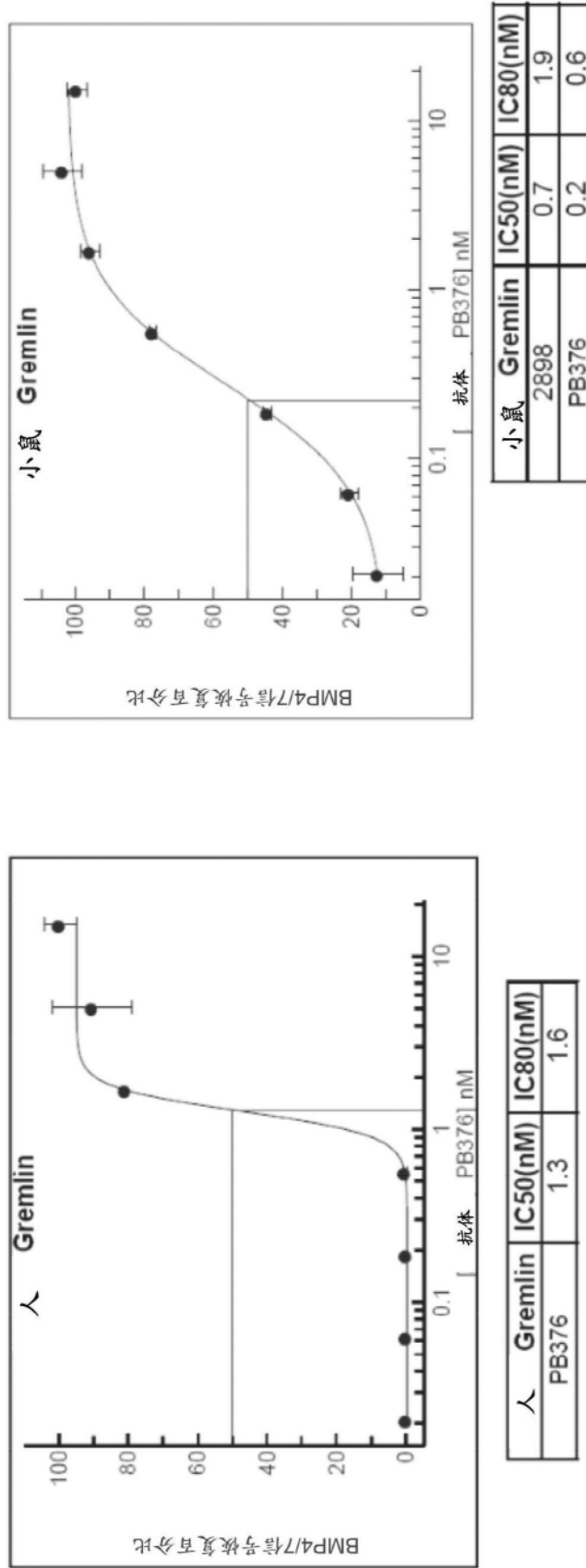


图2

3倍滴定, 7点, 跨越平板最高浓度 15 nM (10倍 100% Gremlin 剂量)



**A**

**B**

图3

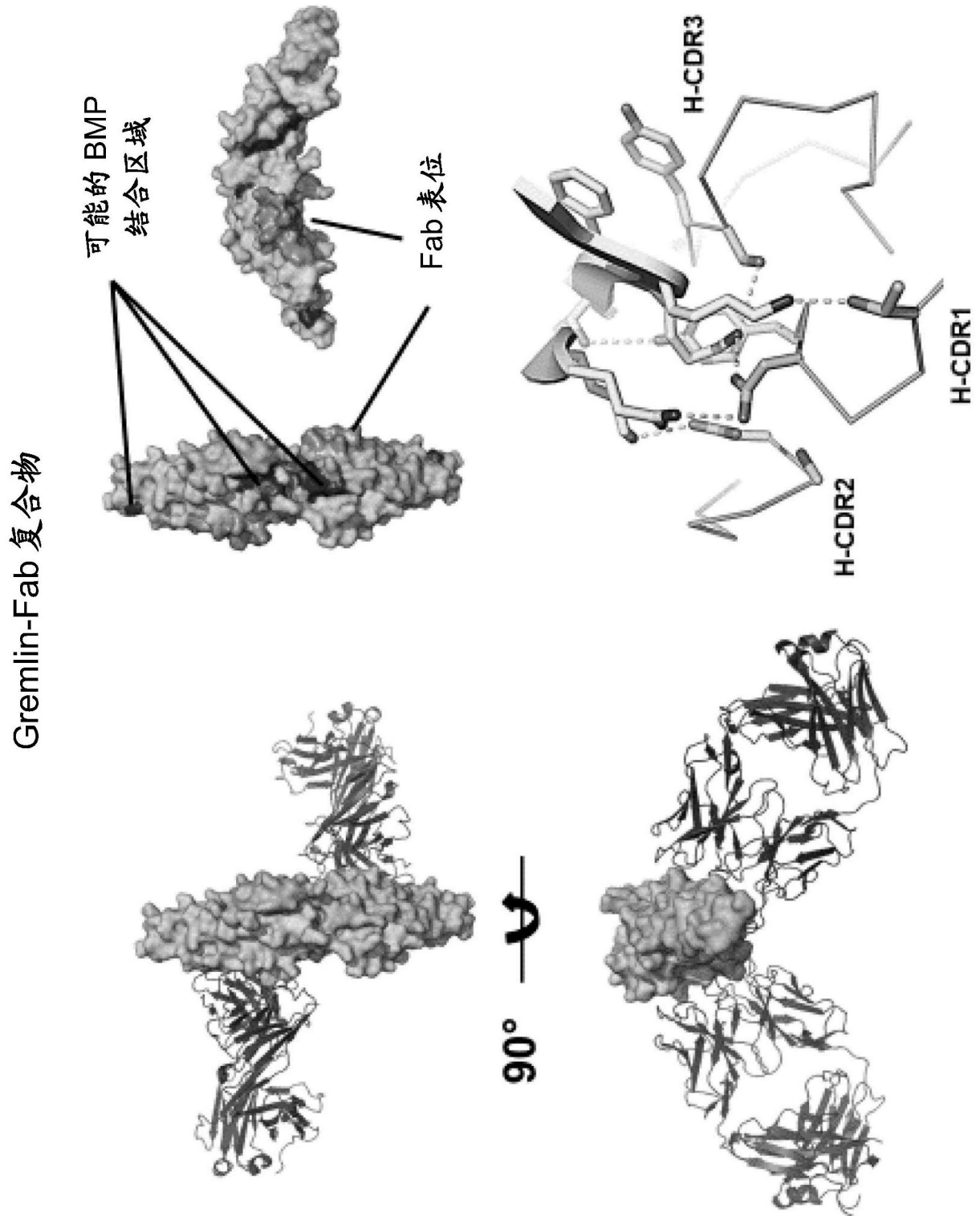


图4

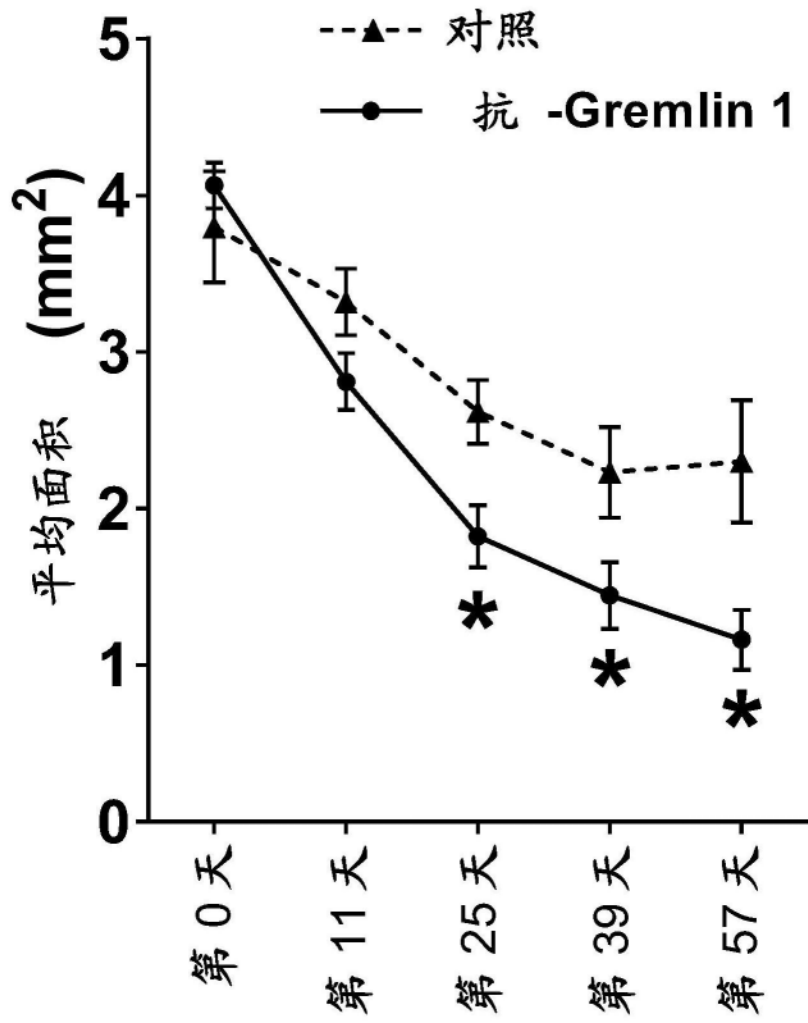


图5

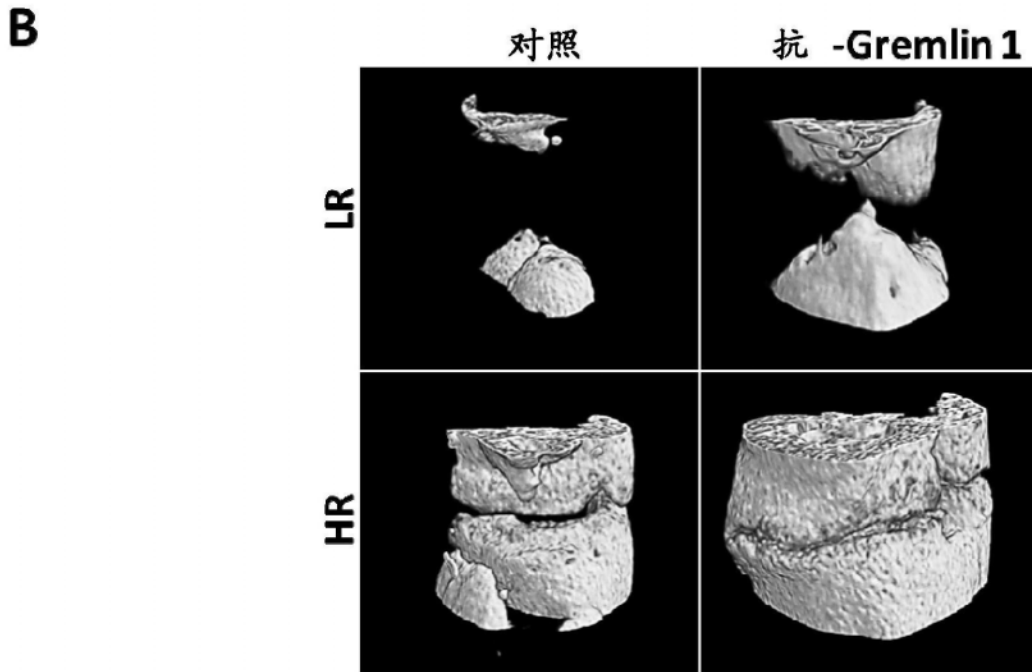
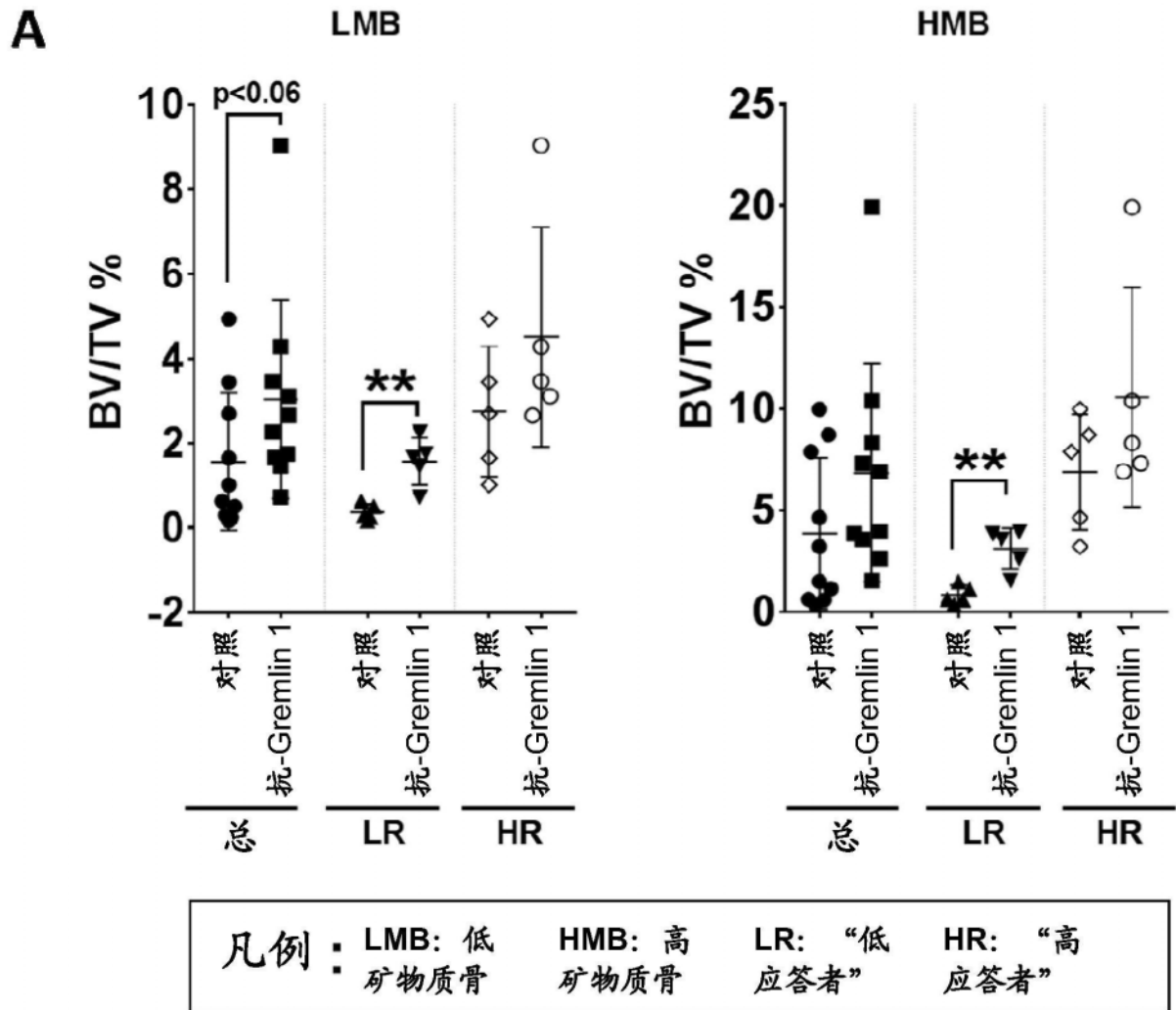


图6

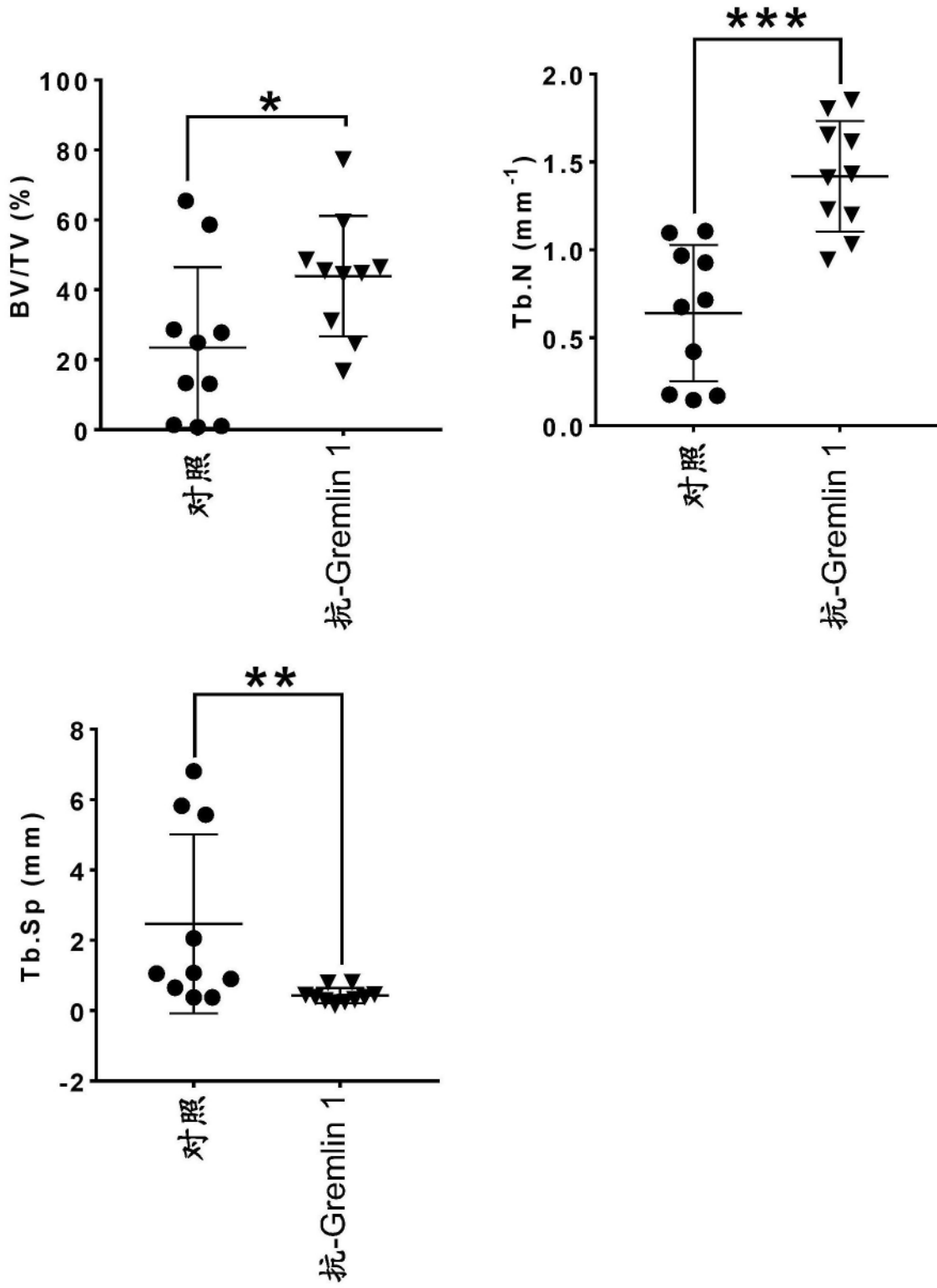
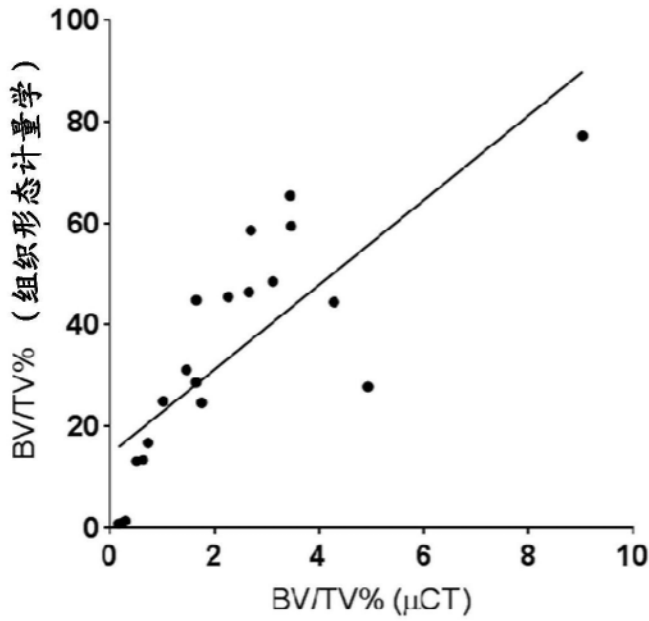


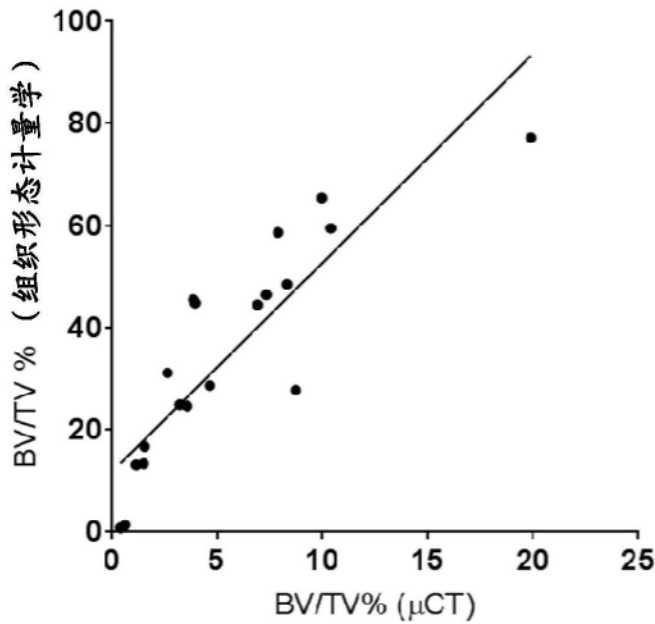
图7

### LMB



Pearson r	
r	0.7871
95% 置信区间	0.5287 至 0.912
R 方	0.6195
P 值	
P (双尾)	<0.0001
P 值总结	****
显著? (α = 0.05)	是
XY 对的数目	20

### HMB



Pearson r	
r	0.8696
95% 置信区间	0.6942 至 0.9475
R 方	0.7562
P 值	
P (双尾)	<0.0001
P 值总结	****
显著? (α = 0.05)	是
XY 对的数目	20

图8