

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-513692
(P2024-513692A)

(43)公表日 令和6年3月27日(2024.3.27)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04		4 C 0 8 6
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08		4 C 2 0 6
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全121頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-555769(P2023-555769)			(71)出願人	522458778	
(86)(22)出願日	令和4年3月11日(2022.3.11)				スーチョウ・トランスセンタ・セラピューティクス・カンパニー・リミテッド	
(85)翻訳文提出日	令和5年11月9日(2023.11.9)				中華人民共和国 ジャンスー 2 1 5 1 2	
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/080297				3, スーチョウ, シンファー・ストリート	
(87)国際公開番号	WO2022/188856				2 1 8, ビー6-5 0 1	
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)			(71)出願人	523347039	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/080142				シャンハイ ジャオ トン ユニバーシティ	
(32)優先日	令和3年3月11日(2021.3.11)				中華人民共和国 シャンハイ 2 0 0 0 3	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				1, シュフイ・ディストリクト, ファシ	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/076516				ャン・ロード 1 9 5 4, メドーエック	
(32)優先日	令和4年2月16日(2022.2.16)				ス・アカデミー, スイート 3 2 7	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			(74)代理人	100118902	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				弁理士 山本 修	
				(74)代理人	100106208	
最終頁に続く				最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 グレムリン1 アンタゴニストを使用して疾患を処置する方法

(57)【要約】
本開示は、P T E Nおよび／またはp 5 3 の欠損を特徴とするG R E M 1 関連疾患または状態に対する処置方法を本明細書で提供する。去勢抵抗性前立腺がんに対する処置方法も本開示により提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

G R E M 1 発現がんを処置する必要がある対象においてそのがんを処置する方法であって、治療有効量の G R E M 1 アンタゴニストを対象に投与するステップを含み、がんが、減少したアンドロゲン受容体 (A R) シグナル伝達を特徴とする方法。

【請求項 2】

がんが、A R 発現がんまたは A R 陰性がんである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

がんが、前立腺がん、乳がん、肺がん、頭頸部がん、精巣がん、子宮内膜がん、卵巣がん、および皮膚がんである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

対象が、アンドロゲン除去療法を受けているもしくは受けたことがある、またはアンドロゲン除去療法に抵抗性である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

がんが転移性であり、任意選択で、がんが転移性前立腺がんであり、さらに任意選択でがんが前立腺がんの肺転移である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

がんが G R E M 1 過剰発現を特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

対象においてアンドロゲン除去療法に対する A R 発現がんの感受性を増加させる方法であって、治療有効量の G R E M 1 アンタゴニストを対象に投与するステップを含む方法。

20

【請求項 8】

P T E N および／もしくは p 5 3 の欠損を特徴とする G R E M 1 関連疾患もしくは状態の処置を必要とする対象においてその疾患もしくは状態を処置する、または F G F R 1 活性化を阻害することを必要とする対象においてその活性化を阻害する、または M A P K シグナル伝達を阻害することを必要とする対象においてそのシグナル伝達を阻害する方法であって、治療有効量の G R E M 1 アンタゴニストを対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 9】

P T E N および／または p 5 3 の欠損が、機能的 P T E N および／または p 5 3 の非存在を特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

P T E N および／または p 5 3 の欠損が、P T E N および／または p 5 3 における不活性化変異の存在を特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

P T E N および／または p 5 3 の欠損が、P T E N および／または p 5 3 発現の非存在を特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

G R E M 1 関連疾患または状態が、G R E M 1 発現または過剰発現を特徴とする、請求項 8 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

G R E M 1 関連疾患または状態が、がん、線維性疾患、血管新生、緑内障または網膜疾患、腎疾患、肺動脈性肺高血圧症、および変形性関節症 (O A) からなる群から選択される、請求項 8 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 14】

G R E M 1 関連疾患または状態ががんである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

がんが、前立腺がん、乳がん、神経膠腫、脂肪肉腫、肝細胞癌、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜癌、子宮平滑筋肉腫、頭頸部の扁平上皮癌、甲状腺がん、肝臓がん、膵臓がん、膀胱がん、結腸がん、食道がん、胆管がん、骨肉腫、神経膠芽腫、卵巣がん、胃がん、トリプルネガティブ乳がん (T N B C)、小細胞肺がんまたは黒色腫である、請求項 14 に

50

記載の方法。

【請求項 16】

がんが前立腺がんである、請求項 1、3～5 および 14～15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前立腺がんが、

- a) アンドロゲン受容体 (AR) 発現に陰性である、
- b) アンドロゲン受容体 (AR) 発現と神経内分泌 (NE) 分化の両方が陰性である；
- c) アンドロゲン除去療法に抵抗性、任意選択で去勢抵抗性である、
- d) 参照レベルよりも低い前立腺特異抗原 (PSA) のレベルを示す、または
- e) a)～d) の任意の組合せである

10

請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

がんが乳がんである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

乳がんがトリプルネガティブ乳がんである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

線維性疾患が、肺線維症、皮膚線維症、糖尿病性腎症、または虚血性腎臓損傷である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 21】

GREM1 アンタゴニストが、GREM1 レベルまたは GREM1 活性を低減する、請求項 1～20 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 22】

GREM1 アンタゴニストが、非がん細胞よりもがん細胞において選択的に GREM1 活性を低減する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

GREM1 アンタゴニストが、抗 GREM1 抗体またはその抗原結合断片、阻害性 GREM1 模倣ペプチド、GREM1 RNA または DNA を標的にする阻害性核酸、該阻害性核酸をコードするポリヌクレオチド、グレムリンと BMP との間の相互作用を阻害する化合物、GREM1 活性を阻害する化合物を含む、請求項 1～22 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 24】

GREM1 RNA または DNA を標的にする阻害性核酸が、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)、マイクロ干渉 RNA (miRNA)、二本鎖 RNA (dsRNA)、低分子干渉 RNA (siRNA)、ガイド RNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

GREM1 アンタゴニストが、GREM1-FGFR1 軸インヒビターを含む、請求項 21～24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

GREM1-FGFR1 軸インヒビターが、GREM1 依存性 FGFR1 シグナル伝達を阻害する、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

GREM1-FGFR1 軸インヒビターが、GREM1 と FGFR1 との間の結合を遮断する、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

GREM1-FGFR1 軸インヒビターが、FGFR1 結合インヒビターを含む、請求項 25～27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

FGFR1 結合インヒビターが、FGFR1 の細胞外ドメイン 2 に結合し、任意選択で

50

残基 G l u 1 6 0 を含むエピトープで F G F R 1 に結合し、残基番号は配列番号 7 5 に従う、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

G R E M 1 - F G F R 1 軸インヒビターが、残基 L y s 1 2 3 および／もしくは残基 L y s 1 2 4 を含むエピトープで h G R E M 1 に結合し、残基番号は配列番号 6 9 に従う；または h G R E M 1 の残基 L y s 1 2 3 および／もしくは残基 L y s 1 2 4 への F G F R 1 の結合を遮断する、請求項 2 5 ～ 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 1】

G R E M 1 アンタゴニストまたは G R E M 1 - F G F R 1 軸インヒビターが、h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項 2 3 ～ 3 0 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 3 2】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、以下の特徴：

- a) 非がん細胞よりもがん細胞において選択的に B M P シグナル伝達に対する h G R E M 1 媒介阻害を低減することができること；
- b) 非がん細胞において B M P シグナル伝達に対する h G R E M 1 媒介阻害の 5 0 % 以下の低減を示すこと；
- c) 配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含むキメラ h G R E M 1 に結合することができること；
- d) h G R E M 1 に結合することができるがマウスグレムリン 1 に特異的に結合することはできないこと；
- e) 残基 G l n 2 7 および／もしくは残基 A s n 3 3 を含むエピトープで h G R E M 1 に結合することであって、残基番号は配列番号 6 9 に従うこと、または残基 G l n 2 7 および／もしくは残基 A s n 3 3 を含む h G R E M 1 断片に結合することであって、任意選択で h G R E M 1 断片は少なくとも 3 （例えば、4、5、6、7、8、9、もしくは 1 0）アミノ酸残基の長さを有すること；
- f) M A P K シグナル伝達に対する h G R E M 1 媒介活性化を低減することができること；ならびに／または
- g) F o r t e b i o により測定された場合 1 n M 以下の K D で h G R E M 1 に結合することができること、

20

のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、線形エピトープまたは立体構造エピトープを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、重鎖可変（V H）領域および／または軽鎖可変（V L）領域を含み、重鎖可変領域が

- a) 配列番号 1、1 1、2 1 および 3 1 からなる群から選択される配列を含む重鎖相補性決定領域 1（H C D R 1）、
 - b) 配列番号 2、1 2、2 2 および 3 2 からなる群から選択される配列を含む H C D R 2、および
 - c) 配列番号 3、1 3、2 3 および 3 3 からなる群から選択される配列を含む H C D R 3 を含み、ならびに／または
- 軽鎖可変領域が
- d) 配列番号 4、1 4、2 4 および 3 4 からなる群から選択される配列を含む軽鎖相補性決定領域 1（L C D R 1）、
 - e) 配列番号 5、1 5、2 5 および 3 5 からなる群から選択される配列を含む L C D R 2、および
 - f) 配列番号 6、1 6、2 6 および 3 6 からなる群から選択される配列を含む L C D R 3 を含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法。

40

50

【請求項 3 5】

重鎖可変領域が、

- e) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - f) 配列番号 1 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 1 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 1 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - g) 配列番号 2 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 2 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；ならびに
 - h) 配列番号 3 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 3 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域
- からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

軽鎖可変領域が、

- e) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - f) 配列番号 1 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 1 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 1 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - g) 配列番号 2 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 2 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 2 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；ならびに
 - h) 配列番号 3 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 3 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 3 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域
- からなる群から選択される、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

- e) 重鎖可変領域が、配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む；ならびに軽鎖可変領域が、配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；
- f) 重鎖可変領域が、配列番号 1 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 1 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 1 3 の配列を含む H C D R 3 を含む；ならびに軽鎖可変領域が、配列番号 1 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 1 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 1 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；
- g) 重鎖可変領域が、配列番号 2 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 2 3 の配列を含む H C D R 3 を含む；ならびに軽鎖可変領域が、配列番号 2 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 2 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 2 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；または
- h) 重鎖可変領域が、配列番号 3 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 3 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 3 の配列を含む H C D R 3 を含む；ならびに軽鎖可変領域が、配列番号 3 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 3 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 3 6 の配列を含む L C D R 3 を含む、請求項 3 4 ～ 3 6 のいずれかに記載の方法。

30

40

【請求項 3 8】

重鎖可変領域が、配列番号 7、配列番号 1 7、配列番号 2 7、配列番号 3 7、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5 および配列番号 5 7、ならびに少なくとも 80 % 配列同一性を有するがグレムリンに対する特異的結合特異性または親和性を保持しているその相同配列からなる群から選択される配列を含む、請求項 3 4 ～ 3 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 9】

軽鎖可変領域が、配列番号 8、配列番号 1 8、配列番号 2 8、配列番号 3 8、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 9、および配列番号 6 1、ならびに少なくとも 80 % 配列同一性を有するがグレムリンに対する特異的結合特異性または親和性を保持しているそ

50

の相同配列からなる群から選択される配列を含む、請求項 34～38 のいずれかに記載の方法。

【請求項 40】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、
i) 配列番号 7 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 の配列を含む軽鎖可変領域；
または
j) 配列番号 17 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 18 の配列を含む軽鎖可変領域；または
k) 配列番号 27 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 28 の配列を含む軽鎖可変領域；または
l) 配列番号 37 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 38 の配列を含む軽鎖可変領域；または
m) 配列番号 41、配列番号 43 および配列番号 45 からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 47 および配列番号 49 からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域；または
n) 配列番号 41 / 47、41 / 49、43 / 47、43 / 49、45 / 47、および 45 / 49 からなる群から選択される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列の対；または
o) 配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55 および配列番号 57 からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 59 および配列番号 61 からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域；または
p) 配列番号 51 / 59、51 / 61、53 / 59、53 / 61、55 / 59、55 / 61、57 / 59、および 57 / 61 からなる群から選択される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列の対を含む、請求項 34～39 のいずれかに記載の方法。

10

20

【請求項 41】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、1つまたは複数のアミノ酸残基置換または改変をさらに含むが、G R E M 1 に対する特異的結合特異性または親和性を保持している、請求項 34～40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 42】

置換また改変のうちの少なくとも1つが、C D R 配列の1つもしくは複数に、および／または V H もしくは V L 配列の非 C D R 領域の1つもしくは複数に存在する、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒト I g の定常領域、または任意選択でヒト I g G の定常領域をさらに含む、請求項 34～42 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

定常領域が、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 の定常領域を含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片がヒト化されている、請求項 32～44 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 46】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、ダイアボディ、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F v 断片、ジスルフィド安定化 F v 断片 (d s F v)、(d s F v)₂、二特異性 d s F v (d s F v - d s F v')、ジスルフィド安定化ダイアボディ (d s ダイアボディ)、一本鎖抗体分子 (s c F v)、s c F v ダイマー (二価ダイアボディ)、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、および二価ドメイン抗体である、請求項 32～45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 47】

50

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が二特異性である、請求項 3 2 ～ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、グレムリンの第 1 および第 2 のエピトープに特異的に結合することができる、または h G R E M 1 と第 2 の抗原の両方に特異的に結合することができる、請求項 3 2 ～ 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

第 2 の抗原が免疫関連標的を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

第 2 の抗原が、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A - 4、T I M - 3、L A G 3、A 2 A R、C D 1 6 0、2 B 4、T G F β 、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、O X 4 0、C D 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 4 7、C D 1 2 2、I C A M - 1、I D O、N K G 2 C、S L A M F 7、S I G L E C 7、N K p 8 0、C D 1 6 0、B 7 - H 3、L F A - 1、1 C O S、4 - 1 B B、G I T R、B A F F R、H V E M、C D 7、L I G H T、I L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、C D 3、C D 1 6 または C D 8 3 を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

10

【請求項 5 1】

第 2 の抗原が腫瘍抗原を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

腫瘍抗原が、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

20

【請求項 5 3】

腫瘍抗原が、前立腺特異抗原 (P S A)、C A - 1 2 5、ガングリオシド G (D 2)、G (M 2) および G (D 3)、C D 2 0、C D 5 2、C D 3 3、E p - C A M、C E A、ボンベシン様ペプチド、H E R 2 / n e u、上皮増殖因子受容体 (E G F R)、e r b B 2、e r b B 3 / H E R 3、e r b B 4、C D 4 4 v 6、K i - 6 7、がん関連ムチン、V E G F、V E G F R (例えば、V E G F R - 1、V E G F R - 2、V E G F R - 3)、エストロゲン受容体、L e w i s - Y 抗原、T G F β 1、I G F - 1 受容体、E G F α 、c - K i t 受容体、トランスフェリン受容体、クローディン 1 8 . 2、G P C - 3、ネクチン - 4、R O R 1、メソセリン、P C M A、M A G E - 1、M A G E - 3、B A G E、G A G E - 1、G A G E - 2、p l 5、B C R - A B L、E 2 A P R L、H 4 - R E T、I G H - I G K、M Y L - R A R、I L - 2 R、C O 1 7 - 1 A、T R O P 2、または L I V - 1 を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、マウス G R E M 1 に対して交差反応性ではない、請求項 3 2 ～ 5 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片が、マウス G R E M 1 に対して交差反応性である、請求項 3 2 ～ 5 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

治療有効量の第 2 の治療薬を投与するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 5 5 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 5 7】

第 2 の治療薬が抗がん治療薬を含み、任意選択で抗がん治療薬が、化学療法薬、放射線治療、免疫療法薬、抗血管新生薬 (例えば、V E G F R - 1、V E G F R - 2、および V E G F R - 3 などの V E G F R のアンタゴニスト)、標的治療薬、細胞療法薬、遺伝子治療薬、ホルモン療法薬、サイトカイン、緩和ケア、がん処置のための手術 (例えば、腫瘍摘出)、1 つもしくは複数の制吐薬、化学療法から生じる併発症用の処置、またはがん患者用の食事補助剤 (例えば、インドール - 3 - カルビノール) から選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

50

抗がん治療薬が、抗前立腺がん薬、任意選択でアンドロゲン除去療法薬を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

抗前立腺がん薬が、アンドロゲン軸インヒビター、アンドロゲン合成インヒビター、P ARP インヒビター、またはそれらの組合せを含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

アンドロゲン軸インヒビターが、黄体ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、LHRH アнтаゴニストおよびアンドロゲン受容体アンタゴニストからなる群から選択される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

アンドロゲン軸インヒビターが、デガレリクス、ビカルタミド、フルタミド、ニルタミド、アパルタミド、ダロルタミド、エンザルタミド、またはアピラテロンである、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 62】

抗前立腺がん薬が、アピラテロンアセテート、アパルタミド、ビカルタミド、カバジタキセル、カソデックス（ビカルタミド）、ダロルタミド、デガレリクス、ドセタキセル、エリガード（リュープロリドアセテート）、エンザルタミド、アーリーダ（アパルタミド）、フィルムゴン（デガレリクス）、フルタミド、ゴセレリンアセテート、ヒストレリン（パンタス）、ジェブタナ（カバジタキセル）、リュープロリドアセテート、ルプロン（リュープロリドアセテート）、ルプロンデポット（リュープロリドアセテート）、リムパーザ（オラパリブ）、ケトコナゾール（ニゾラル）、ミトキサントロン塩酸塩、ニランドロン（ニルタミド）、ニルタミド、ニューベクオ（ダロルタミド）、オラパリブ、プロベンジ（シプリューセル-T）、二塩化ラジウム 223、レルゴリクス（オルゴビクス）、ルブラカ（ルカパリブカンシレート）、ルカパリブカンシレート、シプリューセル-T、タキソテル（ドセタキセル）、トリプトレリン（トレルスター）、ゾーフイゴ（二塩化ラジウム 223）、イクスタンジ（エンザルタミド）、ゾラデックス（ゴセレリンアセテート）およびサイティガ（アピラテロンアセテート）からなる群から選択される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 63】

がんを有するまたはこれを有すると疑われる対象において G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性を決定する方法であって、

（a）対象由来の生体試料においてアンドロゲン受容体（AR）発現またはシグナル伝達を検出するステップ、および

（b）ステップ（a）で検出された AR 発現またはシグナル伝達に基づいて応答性の可能性を決定するステップを含む方法。

【請求項 64】

対象が AR 発現もしくはシグナル伝達がないと検出される、または参照レベルと比べて減少した AR 発現もしくはシグナル伝達を有すると検出される場合、対象が G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性があると決定される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

対象由来の生体試料において G R E M 1 発現を検出するステップをさらに含む、請求項 63 または 64 に記載の方法。

【請求項 66】

対象が G R E M 1 発現を有すると検出される場合、対象が G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性があると決定される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

AR 発現がないと決定されたまたは減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達を有すると決定された試料において G R E M 1 の存在または量を検出する方法であって、試料を G R E M 1 の検出用の検出試薬と接触させるステップ、および試料中の G R E M 1

10

20

30

40

50

の存在または量を決定するステップを含む方法。

【請求項 68】

疾患または状態を有するまたはこれを有すると疑われる対象において G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性を決定する方法であって、

(a) 対象由来の生体試料において P T E N および／または p 5 3 の欠損を検出するステップ、ならびに

(b) ステップ (a) で検出された P T E N および／または p 5 3 の欠損に基づいて応答性の可能性を決定するステップを含む方法。

【請求項 69】

対象が P T E N および／または p 5 3 を欠損していると検出される場合、対象が G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性があると決定される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

対象由来の生体試料において G R E M 1 発現を検出するステップをさらに含む、請求項 68 または 69 に記載の方法。

【請求項 71】

対象が G R E M 1 発現を有すると検出される場合、対象が G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性があると決定される、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

P T E N および／または p 5 3 が欠損していると決定された試料において G R E M 1 の存在または量を検出する方法であって、試料を G R E M 1 の検出用の検出試薬と接触させるステップ、および試料中の G R E M 1 の存在または量を決定するステップを含む方法。

【請求項 73】

試料が、G R E M 1 関連疾患または状態を有するまたはこれを有すると疑われる対象から得られる、請求項 68 ～ 72 のいずれかに記載の方法。

【請求項 74】

G R E M 1 関連疾患または状態が、がん、線維性疾患、血管新生、緑内障もしくは網膜疾患、腎疾患、肺動脈性肺高血圧症、または変形性関節症 (O A) である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

がんが、前立腺がん、乳がん、神経膠腫、脂肪肉腫、肝細胞癌、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜癌、子宮平滑筋肉腫、頭頸部の扁平上皮癌、甲状腺がん、肝臓がん、膵臓がん、膀胱がん、結腸がん、食道がん、胆管がん、骨肉腫、神経膠芽腫、卵巣がん、胃がん、トリプルネガティブ乳がん (T N B C)、小細胞肺癌または黒色腫である、請求項 63 ～ 67、または 74 のいずれかに記載の方法。

【請求項 76】

がんが前立腺がんまたは乳がんであり、前立腺がんが、
a) アンドロゲン除去療法に抵抗性、任意選択で去勢抵抗性であり、および／または
b) 参照レベルよりも低い前立腺特異抗原 (P S A) のレベルを示す
請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

応答性の可能性があると決定された対象に治療有効量の G R E M 1 アンタゴニストを投与するステップをさらに含む、請求項 63 ～ 76 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[0001] 本開示は、一般的には G R E M 1 アンタゴニストを使用して G R E M 1 関連疾患を処置する新規の方法に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

【0002】グレムリン1は、BMPアンタゴニストのDANファミリーにおける高度に保存された分泌タンパク質である。グレムリン1は、BMP-2、BMP-4またはBMP-7に結合してヘテロダイマーを形成し、BMPリガンドが対応するBMP受容体と相互作用するのを妨げ、その後続いてBMPシグナル伝達の活性化を阻害することが報告された。グレムリン1は、胚形成中の中心的タンパク質であり、組織線維性病変ならびに神経膠腫および結腸がんに関連している。しかし、分泌タンパク質としてのグレムリン1についての我々の理解は決して詳細なものではない。BMPシグナル伝達経路を除いて、グレムリン1が非BMP機序を通じてその機能を発揮するのかどうかは明らかにされていない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

【0003】したがって、グレムリン1ターゲティング剤の新規の医療用途を調査する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

【0004】本開示全体を通じて、冠詞「1つ(a)」、「1つ(an)」および「その(the)」は、冠詞の文法的目的語のうちの1つまたは1つよりも多い（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書では使用される。例として、「1つの抗体(an antibody)」とは「1つの抗体」または「1つよりも多い抗体」を意味する。

20

【0005】

【0005】一態様では、本開示は、GREM1発現疾患または状態を処置する必要がある対象においてその疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量のGREM1アンタゴニストを対象に投与するステップを含み、疾患または状態が、減少したまたは阻害されたアンドロゲン受容体(AR)シグナル伝達を特徴とする方法を提供する。

【0006】

【0006】ある特定の実施形態では、対象はARインヒビターを受けているまたは受けたことがある。ある特定の実施形態では、疾患または状態はARインヒビターに抵抗性である。

30

【0007】

【0007】ある特定の実施形態では、疾患または状態は、AR関連がん（例えば、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫、黒色腫、膀胱がん、腎細胞癌、膵臓がん、肝細胞癌、卵巣がん、子宮内膜がん、マントル細胞リンパ腫、もしくは唾液腺がん）、またはAR関連非がん状態（例えば、脱毛、ざ瘡、多毛症、卵巣嚢胞、多嚢胞性卵巣病、思春期早発症、球脊髄性筋萎縮症、もしくは加齢黄斑変性）である。

【0008】

【0008】一態様では、本開示は、本開示は、GREM1発現がんを処置する必要がある対象においてそのがんを処置する方法であって、治療有効量のGREM1アンタゴニストを対象に投与するステップを含み、がんが、減少したアンドロゲン受容体(AR)シグナル伝達を特徴とする方法を提供する。

40

【0009】

【0009】一部の実施形態では、がんは、AR発現がんであるまたはAR陰性がんである。

【0010】

【0010】一部の実施形態では、がんは、前立腺がん、乳がん、肺がん、頭頸部がん、精巣がん、子宮内膜がん、卵巣がん、および皮膚がんである。

【0011】

【0011】一部の実施形態では、対象は、アンドロゲン除去療法を受けているもしくは受けたことがある、またはアンドロゲン除去療法に抵抗性である。

50

【0012】

【0012】一部の実施形態では、がんは、P T E Nおよび／またはp 5 3が欠損していることがさらに決定されている。

【0013】

【0013】一部の実施形態では、がんは転移性である。一部の実施形態では、がんは転移性前立腺がんである。

【0014】

【0014】一部の実施形態では、がんは、がんの肺転移である。一部の実施形態では、がんは前立腺がんの肺転移である。

【0015】

【0015】一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。一部の実施形態では、前立腺がんは、a) アンドロゲン受容体 (A R) 発現に陰性である、b) アンドロゲン受容体 (A R) 発現と神経内分泌 (N E) 分化の両方が陰性である；c) アンドロゲン除去療法に抵抗性、任意選択で去勢抵抗性である、d) 参照レベルよりも低い前立腺特異抗原 (P S A) のレベルを示す、またはe) a) ～d) の任意の組合せである。

【0016】

【0016】一部の実施形態では、がんはG R E M 1過剰発現を特徴とする。

【0017】

【0017】一態様では、本開示は、対象においてアンドロゲン除去療法に対するA R発現がんの感受性を増加させる方法であって、治療有効量のG R E M 1アンタゴニストを対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0018】

【0018】一態様では、本開示は、P T E Nおよび／もしくはp 5 3の欠損を特徴とするG R E M 1関連疾患もしくは状態の処置を必要とする対象においてその疾患もしくは状態を処置する、またはF G F R 1活性化を阻害することを必要とする対象においてその活性化を阻害する、またはM A P Kシグナル伝達を阻害することを必要とする対象においてそのシグナル伝達を阻害する方法であって、治療有効量のG R E M 1アンタゴニストを対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0019】

【0019】一部の実施形態では、P T E Nおよび／またはp 5 3の欠損は、機能的P T E Nおよび／またはp 5 3の非存在を特徴とする。

【0020】

【0020】一部の実施形態では、P T E Nおよび／またはp 5 3の欠損は、P T E Nおよび／またはp 5 3における不活性化変異の存在を特徴とする。

【0021】

【0021】一部の実施形態では、P T E Nおよび／またはp 5 3の欠損は、P T E Nおよび／またはp 5 3発現の非存在を特徴とする。

【0022】

【0022】一部の実施形態では、G R E M 1関連疾患または状態は、G R E M 1発現または過剰発現を特徴とする。

【0023】

【0023】一部の実施形態では、G R E M 1関連疾患または状態は、がん、線維性疾患、血管新生、緑内障または網膜疾患、腎疾患、肺動脈性肺高血圧症、および変形性関節症 (O A) からなる群から選択される。

【0024】

【0024】一部の実施形態では、G R E M 1関連疾患または状態はがんである。

【0025】

【0025】一部の実施形態では、がんは、前立腺がん、乳がん、神経膠腫、脂肪肉腫、肝細胞癌、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜癌、子宮平滑筋肉腫、頭頸部の扁平上皮癌、甲状腺がん、肝臓がん、膵臓がん、膀胱がん、結腸がん、食道がん、胆管がん、骨肉腫、神経

10

20

30

40

50

膠芽腫、卵巣がん、胃がん、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）、小細胞肺がんまたは黒色腫である。

【0026】

【0026】一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。

【0027】

【0027】一部の実施形態では、前立腺がんは、a) アンドロゲン受容体（AR）発現に陰性である、b) アンドロゲン受容体（AR）発現と神経内分泌（NE）分化の両方が陰性である；c) アンドロゲン除去療法に抵抗性、任意選択で去勢抵抗性である、d) 参照レベルよりも低い前立腺特異抗原（PSA）のレベルを示す、またはe) a) ～ d) の任意の組合せである。

【0028】

【0028】一部の実施形態では、がんは乳がんである。

【0029】

【0029】一部の実施形態では、乳がんはトリプルネガティブ乳がんである。

【0030】

【0030】一部の実施形態では、線維性疾患は、肺線維症、皮膚線維症、糖尿病性腎症、または虚血性腎臓損傷である。

【0031】

【0031】一部の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、GREM1レベルまたはGREM1活性を低減する。

【0032】

【0032】一部の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、非がん細胞よりもがん細胞において選択的にGREM1活性を低減する。

【0033】

【0033】一部の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片、阻害性GREM1模倣ペプチド、GREM1 RNAまたはDNAを標的にする阻害性核酸、該阻害性核酸をコードするポリヌクレオチド、グレムリンとBMPとの間の相互作用を阻害する化合物、GREM1活性を阻害する化合物を含む。

【0034】

【0034】一部の実施形態では、GREM1 RNAまたはDNAを標的にする阻害性核酸は、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロ干渉RNA（miRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、ガイドRNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【0035】

【0035】一部の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、GREM1-FGFR1軸インヒビターを含む。

【0036】

【0036】一部の実施形態では、GREM1-FGFR1軸インヒビターは、GREM1依存性FGFR1シグナル伝達を阻害する。

【0037】

【0037】一部の実施形態では、GREM1-FGFR1軸インヒビターは、GREM1とFGFR1との間の結合を遮断する。

【0038】

【0038】一部の実施形態では、GREM1-FGFR1軸インヒビターは、FGFR1結合インヒビターを含む。

【0039】

【0039】一部の実施形態では、FGFR1結合インヒビターは、FGFR1の細胞外ドメイン2に結合し、任意選択で残基Glu160を含むエピトープでFGFR1に結合し、残基番号は配列番号75に従う。

【0040】

10

20

30

40

50

【0040】一部の実施形態では、GREM1-FGFR1軸インヒビターは、残基Lys123および／もしくは残基Lys124を含むエピトープでhGREM1に結合し、残基番号は配列番号69に従う；またはhGREM1の残基Lys123および／もしくは残基Lys124へのFGFR1の結合を遮断する。

【0041】

【0041】一部の実施形態では、GREM1アンタゴニストまたはGREM1-FGFR1軸インヒビターは、hGREM1に対する抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0042】

【0042】一部の実施形態では、抗体は、以下の特徴：a) 非がん細胞よりもがん細胞において選択的にBMPシグナル伝達に対するhGREM1媒介阻害を低減することができること；b) 非がん細胞においてBMPシグナル伝達に対するhGREM1媒介阻害の50%以下の低減を示すこと；c) 配列番号68のアミノ酸配列を含むキメラhGREM1に結合することができること；d) hGREM1に結合することができるがマウスグレムリン1に特異的に結合することはできないこと；e) 残基Gln27および／もしくは残基Asn33を含むエピトープでhGREM1に結合することであって、残基番号は配列番号69に従うこと、または残基Gln27および／もしくは残基Asn33を含むhGREM1断片に結合することであって、任意選択でhGREM1断片は少なくとも3（例えば、4、5、6、7、8、9、もしくは10）アミノ酸残基の長さを有すること；f) MAPKシグナル伝達に対するhGREM1媒介活性化を低減することができること；ならびに／またはg) Fortebioにより測定された場合1nM以下のKDでhGREM1に結合することができること、のうちの少なくとも1つを含む。

【0043】

【0043】一部の実施形態では、抗体は、線形エピトープまたは立体構造エピトープを含む。

【0044】

【0044】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、重鎖可変（VH）領域および／または軽鎖可変（VL）領域を含み、重鎖可変領域はa) 配列番号1、11、21および31からなる群から選択される配列を含む重鎖相補性決定領域1（HCDR1）、b) 配列番号2、12、22および32からなる群から選択される配列を含むHCDR2、およびc) 配列番号3、13、23および33からなる群から選択される配列を含むHCDR3を含み、ならびに／または軽鎖可変領域はd) 配列番号4、14、24および34からなる群から選択される配列を含む軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、e) 配列番号5、15、25および35からなる群から選択される配列を含むLCDR2、およびf) 配列番号6、16、26および36からなる群から選択される配列を含むLCDR3を含む。

【0045】

【0045】一部の実施形態では、重鎖可変領域は、a) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号2の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；b) 配列番号11の配列を含むHCDR1、配列番号12の配列を含むHCDR2、および配列番号13の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；c) 配列番号21の配列を含むHCDR1、配列番号22の配列を含むHCDR2、および配列番号23の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；ならびにd) 配列番号31の配列を含むHCDR1、配列番号32の配列を含むHCDR2、および配列番号33の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域からなる群から選択される。

【0046】

【0046】一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、a) 配列番号4の配列を含むLCDR1、配列番号5の配列を含むLCDR2、および配列番号6の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域；b) 配列番号14の配列を含むLCDR1、配列番号15の配列を含むLCDR2、および配列番号16の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域；c) 配列番号24の配列を含むLCDR1、配列番号25の配列を含むLCDR2、および配列番号

号 2 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；ならびに d) 配列番号 3 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 3 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 3 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域からなる群から選択される。

【 0 0 4 7 】

【0047】一部の実施形態では、a) 重鎖可変領域は、配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含み；ならびに軽鎖可変領域は、配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；b) 重鎖可変領域は、配列番号 1 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 1 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 1 3 の配列を含む H C D R 3 を含み；ならびに軽鎖可変領域は、配列番号 1 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 1 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 1 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；c) 重鎖可変領域は、配列番号 2 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 2 3 の配列を含む H C D R 3 を含み；ならびに軽鎖可変領域は、配列番号 2 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 2 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 2 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；または d) 重鎖可変領域は、配列番号 3 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 3 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 3 の配列を含む H C D R 3 を含み；ならびに軽鎖可変領域は、配列番号 3 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 3 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 3 6 の配列を含む L C D R 3 を含む。

【 0 0 4 8 】

【0048】一部の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号 7、配列番号 1 7、配列番号 2 7、配列番号 3 7、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5 および配列番号 5 7、ならびに少なくとも 8 0 % 配列同一性を有するがグレムリンに対する特異的結合特異性または親和性を保持しているその相同配列からなる群から選択される配列を含む。

【 0 0 4 9 】

【0049】一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 8、配列番号 1 8、配列番号 2 8、配列番号 3 8、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 9、および配列番号 6 1、ならびに少なくとも 8 0 % 配列同一性を有するがグレムリンに対する特異的結合特異性または親和性を保持しているその相同配列からなる群から選択される配列を含む。

【 0 0 5 0 】

【0050】一部の実施形態では、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合断片は、a) 配列番号 7 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 の配列を含む軽鎖可変領域；または b) 配列番号 1 7 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 8 の配列を含む軽鎖可変領域；または c) 配列番号 2 7 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 2 8 の配列を含む軽鎖可変領域；または d) 配列番号 3 7 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 3 8 の配列を含む軽鎖可変領域；または e) 配列番号 4 1、配列番号 4 3 および配列番号 4 5 からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 4 7 および配列番号 4 9 からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域；または f) 配列番号 4 1 / 4 7、4 1 / 4 9、4 3 / 4 7、4 3 / 4 9、4 5 / 4 7、および 4 5 / 4 9 からなる群から選択される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列の対；または g) 配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5 および配列番号 5 7 からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 5 9 および配列番号 6 1 からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域；または h) 配列番号 5 1 / 5 9、5 1 / 6 1、5 3 / 5 9、5 3 / 6 1、5 5 / 5 9、5 5 / 6 1、5 7 / 5 9、および 5 7 / 6 1 からなる群から選択される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列の対を含む。

【 0 0 5 1 】

【0051】一部の実施形態では、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合断片は、1 つまたは複数のアミノ酸残基置換または改変をさらに含むが、G R E M 1 に対する特異的結合特異性または親和性を保持している。

【0052】

【0052】一部の実施形態では、置換また改変のうちの少なくとも1つが、CDR配列の1つもしくは複数に、および／またはVHもしくはVL配列の非CDR領域の1つもしくは複数に存在する。

【0053】

【0053】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒトIgの定常領域、または任意選択でヒトIgGの定常領域をさらに含む。

【0054】

【0054】一部の実施形態では、定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の定常領域を含む。

10

【0055】

【0055】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片はヒト化されている。

【0056】

【0056】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、一本鎖抗体分子(scFv)、scFvダイマー(二価ダイアボディ)、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、および二価ドメイン抗体である。

20

【0057】

【0057】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は二特異性である。

【0058】

【0058】一態様では、本開示は、グレムリンの第1および第2のエピトープに特異的に結合することができる、またはhGREM1と第2の抗原の両方に特異的に結合することができる抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0059】

【0059】一態様では、本開示はその抗原結合断片を提供し、第2の抗原は免疫関連標的を含む。

30

【0060】

【0060】一態様では、本開示はその抗原結合断片を提供し、第2の抗原は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGFB β 、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKP80、CD160、B7-H3、LFA-1、ICOS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16またはCD83を含む。

40

【0061】

【0061】一態様では、本開示はその抗原結合断片を提供し、第2の抗原は腫瘍抗原を含む。

【0062】

【0062】一態様では、本開示はその抗原結合断片を提供し、腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を含む。

【0063】

【0063】一態様では、本開示はその抗原結合断片を提供し、腫瘍抗原は、前立腺特異抗原(PSA)、CA-125、ガングリオシドG(D2)、G(M2)およびG(D3)、CD20、CD52、CD33、EPCAM、CEA、ボンベシン様ペプチド、HE

50

R2/neu、上皮増殖因子受容体(EGFR)、erbB2、erbB3/HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、がん関連ムチン、VEGF、VEGFR(例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)、エストロゲン受容体、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受容体、EGFα、c-Kit受容体、トランスフェリン受容体、クローディン18.2、GPC-3、ネクチン-4、ROR1、メソセリン、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RRAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2、またはLIV-1を含む。

【0064】

【0064】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、マウスGREM1に対して交差反応性ではない。

10

【0065】

【0065】一部の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、マウスGREM1に対して交差反応性である。

【0066】

【0066】一部の実施形態では、方法は、治療有効量の第2の治療薬を投与するステップをさらに含む。

【0067】

【0067】一部の実施形態では、第2の治療薬は抗がん治療薬を含み、任意選択で抗がん治療薬は、化学療法薬、放射線治療、免疫療法薬、抗血管新生薬(例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、およびVEGFR-3などのVEGFRのアンタゴニスト)、標的治療薬、細胞療法薬、遺伝子治療薬、ホルモン療法薬、サイトカイン、緩和ケア、がん処置のための手術(例えば、腫瘍摘出)、1つもしくは複数の制吐薬、化学療法から生じる併発症用の処置、またはがん患者用の食事補助剤(diet supplement)(例えば、インドール-3-カルビノール)から選択される。

20

【0068】

【0068】一部の実施形態では、抗がん治療薬は、抗前立腺がん薬、任意選択でアンドロゲン除去療法薬を含む。

【0069】

【0069】一部の実施形態では、抗前立腺がん薬は、アンドロゲン軸インヒビター、アンドロゲン合成インヒビター、PARPインヒビター、またはそれらの組合せを含む。

30

【0070】

【0070】一部の実施形態では、アンドロゲン軸インヒビターは、黄体ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、LHRHアンタゴニストおよびアンドロゲン受容体アンタゴニストからなる群から選択される。

【0071】

【0071】一部の実施形態では、アンドロゲン軸インヒビターは、デガレリクス、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、アパルタミド、ダロルタミド、エンザルタミド、またはアピラテロンである。

【0072】

40

【0072】一部の実施形態では、抗前立腺がん薬は、アピラテロンアセテート、アパルタミド、ピカルタミド、カバジタキセル、カソデックス(ピカルタミド)、ダロルタミド、デガレリクス、ドセタキセル、エリガード(リユープロリドアセテート)、エンザルタミド、アーリーダ(アパルタミド)、フィルマゴン(デガレリクス)、フルタミド、ゴセレリンアセテート、ヒストレリン(パンタス)、ジェブタナ(カバジタキセル)、リユープロリドアセテート、ルプロン(リユープロリドアセテート)、ルプロンデポット(リユープロリドアセテート)、リムパーザ(オラパリブ)、ケトコナゾール(ニゾラル)、ミトキサントロン塩酸塩、ニランドロン(ニルタミド)、ニルタミド、ニベクオ(ダロルタミド)、オラパリブ、プロベンジ(シプリューセル-T)、二塩化ラジウム223、レルゴリクス(オルゴビクス)、ルブラカ(ルカパリブカンシレート)、ルカパリブカンシ

50

レート、シブリューセル-T、タキソテール（ドセタキセル）、トリプトレリン（トレルスター）、ゾーフイゴ（二塩化ラジウム223）、イクスタンジ（エンザルタミド）、ゾラデックス（ゴセリニンアセテート）およびサイティガ（アピラテロンアセテート）からなる群から選択される。

【0073】

【0073】一態様では、本開示は、がんを有するまたはこれを有すると疑われる対象においてGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性を決定する方法であって、（a）対象由来の生体試料においてアンドロゲン受容体（AR）発現またはシグナル伝達を検出するステップ、および（b）ステップ（a）で検出されたAR発現またはシグナル伝達に基づいて応答性の可能性を決定するステップを含む方法を提供する。

10

【0074】

【0074】一部の実施形態では、対象がAR発現もしくはシグナル伝達がないと検出される、または参照レベルと比べて減少したAR発現もしくはシグナル伝達を有すると検出される場合、対象はGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性があるとして決定される。

【0075】

【0075】一部の実施形態では、方法は、対象由来の生体試料においてGREM1発現を検出するステップをさらに含む。

【0076】

【0076】一部の実施形態では、対象がGREM1発現を有すると検出される場合、対象はGREM1アンタゴニストに反応する可能性があるとして決定される。

20

【0077】

【0077】一態様では、本開示は、AR発現がないと決定されたまたは減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達を有すると決定された試料においてGREM1の存在または量を検出する方法であって、試料をGREM1の検出用の検出試薬と接触させるステップ、および試料中のGREM1の存在または量を決定するステップを含む方法を提供する。

【0078】

【0078】一態様では、本開示は、疾患または状態を有するまたはこれを有すると疑われる対象においてGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性を決定する方法であって、（a）対象由来の生体試料においてPTENおよび／またはp53の欠損を検出するステップ、および（b）ステップ（a）で検出されたPTENおよび／またはp53の欠損に基づいて応答性の可能性を決定するステップを含む方法を提供する。

30

【0079】

【0079】一部の実施形態では、対象がPTENおよび／またはp53を欠損していると検出される場合、対象はGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性があるとして決定される。

【0080】

【0080】一部の実施形態では、方法は、対象由来の生体試料においてGREM1発現を検出するステップをさらに含む。

40

【0081】

【0081】一部の実施形態では、対象がGREM1発現を有すると検出される場合、対象はGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性があるとして決定される。

【0082】

【0082】一態様では、本開示は、PTENおよび／またはp53が欠損していると決定された試料においてGREM1の存在または量を検出する方法であって、試料をGREM1の検出用の検出試薬と接触させるステップ、および試料中のGREM1の存在または量を決定するステップを含む方法を提供する。

【0083】

【0083】一部の実施形態では、試料は、GREM1関連疾患または状態を有するまたは

50

これを有すると疑われる対象から得られる。

【0084】

【0084】一部の実施形態では、GREM1関連疾患または状態は、がん、線維性疾患、血管新生、緑内障もしくは網膜疾患、腎疾患、肺動脈性肺高血圧症、または変形性関節症(OA)である。

【0085】

【0085】一部の実施形態では、がんは、前立腺がん、乳がん、神経膠腫、脂肪肉腫、肝細胞癌、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜癌、子宮平滑筋肉腫、頭頸部の扁平上皮癌、甲状腺がん、肝臓がん、膵臓がん、膀胱がん、結腸がん、食道がん、胆管がん、骨肉腫、神経膠芽腫、卵巣がん、胃がん、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)、小細胞肺がんまたは黒色腫である。

10

【0086】

【0086】一部の実施形態では、がんは前立腺がんまたは乳がんであり、前立腺がんは、a)アンドロゲン除去療法に抵抗性、任意選択で去勢抵抗性でありおよび／またはb)参照レベルよりも低い前立腺特異抗原(PSA)のレベルを示す。

【0087】

【0087】一部の実施形態では、方法は、応答性の可能性があると決定された対象に治療有効量のGREM1アンタゴニストを投与するステップをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1A】[0088]図1Aは、ホルモン感受性PCa(HSPC)(n=474)および去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)(n=60)におけるグレムリン1の免疫組織化学染色画像を示す。代表的な画像が提示されている。スケールバー=100μm。

【図1B】[0089]図1Bは、GREM1染色強度がHSPCよりもCRPCでのほうが有意に高いことを示す。細胞質Hスコアは、Aperio ScanScopeソフトウェアで解析される。

【図1C】[0090]図1Cは、CRPCでのPSAおよびグレムリン1の免疫組織化学染色の画像を示す。スケールバー=200μm。

【図1D】[0091]図1Dは、GREM1 mRNA転写が、R1881(1nM)によるAR活性化により下方調節されており、LNCaP細胞においてエンザルタミド(10μg/ml)によるAR阻害により有意に増加していることを示す。

【図1E】[0092]図1Eは、GREM1タンパク質レベルが、R1881(1nM)によるAR活性化により下方調節されており、LNCaP細胞においてエンザルタミド(10μg/ml)によるAR阻害により有意に増加していることを示す。

【図1F】[0093]図1Fは、GREM1プロモーター駆動ルシフェラーゼ活性がR1881(1nM)によるAR活性化により下方調節されており、LNCaP細胞においてエンザルタミド(10μg/ml)によるAR阻害により有意に増加していることを示す。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、P<0.05；**、P<0.01；***、P<0.001。データは平均±SEMとして提示される。)

【図1G】[0094]図1Gは、R1881またはエンザルタミドで処置するとLNCaP細胞におけるグレムリン1プロモーターに対するARのエンリッチメントレベルを示すクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイの結果を示す。Enz：エンザルタミド。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、P<0.05；**、P<0.01；***、P<0.001。データは平均±SEMとして提示される。)

【図1H】[0095]図1Hは、高いグレムリン1発現を有するほどPCa患者の全生存期間は短くなることを示す(p<0.05)。

【図1I】[0096]図1Iは、GREM1が、Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl}マウス(n=3)由来の他の器官と比べて前立腺がん組織で最も高度に発現されたことを示す。

【図2A】[0097]図2Aは、親LNCaP細胞と比べて、LNCaP去勢抵抗性細胞(

50

LNCaP-R)がグレムリン1のより高い発現を表すことを示す。

【図2B】[0098]図2Bは、AR過剰発現LNCaP細胞でのGREM1発現の免疫ブロット解析を示す。

【図2C】[0099]図2Cは、AR過剰発現LNCaP細胞でのGREM1発現のq-PCR解析を示す。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図2D】[00100]図2Dは、ARノックアウトLNCaP細胞でのGREM1発現の免疫ブロット解析を示す。

【図2E】[00101]図2Eは、ARノックアウトLNCaP細胞でのGREM1発現のq-PCR解析を示す。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図3A】[00102]図3Aは、免疫ブロットがPC3細胞でのGREM1ノックダウンまたはGREM1過剰発現の効率を確認することを示す。

【図3B】[00103]図3Bは、GREM1ノックダウンによりPC3細胞での球体形成能力が抑制され、GREM1過剰発現または外来性グレムリン1タンパク質の添加がプロモーティング効果を表すことを示す。実験は3回実施した。

【図3C】[00104]図3Cは、GREM1ノックダウンによりPC3細胞での細胞増殖が抑制され、GREM1過剰発現または外来性グレムリン1タンパク質の添加がプロモーティング効果を表すことを示す。実験は3回実施した。

【図3D】[00105]図3Dは、GREM1のノックダウンによりPC3細胞での細胞アポトーシスが増加することを示す。

【図3E】[00106]図3Eは、GREM1ノックダウンがインビボでのPC3異種移植片成長を抑えることを示す。

【図3F】[00107]図3Fは、GREM1過剰発現がインビボでのPC3異種移植片形成頻度および腫瘍成長を促進することを示す。スケールバー=1cm。

【図3G】[00108]図3Gは、Gremlin1の過剰発現がHimycマウスPCa由来オルガノイドにおいて免疫ブロットにより確認されることを示す。

【図3H】[00109]図3Hは、グレムリン1が、オルガノイド形成およびHimyc PCaオルガノイドのアンドロゲン除去療法(ADT)トレランスを促進することを示す。(両側スチューデントt検定および2元ANOVA分析を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図4A】[00110]図4Aは、LNCaP細胞でのGREM1ノックダウンおよび過剰発現の効率を確認する免疫ブロットを示す。

【図4B】[00111]図4Bは、GREM1ノックダウンがLNCaP細胞での球体形成能力を阻害し、GREM1過剰発現またはグレムリン1タンパク質の外部添加は正反対の効果を発揮することを示す。

【図4C】[00112]図4Cは、グレムリン1が、アンドロゲン除去療法下でLNCaP PCa細胞の成長を促進することを示す。ADT、アンドロゲン除去療法。実験は3回実施した。

【図4D】[00113]図4Dは、GREM1のノックダウンが、アンドロゲン除去療法によりLNCaP細胞で細胞アポトーシスを増加することを示す。GREM1発現および外来性グレムリン1タンパク質の添加により、ADT処置を受けたLNCaP細胞での細胞アポトーシスは抑えられる。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図5A】[00114]図5Aは、LAPC4細胞でのGREM1過剰発現の効率を確認する免疫ブロットを示す。

10

20

30

40

50

【図5B】[00115]図5Bは、グレムリン1が、LAPC4の球体形成を増強することを示す。

【図5C】[00116]図5Cは、グレムリン1が、ADT処置下でLAPC4細胞の成長を促進することを示す。

【図5D】[00117]図5Dは、GREM1過剰発現が、エンザルタミドで処置すると細胞死を妨げ、減少したAnnexin V/PI染色を特徴とすることを示す。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図6A】[00118]図6Aは、RNA-seqデータの遺伝子セットエンリッチメント解析が、FGFR1およびMAPKシグナル伝達経路はGREM1過剰発現されたLNCaP垂系統において最もエンリッチされたシグナル伝達経路であることを実証することを示す。

10

【図6B】[00119]図6Bは、RNA-seqデータの遺伝子セットエンリッチメント解析が、FGFR1およびMAPKシグナル伝達経路はGREM1過剰発現されたLNCaP垂系統において最もエンリッチされたシグナル伝達経路であることを実証することを示す。

【図6C】[00120]図6Cは、FGFR/MEK/ERKシグナル伝達経路が、PC3細胞およびLNCaP抵抗性細胞において用量依存的にグレムリン1タンパク質により活性化されることを示す。FGF(20 ng/ml)はFGFRを刺激する正の対照として使用される。

20

【図6D】[00121]図6Dは、グレムリン1によるMEK/ERKシグナル伝達経路の活性化がBMP4に非依存的であることを示す。PC3細胞およびLNCaP抵抗性細胞は、BMP4(20 ng/ml)の存在下でまたはBMP4なしでグレムリン1タンパク質で処置された。

【図6E】[00122]図6Eは、グレムリン1(100 ng/ml)処置が、PC3細胞においてFGF(20 ng/ml)よりもFGFR/MEK/ERKシグナル伝達活性化の延長された刺激をもたらすことを示す。

【図6F】[00123]図6Fは、グレムリン1(100 ng/ml)処置が、LNCaP細胞においてFGF(20 ng/ml)よりもFGFR/MEK/ERKシグナル伝達活性化の延長された刺激をもたらすことを示す。

30

【図6G】[00124]図6Gは、FGFR/MEK/ERKシグナル伝達経路の活性化がCRISPR/Cas9媒介FGFR1ノックアウトにより抑制されることを示す。

【図6H】[00125]図6Hは、グレムリン1がFGFRを通じてMEK/ERKシグナル伝達経路を活性化することを示しており、PC3およびLNCaP抵抗性細胞は、指示通りに、グレムリン1(100 ng/ml)、FGF1(20 ng/ml)、またはFGFR1/2/3インヒビターBGJ398(1 μ M)で処置された。

【図6I】[00126]図6Iは、グレムリン1によるMEK/ERKシグナル伝達経路の活性化がEGFRに非依存性であることを示しており、PC3およびLNCaP抵抗性細胞は、指示通りに、グレムリン1(100 ng/ml)、EGF(20 ng/ml)、またはEGFRインヒビターエルロチニブ(1 μ M)で処置された。

40

【図7A】[00127]図7Aは、親AR依存性LNCaP細胞と比べて、LNCaP去勢抵抗性細胞(LNCaP^R)がFGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の強い活性化を示すことを示す。

【図7B】[00128]図7Bは、FGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路が、対照オルガノイドと比べて、GREM1過剰発現マウスHiMyc PCaオルガノイドで上方調節されていることを示す。

【図8A】[00129]図8Aは、LNCaP細胞増殖に対するグレムリン1タンパク質のプロモーティング効果($n=6$)が、FGFR1またはMEKインヒビターにより抑制されるが、BMP4の添加により影響を受けないことを示しており、BGJ398はFGFR1インヒビターであり、トラメチニブはMEKインヒビターである。

50

【図 8 B】[00130]図 8 B は、球体形成に対するグレムリン 1 タンパク質のプロモーティング効果 ($n=3$) が、FGFR1 または MEK インヒビターにより抑制されるが、BMP4 の添加により影響を受けないことを示しており、BGJ398 は FGFR1 インヒビターであり、トラメチニブは MEK インヒビターである。

【図 8 C】[00131]図 8 C は、LNCaP 細胞での FGFR1 ノックアウトの効率を示す免疫プロット結果を示す。

【図 8 D】[00132]図 8 D は、FGFR1 ノックアウトが LNCaP 細胞増殖に対するグレムリン 1 のプラス効果を有意に減弱することを示す。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図 8 E】[00133]図 8 E は、FGFR1 ノックアウトが球体形成に対するグレムリン 1 のプラス効果を有意に減弱することを示す。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図 9 A】[00134]図 9 A は、FGFR1 が、ストレプトアビジンセンサー (ForBio) 上に固定されたグレムリン 1-ビオチンに結合することを示す ($K_d=1.06E-8M$)。

【図 9 B】[00135]図 9 B は、グレムリン 1 のタンパク質構造と Zdock により模倣される FGFR1 細胞外ドメインの予測される相互作用を示す (<http://zdock.umassmed.edu/>)。タンパク質構造は PDB (<http://www.rcsb.org/>) から作製される。グレムリン 1: 5AEJ; FGFR1: 3ojv。

【図 9 C】[00136]図 9 C は、グレムリン 1 が、フラグタグ付きグレムリン 1 および HA タグ付き FGFR1 発現プラスミドをトランスフェクトされた 293T 細胞および LNCaP 抵抗性細胞において FGFR1 と免疫共沈降することを示す。

【図 9 D】[00137]図 9 D は、内在性グレムリン 1 が、LNCaP 抵抗性細胞において FGFR1 と免疫共沈降することを示す。

【図 9 E】[00138]図 9 E は、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により測定した場合、DAN タンパク質ファミリーのグレムリン 1 は FGFR1 に結合するが、グレムリン 2 も他のメンバーも FGFR1 に結合しないことを示す。

【図 9 F】[00139]図 9 F は、精製されたグレムリン 1 と可溶性 FGFR1 タンパク質の相互作用はプルダウン実験により実証されることを示す。

【図 9 G】[00140]図 9 G は、可溶性 FGFR1 が、PC3 においてグレムリン 1 による FGFR1/MEK/ERK シグナル伝達の活性化を競合的に阻害することを示す。

【図 9 H】[00141]図 9 H は、BiFC アッセイが、LNCaP 抵抗性細胞においてグレムリン 1 と FGFR1 の間の共存を明らかにすることを示す。

【図 9 I】[00142]図 9 I は、LNCaP-R 細胞でのグレムリン 1 および FGFR1 の免疫蛍光染色画像を示す。細胞はグレムリン 1 ($100ng/ml$) または PBS を用いて $37^{\circ}C$ で 10 分間処置した。

【図 9 J】[00143]図 9 J は、切詰め FGFR1 の図を示す。

【図 9 K】[00144]図 9 K は、切詰め FGFR1 とグレムリン 1 (左パネル) または FGFR1 (右パネル) の間の Co-IP アッセイ結果を示す。

【図 9 L】[00145]図 9 L は、グレムリン 1 変異誘発戦略を示す。点変異は太字で下線が引かれている。

【図 9 M】[00146]図 9 M は、グレムリン 1 K123A-K124A 変異体が、グレムリン 1 と FGFR1 の間の免疫共沈降を壊すことを示しており、番号付けは配列番号 69 に関連する。

【図 9 N】[00147]図 9 N は、FGFR1 変異の模式図を示す。点変異は太字で下線が引かれている。

【図 9 O】[00148]図 9 O は、FGFR1 とグレムリン 1 の免疫共沈降が、FGFR1

10

20

30

40

50

E 1 6 0 A 変異により損なわれることを示す。

【図 9 P】[00149]図 9 P は、F G F R 1 変異の模式図を示す。

【図 9 Q】[00150]図 9 Q は、F G F R 1 - C 1 7 6 G または F G F R 1 - R 2 4 8 Q 変異が、F G F 1 と F G F R 1 の免疫共沈降を消失させる（左パネル）が、グレムリン 1 と F G F R 1 の間のタンパク質複合体の形成には影響を及ぼさない（右パネル）ことを示す。

【図 9 R】[00151]図 9 R ~ 9 U は、グレムリン 1 と F G F R 1 の間の結合が、F G F 1 の添加により影響を受けず、逆の場合も同じであることを示しており、これは F o r t e b i o (R)、共免疫染色 (S) およびプルダウン (T、U) アッセイにより明らかにされる。

10

【図 9 S】[00151]図 9 R ~ 9 U は、グレムリン 1 と F G F R 1 の間の結合が、F G F 1 の添加により影響を受けず、逆の場合も同じであることを示しており、これは F o r t e b i o (R)、共免疫染色 (S) およびプルダウン (T、U) アッセイにより明らかにされる。

【図 9 T】[00151]図 9 R ~ 9 U は、グレムリン 1 と F G F R 1 の間の結合が、F G F 1 の添加により影響を受けず、逆の場合も同じであることを示しており、これは F o r t e b i o (R)、共免疫染色 (S) およびプルダウン (T、U) アッセイにより明らかにされる。

【図 9 U】[00151]図 9 R ~ 9 U は、グレムリン 1 と F G F R 1 の間の結合が、F G F 1 の添加により影響を受けず、逆の場合も同じであることを示しており、これは F o r t e b i o (R)、共免疫染色 (S) およびプルダウン (T、U) アッセイにより明らかにされる。

20

【図 9 V】[00152]図 9 V は、グレムリン 1 と F G F R 1 の間の結合ポケットでの重要なアミノ酸残基を強調するドッキングモデルを示す。

【図 1 0 A】[00153]図 1 0 A は、グレムリン 1 に対する抗マウスグレムリン 1 抗体の結合特異性が酵素結合免疫吸着アッセイにより確認されることを示す。A b はこの図では抗マウスグレムリン 1 である。

【図 1 0 B】[00154]図 1 0 B は、グレムリン 1 が去勢 P b s n - C r e 4 ; P T E N ^{f l / f l}; T r p 5 3 ^{f l / f l} マウス P C a モデルで高度に発現されていることを示す。グレムリン 1 免疫染色の代表的な画像が提示されている。

30

【図 1 0 C】[00155]図 1 0 C は、抗グレムリン 1 抗体 (1 0 μ g / m l) が P C a 成長に対して有意な阻害効果を発揮することを示す。明らかな抑制が著しい腫瘍外見に見出される。

【図 1 0 D】[00156]図 1 0 D は、抗グレムリン 1 抗体 (1 0 μ g / m l) が P C a 成長に対して有意な阻害効果を発揮することを示す。明らかな抑制が著しい腫瘍重量に見出される。

【図 1 0 E】[00157]図 1 0 E は、抗グレムリン 1 抗体 (1 0 μ g / m l) が P C a 成長に対して有意な阻害効果を発揮することを示す。明らかな抑制が大量に見出され、P C N A 陽性細胞が有意に減少していた。

【図 1 0 F】[00158]図 1 0 F は、抗グレムリン 1 処置が、去勢 P b s n - C r e ; P T E N ^{f l / f l}; T r p 5 3 ^{f l / f l} マウスでの侵襲性 P C a の成長を著しく抑制することを示す。

40

【図 1 0 G】[00159]図 1 0 G および 1 0 H は、遺伝子セットエンリッチメント解析が、抗グレムリン 1 処置群の前立腺において F G F R シグナル伝達経路の有意な抑制を示すことを明らかにしている。

【図 1 0 H】[00159]図 1 0 G および 1 0 H は、遺伝子セットエンリッチメント解析が、抗グレムリン 1 処置群の前立腺において F G F R シグナル伝達経路の有意な抑制を示すことを明らかにしている。

【図 1 0 I】[00160]図 1 0 I および 1 0 J は、免疫染色および免疫プロット分析が、P b s n - C r e ; P T E N ^{f l / f l}; T r p 5 3 ^{f l / f l} マウスの前立腺における F

50

GFR1/MAPKシグナル伝達経路に対する抗グレムリン1抗体の阻害効果を示すことを明らかにしている。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図10J】[00160]図10Iおよび10Jは、免疫染色および免疫プロット分析が、Pbsn-Cre; PTEN^{fl/fl}; Trp53^{fl/fl}マウスの前立腺におけるFGFR1/MAPKシグナル伝達経路に対する抗グレムリン1抗体の阻害効果を示すことを明らかにしている。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図10K】[00161]図10Kは、グレムリン1 (100 ng/ml) に対する抗体が、エンザルタミド (10 μg/ml) によるインビトロ細胞増殖の阻害を促進することを示す (n = 3)。

【図10L】[00162]図10Lは、抗グレムリン1処置が、LNCaP-R細胞の球体形成能力を抑制することを示す (n = 3)。

【図10M】[00163]図10Mは、FGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の活性化が、LNCaP-R細胞においてグレムリン1抗体により抑制されることを示す。

【図10N】[00164]図10Nは、アネキシン-V/DAPI染色により、抗グレムリン1抗体が細胞死を誘導するのにエンザルタミドとの相乗効果を表すことが実証されることを示す。Ab: 抗ヒトグレムリン1。ADT: 10 μg/mlのエンザルタミドで処置される。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図10O】[00165]図10Oは、Pbsn-Cre4; Pten^{fl/fl}; Trp53^{fl/fl} GEMMでの処置を説明する模式図を示す。2ヶ月目に去勢されたマウスは、指示通りに、抗グレムリン1抗体 (腹腔内、10 mg/kg) またはIgGを2ヶ月間週3回受けた。

【図11A】[00166]図11Aは、グレムリンが、去勢Pbsn-Cre; PTEN^{fl/fl}; Trp53^{fl/fl} PCaにおいて主に上皮細胞により発現されたことを示す。ECAD、Eカドヘリン; VIM、ビメンチン。

【図11B】[00167]図11Bは、グレムリン1抗体処置が、マウスに全身的に施された場合 (週2回10 mg/kg)、大きな副作用を誘導しないことを示す。抗体処置を受けたマウスにおいて末梢血細胞数に明白な変更は検出されない。Ab: 抗mGREM1抗体。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図11C】[00168]図11Cは、グレムリン1抗体処置が、マウスに全身的に施された場合 (週2回10 mg/kg)、大きな副作用を誘導しないことを示す。抗体処置を受けたマウスにおいて主要器官に明白な変更は検出されない。Ab: 抗mGREM1抗体。(両側スチューデントt検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均±SEMとして提示される。)

【図12A】[00169]図12Aは、グレムリン1への抗ヒトグレムリン1 (14E3) の結合特異性が、酵素結合免疫吸着アッセイにより確認されることを示す。Abはこの図では抗ヒトグレムリン1である。

【図12B】[00170]図12Bは、ヒトグレムリン1に対する抗体 (10 μg/ml) が、PC3細胞の細胞増殖を抑制することを示す。

【図12C】[00171]図12Cは、抗グレムリン1抗体 (10 μg/ml) がPC3細胞の球体形成に対して阻害効果を発揮することを示す。

【図12D】[00172]図12Dは、グレムリン1抗体が、PC3細胞でのグレムリン1タンパク質によるFGFR1/MEK/ERKシグナル伝達の活性化を用量依存的に中和することを示す。

【図12E】[00173]図12Dおよび12Fは、抗グレムリン1処置が、連続継代実験

10

20

30

40

50

において P C 3 腫瘍異種移植片のインビボ成長を著しく妨げることを示す。抗体は、指示された時点（矢じり参照）で腹腔内注射により $10 \text{ mg} / \text{kg}$ で与えられた。

【図 1 2 F】[00173]図 1 2 D および 1 2 F は、抗グレムリン 1 処置が、連続継代実験において P C 3 腫瘍異種移植片のインビボ成長を著しく妨げることを示す。抗体は、指示された時点（矢じり参照）で腹腔内注射により $10 \text{ mg} / \text{kg}$ で与えられた。

【図 1 3】[00174]図 1 3 は、1 4 E 3 を用いた処置が P C 3 C R P C モデルにおいて腫瘍量を減少させ、パーセント生存を増加したことを示す。

【図 1 4 A】[00175]図 1 4 A は、グレムリン 1 ($100 \text{ ng} / \text{ml}$) に対する抗体が、エンザルタミド ($1 \text{ ug} / \text{ml}$) によるインビトロ細胞増殖の阻害を促進することを示す。

【図 1 4 B】[00176]図 1 4 B は、抗グレムリン 1 処置が L N C a P 細胞の球体形成能力を抑制することを示す。

【図 1 4 C】[00177]図 1 4 C は、F G F R 1 / M E K / E R K シグナル伝達経路の活性化が L N C a P 細胞においてグレムリン 1 抗体により抑制されることを示す。

【図 1 4 D】[00178]図 1 4 D は、アネキシン-V / D A P I 染色により、抗グレムリン 1 抗体が細胞死を誘導するのにエンザルタミドとの相乗効果を表すことが実証されることを示す。A b : 抗ヒトグレムリン 1 1 4 E 3。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均 $\pm$ S E M として提示される。)

【図 1 5】[00179]図 1 5 は、1 4 E 3 が、がん細胞移動に対する G R E M 1 媒介促進を減少させたことを示す。

【図 1 6 A】[00180]図 1 6 A ~ 1 6 C は、1 4 E 3 が、B M P - 結合ループから独立している P S A 低集団のパーセンテージの G R E M 1 媒介増加を減少させたことを示す。

【図 1 6 B】[00180]図 1 6 A ~ 1 6 C は、1 4 E 3 が、B M P - 結合ループから独立している P S A 低集団のパーセンテージの G R E M 1 媒介増加を減少させたことを示す。

【図 1 6 C】[00180]図 1 6 A ~ 1 6 C は、1 4 E 3 が、B M P - 結合ループから独立している P S A 低集団のパーセンテージの G R E M 1 媒介増加を減少させたことを示す。

【図 1 7 A】[00181]図 1 7 A は、免疫ブロットが、L N C a P 細胞での B M P R I I ノックアウトの効率を確認することを示す。

【図 1 7 B】[00182]図 1 7 B および 1 7 C は、B M P R I I ノックアウトが、L N C a P 細胞増殖および球体形成に対するグレムリン 1 抗体の阻害効果に有意な影響を示さないことを明らかにしている。A b : 抗ヒトグレムリン 1 1 4 E 3。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均 $\pm$ S E M として提示される。)

【図 1 7 C】[00182]図 1 7 B および 1 7 C は、B M P R I I ノックアウトが、L N C a P 細胞増殖および球体形成に対するグレムリン 1 抗体の阻害効果に有意な影響を示さないことを明らかにしている。A b : 抗ヒトグレムリン 1 1 4 E 3。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均 $\pm$ S E M として提示される。)

【図 1 8 A】[00183]図 1 8 A は、A M C A R および D A P I の免疫蛍光染色が、患者由来オルガノイドの腫瘍起源を表すことを示す。

【図 1 8 B】[00184]図 1 8 B および 1 8 C は、減少したオルガノイドサイズおよび数により、P D O 形成および成長に対するグレムリン 1 1 4 E 3 に対する抗体の阻害効果が示唆されることを示す。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均 $\pm$ S E M として提示される。)

【図 1 8 C】[00184]図 1 8 B および 1 8 C は、減少したオルガノイドサイズおよび数により、P D O 形成および成長に対するグレムリン 1 1 4 E 3 に対する抗体の阻害効果が示唆されることを示す。(両側スチューデント t 検定を統計解析に使用した。*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。データは平均 $\pm$ S E M として

10

20

30

40

50

提示される。)

【図18D】[00185]図18Dは、この患者由来オルガノイド実験で使用された患者試料の詳細な情報を示す。

【図19A】[00186]図19Aは、それぞれ対照群 (m I g G 2 a) および実験群 (1 4 E 3) 由来のそれぞれのマウスモデルでの腫瘍のヒートマップ画像を示す。対照群および実験群はそれぞれが16頭のマウスを有する。

【図19B】[00187]図19Bは、グレムリン1に対する抗体 (例えば、1 4 E 3) が、P C a 転移マウスモデル研究において体重にはっきりした影響を及ぼさなかったことを示す。

【図19C】[00188]図19Cは、平均放射強度が、P C a 転移マウスモデル研究においてグレムリン1抗体処置で減少したことを示す。

【図19D】[00189]図19Dは、肺組織切片の画像を示しており、矢印は肺の転移部位を示す。

【図19E】[00190]図19Eは、P C a 転移マウスモデル研究における肺中の微小転移の数の統計を示す。

【発明を実施するための形態】

【0089】

【00191】本開示の以下の説明は、本開示の様々な実施形態を説明するために意図されているだけである。したがって、考察される特定の変更は本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本開示の範囲から逸脱することなく様々な均等物、変化、および修正を加えてよいことは当業者には明らかであり、そのような均等な実施形態が本明細書に含まれることは理解される。刊行物、特許および特許出願を含む本明細書に引用されるすべての参考文献は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる。

【0090】

定義

【00192】本明細書で使用される場合、本発明の文脈で (特に、特許請求の範囲という文脈で) 使用される用語「1つ (a)」、「1つ (a n)」、「その (t h e)」および類似する用語は、本明細書で別段指示されなければまたは文脈によりはっきり矛盾しなければ、単数と複数の両方を包含すると解釈されるべきである。

【0091】

【00193】用語「不活性化変異」とは、A R、P T E N および / または p 5 3 などの本明細書で提供されるバイオマーカーに関して本明細書で使用される場合、バイオマーカー (例えば、A R、P T E N および / または p 5 3) の遺伝子もしくは遺伝子産物の機能もしくは活性の少なくとも部分的 (もしくは完全な) 消失をもたらす、または非機能的遺伝子もしくは遺伝子産物をもたらす変異または転写後修飾のことである。例えば、バイオマーカーの影響を受けた遺伝子または遺伝子産物の活性は、野生型対応物よりも有意に低いまたは除去されてさえいると考えられる。不活性化変異は、転座、遺伝子内染色体切断、転置、欠失 (例えば、両アレル欠失、ヘテロ接合性もしくはホモ接合性コピー数損失)、マイクロコピー数変化、挿入、置換、異常スプライシング、またはその任意の組合せが可能であり、これらの変異はバイオマーカーの生物学的活性を減少させる。ある特定の

【0092】

【00194】本明細書で使用される場合、バイオマーカーの一種の不活性化変異として使用される際の用語「欠失」とは、1つもしくは複数のヌクレオ塩基対がポリヌクレオチド配列から失われているもしくは欠失している、または1つもしくは複数のアミノ酸残基がポリペプチド配列から欠失している変異のことである。例えば、この用語は、バイオマーカーの全コード領域またはその一部の欠失、消失、または除去を指すことができる。

【00093】

【00195】本明細書で使用される場合、「置換」とは、ポリヌクレオチド配列において1つのヌクレオ塩基を別のヌクレオ塩基と交換する、またはポリペプチド配列において1つのアミノ酸残基を別のアミノ酸残基と置換する変異のことである。ポリヌクレオチド配列での置換は、1) コドンを変異なるアミノ酸残基をコードするコドンに変え、したがって、産生されるタンパク質のアミノ酸配列に変化を引き起こす、または2) 同じアミノ酸残基をコードするコドンに変え、それによって産生されるタンパク質変化を引き起こさない；または3) アミノ酸コードコドンを変単一の「終止」コドンに変え不完全なタンパク質を引き起こす（不完全なタンパク質は通常、非機能的である）ことができる。

【00094】

【00196】本明細書で使用される場合、「挿入」とは、1つもしくは複数の余分なヌクレオ塩基対がポリヌクレオチド配列の中の場所に挿入される、または1つもしくは複数のアミノ酸残基がポリペプチド配列中に挿入される変異のことである。

【00095】

【00197】本明細書で使用される場合、「転座」とは、2つの非相同染色体間での遺伝物質の交換から生じた一種の染色体異常のことである。転座は平衡していても不平衡でもよく、平衡転座は物質の獲得も損失もなく、不平衡転座は特定の染色体セグメントのトリソミーまたはモノソミーをもたらすことがある。染色体転座は典型的には、例えば、急性骨髄性白血病のような白血病の場合に見られる。

【00096】

【00198】AR、PTENおよび／またはp53などのバイオマーカーに関して用語「レベル」とは、試料中に存在する目的のバイオマーカーの含量または量のことである。そのような含量または量は、絶対語、すなわち、試料中のバイオマーカーの全量で、または相対語、すなわち、試料中のバイオマーカーの濃度もしくはパーセンテージで表してもよい。バイオマーカーのレベルは、DNAレベルで（例えば、染色体領域中の遺伝子の含量もしくは量またはコピー数により表される）、RNAレベルで（例えば、mRNA含量もしくは量として）、またはタンパク質レベルで（例えば、タンパク質もしくはタンパク質複合体の含量もしくは量として）測定可能である。

【00097】

【00199】本明細書で使用される場合、バイオマーカーに関して用語「参照レベル」とは、比較を可能にするベンチマークレベルのことである。参照レベルは、所望の目的に従って当業者が選択してよい。適切な参照レベルを決定するための手段は、当業者には公知であり、例えば、参照レベルは経験、既存の知識または臨床研究から収集されたデータから決定可能である。

【00098】

【00200】本明細書で使用される場合、バイオマーカーに関して用語「陰性」とは、バイオマーカーが検査で陰性であるまたは検査試料中に存在しないことを意味する。例えば、検査試料中で陰性であるバイオマーカーは、そのようなバイオマーカーを欠く試料中の負の対照レベルに匹敵するもしくはそれとは区別できないレベルを有することがある、または代わりに存在もしくは陽性結果を定義する閾値レベルよりも低いレベルを有することがある。

【00099】

【00201】本明細書で使用される場合、処置に対する対象の応答に関して「可能性」および「可能性がある」は、治療応答が対象において起こる可能性がどれくらいかの測定値である。この用語は「確率」と互換的に使用しうる。可能性とは、推測より上であるが、確実よりは下である確率のことである。したがって、治療応答は、常識、訓練または経験を使用する道理をわきまえた人が、状況を考えると、治療応答は確実であると結論付けるのであれば、可能性がある。

【0100】

【00202】療法（例えば、GREM1アンタゴニストを用いた処置）という文脈で使用

10

20

30

40

50

される用語「から利益を得る」または「応答性がある」とは、好ましからぬ応答、すなわち、有害事象とは対照的に、治療に対する有益なまたは好ましい応答のことである。

【0101】

【00203】本明細書で使用される用語「抗体」は、特定の抗原に結合する任意の免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多価抗体、二価抗体、一価抗体、多特異性抗体、または二特異性抗体を含む。天然の無傷の抗体は2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む。哺乳動物重鎖はアルファ、デルタ、エプシロン、ガンマ、およびミューに分類され、それぞれの重鎖は可変領域(V_H)ならびに第1、第2、および第3の定常領域(それぞれ C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})からなり、哺乳動物軽鎖は λ または κ に分類され、それぞれの軽鎖は可変領域(V_L)および定常領域からなる。抗体は「Y」形状を有し、Yのステムはジスルフィド結合により互いに結合された2本の重鎖の第2および第3の定常領域からなる。Yのそれぞれのアームは、単一の軽鎖の可変および定常領域に結合した単一の重鎖の可変領域および第1の定常領域を含む。軽および重鎖の可変領域は抗原結合を担当している。両鎖の可変領域は一般に、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つの高度に可変なループ(軽鎖CDRは LC_{DR1} 、 LC_{DR2} 、および LC_{DR3} を含み、重鎖CDRは HC_{DR1} 、 HC_{DR2} 、 HC_{DR3} を含む)を含有する。本明細書で開示された抗体および抗原結合ドメインのCDR境界は、Kabata、IMGT、AbM、Chothia、またはAl-Lazikaniの慣例により定義されるまたは同定されてよい(Al-Lazikani、B.、Chothia、C.、Lesk、A. M.、J. Mol. Biol.、273(4)、927頁(1997)；Chothia、C.ら、J. Mol. Biol. Dec 5；186(3)：651～63頁(1985)；Chothia、C.およびLesk、A. M.、J. Mol. Biol.、196、901頁(1987)；N. R. Whiteleggら、Protein Engineering、v13(12)、819～824頁(2000)；Chothia、C.ら、Nature. Dec 21-28；342(6252)：877～83頁(1989)；Kabata E. A.ら、National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991)；Marie-Paule Lefrancら、Developmental and Comparative Immunology、27：55～77頁(2003)；Marie-Paule Lefrancら、Immunome Research、1(3)、(2005)；Marie-Paule Lefranc、Molecular Biology of Cells(second edition)、26章、481～514頁(2015))。3つのCDRは、フレームワーク領域(FR)として知られる隣接ストレッチの間に置かれており、この領域はCDRよりも高度に保存されており、超可変ループを支えるスキャホールドを形成する。重および軽鎖の定常領域は抗原結合に関与しておらず、様々なエフェクター機能を示す。抗体は、その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づいてクラスに割り当てられる。抗体の5つの主要クラスまたはアイソタイプはIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMであり、これはそれぞれアルファ、デルタ、エプシロン、ガンマ、およびミュー重鎖の存在を特徴とする。主要抗体クラスのいくつかは、IgG1(ガンマ1重鎖)、IgG2(ガンマ2重鎖)、IgG3(ガンマ3重鎖)、IgG4(ガンマ4重鎖)、IgA1(アルファ1重鎖)、またはIgA2(アルファ2重鎖)などのサブクラスに分割される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、その任意の抗原結合断片を包含する。

【0102】

【00204】本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」とは、1つもしくは複数のCDRを含む抗体の断片から形成される抗体断片、または抗原に結合するが無傷の天然抗体構造を含まない他の任意の抗体部分のことである。抗原結合断片の例は、限定せずに、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、一本鎖抗体分子(scFv

）、 $s c F v$ ダイマー（二価ダイアボディ）、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、および二価ドメイン抗体を含む。抗原結合断片は、親抗体が結合しているのと同じ抗原に結合することができる。ある特定の実施形態では、抗原結合断片は、特定の親抗体由来の1つまたは複数のCDRを含みうる。

【0103】

【00205】抗体に関する「Fab」とは、ジスルフィド結合により単一重鎖の可変領域および第1の定常領域に結合している単一軽鎖（可変と定常領域の両方）からなる抗体の一価抗原結合断片のことである。Fabは、ヒンジ領域の重鎖間のジスルフィド結合のN末端の近位にある残基での抗体のパパイン消化により得ることができる。

【0104】

【00206】「Fab'」とは、ヒンジ領域の一部を含むFab断片のことであり、Fab'はヒンジ領域の重鎖間のジスルフィド結合のC末端の近位にある残基での抗体のペプシン消化により得ることができ、したがって、ヒンジ領域の少数の残基（1つまたは複数のシステインを含む）がFabとは異なっている。

【0105】

【00207】「F(ab')₂」とは、2本の軽鎖および2本の重鎖の一部を含むFab'のダイマーのことである。

【0106】

【00208】抗体に関して「Fv」とは、完全な抗原結合部位を有する抗体の最小断片のことである。Fv断片は、単一重鎖の可変領域に結合している単一軽鎖の可変領域からなる。「dsFv」とは、単一軽鎖の可変領域と単一重鎖の可変領域の間の結合がジスルフィド結合であるジスルフィド安定化Fv断片のことである。

【0107】

【00209】「一本鎖Fv抗体」または「scFv」とは、互いに直接またはペプチドリinker配列を介して接続された軽鎖可変領域と重鎖可変領域からなる操作された抗体のことである（Huston JSら、Proc Natl Acad Sci USA、85：5879頁（1988））。「scFvダイマー」とは、リンカー付きの2つの重鎖可変領域および2つの軽鎖可変領域を含む一本鎖のことである。ある特定の実施形態では、「scFvダイマー」は、1つの部分のV_Hがその他の部分のV_Lと協同して働いて、同じ抗原（もしくはエピトープ）または異なる抗原（もしくはエピトープ）を標的にできる2つの結合部位を形成するように、もう1つのV_H-V_L部分と一緒に二量体化されたV_H-V_L（ペプチドリinkerにより連結されている）を含む二価ダイアボディまたは二価ScFv（BsFv）である。他の実施形態では、「scFvダイマー」は、V_{H1}とV_{L1}が協同で働き、V_{H2}とV_{L2}が協同で働いて、それぞれの協同で働く対が異なる抗原特異性を有するように、V_{L1}-V_{H2}（ペプチドリinkerにより連結されている）と会合したV_{H1}-V_{L2}（これもペプチドリinkerにより連結されている）を含む二特異性ダイアボディである。

【0108】

【00210】「一本鎖Fv-Fc抗体」または「scFv-Fc」とは、抗体のFc領域に接続したscFvからなる操作された抗体のことである。

【0109】

【00211】「ラクダ化単ドメイン抗体」、「重鎖抗体」、「ナノボディ」または「HCAb」とは、2つのV_Hドメインを含有し軽鎖を含有しない抗体のことである（Richmann L. およびMuyldermans S.、J Immunol Methods、Dec 10；231（1-2）：25～38頁（1999）；Muyldermans S.、J Biotechnol Jun；74（4）：277～302頁（2001）；WO94/04678；WO94/25591；米国特許第6,005,079号）。重鎖抗体は最初ラクダ科（Camelidae）（ラクダ、ヒトコブラクダ、およびラマ）から得られた。軽鎖を欠くが、ラクダ化抗体は確実な抗原結合レパートリーを有する（Hamers-Casterman C.ら、Nature Jun 3；

10

20

30

40

50

363 (6428) : 446~8頁 (1993) ; Nguyen VK. ら、*「Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation」*、*Immunogenetics*. Apr ; 54 (1) : 39~47頁 (2002) ; Nguyen VK. ら、*Immunology*. May ; 109 (1) : 93~101頁 (2003))。重鎖抗体の可変ドメイン (V_HHドメイン) は、適応免疫応答により生み出された最小の既知の抗原結合ユニットを表す (Koch-Nolte F. ら、*FASEB J*. Nov ; 21 (13) : 3490~8頁. Epub 2007 Jun 15 (2007))。「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を含み、断片は単一ポリペプチド鎖においてV_Lドメインに接続されたV_Hドメインを含む (V_H-V_LまたはV_L-V_H) (例えば、Holliger P. ら、*Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 15 ; 90 (14) : 6444~8頁 (1993) ; EP 404097 ; WO 93 / 11161 参照)。同じ鎖上の2つのドメインは、リンカーが短すぎるので、対合させることはできず、したがって、2つのドメインはもう1つの鎖の相補的ドメインと対合せざるを得ず、それによって2つの抗原結合部位を作り出す。抗原結合部位は、同じまたは異なる抗原 (またはエピトープ) を標的にしてもよい。

10

【0110】

【00212】「ドメイン抗体」とは、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する抗体断片のことである。ある特定の実施形態では、2つまたはそれよりも多いV_Hドメインはペプチドリンカーと共有結合されて、二価または多価ドメイン抗体を形成する。二価ドメイン抗体の2つのV_Hドメインは、同じまたは異なる抗原を標的にしてもよい。

20

【0111】

【00213】ある特定の実施形態では、「(dsFv)₂」は、3つのペプチド鎖：ペプチドリンカーにより連結されジスルフィド架橋により2つのV_L部分に結合された2つのV_H部分を含む。

【0112】

【00214】ある特定の実施形態では、「二特異性dsダイアボディ」は、V_{H1}とV_{L1}の間のジスルフィド架橋を介してV_{L1}-V_{H2} (ペプチドリンカーにより連結されている) に結合しているV_{H1}-V_{L2} (これもペプチドリンカーにより連結されている) を含む。

30

【0113】

【00215】ある特定の実施形態では、「二特異性dsFv」または「dsFv-dsFv」は3つのペプチド鎖：重鎖がペプチドリンカー (例えば、長く柔軟なリンカー) により結合されておりジスルフィド架橋を介してそれぞれV_{L1}およびV_{L2}部分に対合されているV_{H1}-V_{H2}部分を含む。それぞれのジスルフィド対合重鎖と軽鎖は異なる抗原特異性を有する。

【0114】

【00216】本明細書で使用される用語「ヒト化」とは、抗体または抗原結合断片が、非ヒト動物由来のCDR、ヒト由来のFR領域、および適用できる場合はヒト由来の定常領域を含むことを意味する。ある特定の実施形態では、ヒト化グレムリン抗体の可変領域フレームワークのアミノ酸残基は、配列最適化のために置換される。ある特定の実施形態では、ヒト化グレムリン抗体鎖の可変領域フレームワーク配列は、対応するヒト可変領域フレームワーク配列に少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%同一である。

40

【0115】

【00217】本明細書で使用される用語「キメラ」とは、1つの種由来の重および／または軽鎖の一部、ならびに異なる種由来の重および／または軽鎖の残りを有する抗体または抗原結合断片のことである。実例では、キメラ抗体は、ヒト由来の定常領域およびマウス由来などの非ヒト種由来の可変領域を含んでよい。

【0116】

50

【00218】用語「生殖系列配列」とは、生殖系列免疫グロブリン可変領域配列によりコードされるすべての他の公知の可変領域アミノ酸配列と比べて、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最高の所定のアミノ酸配列同一性を共有する可変領域アミノ酸配列またはサブ配列をコードする核酸配列のことである。生殖系列配列は、すべての他の評価された可変領域アミノ酸配列と比べて、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最高のアミノ酸配列同一性を有する可変領域アミノ酸配列またはサブ配列も指すことができる。生殖系列配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワークと相補性決定領域、可変セグメント（上で定義されている）、または可変領域を含む配列もしくはサブ配列の他の組合せでありうる。配列同一性は、本明細書に記載される方法を使用して、例えば、BLAST、ALIGN、または当技術分野で公知の別の整列アルゴリズムを使用して2つの配列を整列させて、決定することができる。生殖系列核酸またはアミノ酸配列は、参照可変領域核酸またはアミノ酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有することができる。生殖系列配列は、例えば、公開されている国際Immunogeneticsデータベース（IMGT）およびV-ベースを通して決定することが可能である。

10

【0117】

【00219】「抗ヒトグレムリン1抗体」、「抗hGREM1抗体」または「ヒトグレムリン1に対する抗体」は、本明細書では互換的に使用され、例えば、治療的使用を提供するために、十分な特異性および／または親和性でヒトグレムリン1に特異的に結合することができる抗体のことである。

20

【0118】

【00220】本明細書で使用される用語「親和性」とは、免疫グロブリン分子（すなわち、抗体）またはその断片と抗原の間の非共有結合相互作用の強さのことである。

【0119】

【00221】本明細書で使用される用語「特異的結合」または「特異的に結合する」とは、例えば、抗体と抗原の間などの、2分子間の非ランダム結合反応のことである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体または抗原結合断片は、 $\leq 10^{-6} \text{ M}$ （例えば、 $\leq 5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $\leq 10^{-7} \text{ M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、または $\leq 10^{-9} \text{ M}$ ）の結合親和性（ K_D ）でヒトおよび／または非ヒトグレムリン1に特異的に結合する。本明細書で使用される K_D とは、解離速度対会合速度の比（ k_{off}/k_{on} ）のことであり、この比は、表面プラズモン共鳴法、マイクロスケール熱泳動法、HPLC-MS法およびフローサイトメトリー（例えばFACS）法を含むがこれらに限定されない当技術分野で公知の任意の従来法を使用することにより決定してよい。ある特定の実施形態では、 K_D 値は、フローサイトメトリー法を使用することにより適切に決定することができる。種々の免疫アッセイフォーマットを使用して、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性のある抗体を選択してもよい。例えば、固相ELISA免疫アッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応性のある抗体を選択するのに日常的に使用される（特異的免疫反応性を決定するのに使用することができる免疫アッセイフォーマットおよび条件の説明については、例えば、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998) 参照）。典型的には、特異的または選択的結合反応は、バックグラウンドシグナルの少なくとも2倍、さらに典型的にはバックグラウンドの少なくとも10～100倍のシグナルを発する。

30

40

【0120】

【00222】本明細書で使用される用語「アミノ酸」とは、アミン（ $-\text{NH}_2$ ）およびカルボキシル（ $-\text{COOH}$ ）官能基を、それぞれのアミノ酸に特有の側鎖と伴に含有する有機化合物のことである。アミノ酸の名称は本開示では標準1文字または3文字コードとしても表され、以下の通りにまとめられる。

【0121】

50

【表 1】

名称	3 文字コード	1 文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【0122】

【00223】アミノ酸配列に関して「保存的置換」とは、アミノ酸残基を類似する生理化学的特性を備えた側鎖を有する異なるアミノ酸残基と取り替えることである。例えば、保存的置換は、疎水性側鎖（例えば、Met、Ala、Val、Leu、およびIle）を備えたアミノ酸残基の間で、中性親水性側鎖（例えば、Cys、Ser、Thr、Asn およびGln）を備えた残基の間で、酸性側鎖（例えば、Asp、Glu）を備えた残基の間で、塩基性側鎖（例えば、His、Lys、およびArg）を備えたアミノ酸の間で、または芳香族側鎖（例えば、Trp、Tyr、およびPhe）を備えた残基の間で行うことができる。当技術分野では公知のように、保存的置換は通常、タンパク質立体配座構造に著しい変化を引き起こさず、したがって、タンパク質の生物学的活性を保持することができると考えられる。

【0123】

【00224】アミノ酸配列（または核酸配列）に関して「パーセント（％）配列同一性」は、配列を整列させ、必要ならば、最大一致を達成するためにギャップを導入した後、参照配列中のアミノ酸（または核酸）残基と同一である候補配列中のアミノ酸（または核酸）残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸（または核酸）配列同一性を決定する目的での整列化は、例えば、BLASTN、BLASTp（U. S. National Center for Biotechnology Information（NCBI）のウェブサイト上で利用可能、Altschul S. F. ら、J. Mol. Biol.、215：403～410頁（1990）；Stephen F. ら、Nucleic Acids Res.、25：3389～3402頁（1997）も参照）、ClustalW2（European Bioinformatics Instituteのウェブサイト上で利用可能、Higgins D. G. ら、Method

s in Enzymology、266:383~402頁(1996); Larkin M. A.ら、Bioinformatics (Oxford, England)、23(21):2947~8頁(2007)も参照)、およびALIGNまたはMegalign(DNA STAR)ソフトウェアなどの公開されているツールを使用して達成することができる。当業者であれば、ツールにより提供されるデフォルトパラメータを使用してもよく、または、例えば、適切なアルゴリズムを選択することによりなどの、パラメータを整列化に適するようにカスタマイズしてもよい。ある特定の実施形態では、非同一残基位置が保存的アミノ酸置換によって違っていてもよい。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似する化学的特性(例えば、電荷または疎水性)を備えた側鎖(R基)を有する別のアミノ酸残基により置き換えられる置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。2つまたはそれよりも多いアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なっている場合には、類似性のパーセントまたは程度は、置換の保存的性質を補正するように上向きに調整してよい。この調整を行うための手段は当業者には周知である。例えば、Pearson(1994) Methods Mol. Biol. 24:307~331頁を参照のこと。前記文献は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0124】

【00225】本明細書で使用される場合、「相同配列」とは、随意に整列させた場合、別の配列に少なくとも80%(例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列(またはその相補鎖)またはアミノ酸配列のことである。

20

【0125】

【00226】「単離された」物質はヒトの手により天然の状態から変更されてきた。「単離された」組成物または物質は、天然に存在したら、その最初の環境から変えられるもしくは取り除かれる、またはその両方を受けてきた。例えば、生きた動物に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離され」ないが、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、実質的に純粋な状態で存在するようにその天然の状態の共存物質から十分に分離された場合、「単離される」。単離された「核酸」または「ポリヌクレオチド」は互換的に使用され、単離された核酸分子の配列のことである。ある特定の実施形態では、「単離された抗体またはその抗原結合断片」とは、ゲル電気泳動法(例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動)、またはクロマトグラフ法(例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたは逆相HPLC)により決定された場合、少なくとも60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の純度を有する抗体または抗原結合断片のことである。

30

【0126】

【00227】用語「対象」は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、すべての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ラット、ネコ、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、および爬虫類を含む。言及される場合を除いて、用語「患者」または「対象」は本明細書では互換的に使用される。

40

【0127】

【00228】本明細書で使用される状態を「処置する(treating)」またはその「処置(treatment)」は、状態を予防するもしくは軽減するステップ、状態の発生もしくは発症速度を遅くするステップ、状態の発症のリスクを低減するステップ、状態に関連する症状の発症を予防するもしくは遅延するステップ、状態に関連する症状を低減するもしくは終わらせるステップ、状態の完全なもしくは部分的な後退を生み出すステップ、状態を治癒するステップ、またはそれらの組合せを含む。

【0128】

【00229】用語「グレムリン1」または「GREM1」とは、グレムリンの変異体1のことであり、異なる種の、例えば、ヒト、マウス、サル、などのグレムリン1を包含する

50

。GREM1は進化的に保存されており、ヒトグレムリン1遺伝子(hGREM1)は染色体15q13-q15にマッピングされている(Topol L Zら、(1997) Mol. Cell Biol.、17:4801~4810頁; Topol L Zら、Cytogenet Cell Genet.、89:79~84頁)。hGREM1のアミノ酸配列は、受入番号NP-037504下でGenBankデータベースまたは受入番号O60565を経てUniprotデータベースにより入手可能であり、本明細書では配列番号66として提供されている。用語「ヒトグレムリン1」と用語「hGREM1」は本開示では互換的に使用される。

【0129】

【00230】本明細書で使用される「グレムリン1関連」または「GREM1関連」疾患または状態とは、GREM1の増加した発現または活性により引き起こされる、これにより悪化する、またはこれと他の点に関連した任意の疾患または状態のことである。一部の実施形態では、GREM1関連状態は、例えば、緑内障、がん、線維疾患、血管新生、網膜疾患、腎臓病、肺動脈性肺高血圧症、または変形性関節症(OA)である。

【0130】

【00231】本明細書で使用される「がん」とは、悪性細胞成長または新生物、異常な増殖、浸潤または転移を特徴とする任意の医学的状态のことであり、良性または悪性が可能であり、固形腫瘍と白血病などの非固形腫瘍(例えば、血液系腫瘍)の両方を含む。本明細書で使用される場合、「固形腫瘍」とは、新生物および／または悪性細胞の固体塊のことである。

【0131】

【00232】用語「薬学的に許容される」は、指定された担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤(複数可)、および／または塩が一般的に、製剤を含むその他の成分と化学的におよび／または物理的に適合する、およびそのレシピエントと生理的に適合することを示す。

【0132】

【00233】用語「治療有効量」または「有効量」とは、いかなる処置にも適用可能な合理的な利益／リスク比で、ある所望の局所的または全身的治療効果を生み出す医薬品の量のことである。疾患を予防するために投与される場合、量は疾患の発生を回避するまたは遅らせるのに十分である。治療有効量または有効量は、治療的であるまたは疾患もしくは状態がいずれ発生するのを予防する必要はない。ある特定の実施形態では、医薬品の治療有効量は、その治療指数、可溶性、および同類のものに依存する。

【0133】

【00234】本明細書の「約(about)」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータそれ自体を対象とする実施形態を含む(および記載する)。例えば、「約X」に言及する記載は、「X」の記載を含む。数値範囲はその範囲を定義する数を含む。一般的に言えば、用語「約」とは、変数の指示値およびたとえどちらの方が大きくても、指示値の実験誤差内(例えば、平均についての95%信頼区間内)または指示値の10%内である変数のすべての値のことである。用語「約」が期間(年、月、週、日、など)という文脈内で使用される場合、用語「約」は、たとえどちらの方が大きくても、その期間プラスもしくはマイナス次の下位期間の1つの量(例えば、約1年は11~13ヶ月を意味し; 約6ヶ月は6ヶ月プラスまたはマイナス1週間を意味し、約1週間は6~8日を意味する、など)、または指示値の10%以内を意味する。

【0134】

【00235】本開示は、グレムリン1(GREM1)アンタゴニストの新規の医学的使用を提供する。新規の医学的使用は、一部に、GREM1の転写はアンドロゲン受容体(AR)により抑制され、アンドロゲン除去療法(ADT)により制御を解かれるという思いがけない発見に基づいている。新規の医学的使用は、一部に、PTENおよび／またはp53の欠損がGREM1発現を促進するという発見に基づいている。さらに、本開示は、驚くべきことに、GREM1が去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)を含む進行前立腺がんにおいて有意に上方調節されており、去勢抵抗性の発現および不十分な全生存と正に相関

していることを発見した。GREM1アンタゴニストが、関連状態を処置するのに有用であることが発明者らにより明らかにされた。

【0135】

【00236】減少したアンドロゲン受容体シグナル伝達を有するGREM1発現状態を処置する方法

【00237】一態様では、本開示は、GREM1発現疾患または状態の処置を必要とする対象においてこの処置をする方法であって、治療有効量のGREM1アンタゴニストを対象に投与するステップを含み、疾患または状態が減少したまたは阻害されたアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達を特徴とする方法を提供する。

【0136】

【00238】ある特定の実施形態では、対象はARインヒビターを受けているまたは受けたことがある。ある特定の実施形態では、疾患または状態はARインヒビターに抵抗性である。本明細書で使用されるARインヒビターとは、AR活性を抑制するのに有用な治療薬、例えば、アンドロゲン除去療法において使用される治療薬のことである。

【0137】

【00239】ある特定の実施形態では、疾患または状態は、AR関連がん（例えば、前立腺がん、乳がん、神経膠芽腫、黒色腫、膀胱がん、腎細胞癌、膵臓がん、肝細胞癌、卵巣がん、子宮内膜がん、マントル細胞リンパ腫、または唾液腺がん）、またはAR関連非がん状態（例えば、脱毛、ざ瘡、多毛症、卵巣嚢胞、多嚢胞性卵巣病、思春期早発症、球脊髄性筋萎縮症、または加齢黄斑変性）である。

【0138】

【00240】一態様では、本開示は、GREM1発現がんの処置を必要とする対象においてこの処置をする方法であって、治療有効量のGREM1アンタゴニストを対象に投与するステップを含み、がんが減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達を特徴とする方法を提供する。

【0139】

【00241】減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達

【00242】アンドロゲン受容体（AR）は、ステロイドと核内受容体スーパーファミリーのメンバーであり、主に、前立腺、骨格筋、肝臓、および中枢神経系（CNS）などのアンドロゲン標的組織で発現され、最高の発現レベルは前立腺、副腎、および精巣上体で観察される。

【0140】

【00243】ARは、細胞内転写因子として機能する可溶性タンパク質である。アンドロゲンに結合しこれにより活性化されると、ARは、前立腺上皮細胞の成長および分化を調節する標的遺伝子の転写を媒介する。ARシグナル伝達は、前立腺を含む雄生殖器官の発生および維持にとり極めて重要である。

【0141】

【00244】本明細書で使用される場合、用語「減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達」とは、そのレベルがARシグナル伝達の正常なまたはベースラインレベル、例えば、健康な細胞もしくは組織試料でのARシグナル伝達のレベル、または全がん患者集団でのもしくは目的の特定のがんのがん患者集団でのもしくはAR依存性前立腺がんを有する患者集団でのARシグナル伝達の平均レベルよりも実質的に低いARシグナル伝達のことである。

【0142】

【00245】減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達を有するがんは、AR発現がんであることが可能であり、ARシグナル伝達は、例えば、処置（例えば、薬理的処置または外科的処置）のせいで、またはARの減少した発現レベルのせいで、またはARでのある特定の不活性化変異のせいで、阻害される。代わりに、減少したARシグナル伝達を有するがんは、特に、通常ではARを発現するがん（例えば、前立腺がん）では、AR発現が陰性のあることがある。

【0143】

【00246】一部の実施形態では、がんはAR発現がんである。異なるタイプのがんがARを発現することが知られている。AR発現がんの例は、限定せずに、前立腺がん、乳がん、肺がん、頭頸部がん、精巣がん、子宮内膜がん、卵巣がん、および皮膚がんを含む。ある特定の実施形態では、AR発現がんは、前立腺がんまたは乳がんである。

【0144】

【00247】一部の実施形態では、対象はアンドロゲン除去療法（ADT）を受けているまたは受けたことがある。本明細書で使用される用語「アンドロゲン除去療法」または「ADT」とは、アンドロゲンのレベルを減少させることによりまたはARシグナル伝達を阻害することによりなどのアンドロゲンの生物学的機能を阻害することにより、アンドロ

10

【0145】

【00248】ADTは、外科的処置（例えば、外科的去勢）または薬物処置を通じて達成できる。ADT薬の例は、限定せずに、LHRHアゴニスト（例えば、リュープロリド（リュープロン、エリガード）、ゴセレリン（ゾラデックス）、トリプトレリン（トレルスター）、およびヒストレリン（バンタス））、LHRHアンタゴニスト（例えば、デガレリクス（フィルムゴン）、レルゴリクス（オルゴビクス））、副腎からアンドロゲンレベルを低下させる薬物（例えば、アピラテロン（ザイティガ）、ケトコナゾール（ニゾラル））、アンドロゲン受容体アンタゴニスト（例えば、フルタミド（Eulexin）、ピカルタミド（カソデックス）、ニルタミド（ニランドロン））、および他の抗アンドロゲン（例えば、エンザルタミド（イクスタンジ）、アパルタミド（アーリーダ）およびダ

20

【0146】

【00249】一部の実施形態では、対象またはがんはADTに対して抵抗性である。「抵抗性」とは、疾患にADTに対する応答性または感受性がないまたは減少していることを意味する。減少した応答性は、例えば、所与の有効性を達成するためには用量を増やす必要性があることにより示すことができる。ある特定の実施形態では、疾患はADTに対して非応答性があることがある。例えば、ADTを用いた処置にもかかわらず、がん細胞または腫瘍サイズが増加する、または疾患がその以前の状態への後退、例えば、部分的回復に続いて以前の症状への回帰を示した。ADTに対する抵抗性は、初めからまたは後天的がある。

30

【0147】

【00250】一部の実施形態では、対象またはがんは、ARの減少した発現レベルを有する、またはARに1つもしくは複数の不活性化変異を有する。800を超える異なるAR変異が、アンドロゲン不感性症候群、および前立腺がんを有する患者で同定されている。AR遺伝子中に、a) アミノ酸置換または未成熟終止コドンを生じる単一点変異；b) フレームシフトおよび早期反芻症をもたらすヌクレオチド挿入または欠失；c) 完全または部分的遺伝子欠失；およびd) 選択的スプライシングを引き起こすイントロン変異を含む、ARを不活性化する4つの異なるタイプの変異が検出されている（詳しくは、K. E i s s e r m a n n ら、T r a n s l A n d r o l、U r o l. 2013年Sep；2（3）：137～147頁参照のこと）。

40

【0148】

【00251】一部の実施形態では、がんは、アンドロゲン受容体（AR）発現が陰性、すなわち、AR陰性がんである。本明細書で使用されるAR陰性がんとは、最初はAR発現を有するがAR陰性になるがんを意味する。ある特定の実施形態では、AR陰性がんは前立腺がんまたは乳がんである。一部の前立腺がん細胞株は、PC3細胞株などのAR陰性であることが分かっている。AR陰性がんは、AR発現またはARシグナル伝達で検査が陰性の（または検出できない）ことがある、または既知のAR陰性前立腺がん細胞の検出レベルに匹敵するAR発現の検出レベルを有することがある。

50

【0149】

【00252】一部の実施形態では、前立腺がんまたは乳がんは、アンドロゲン受容体（AR）発現と神経内分泌（NE）分化の両方で陰性である。前立腺がんでのNE分化はよく認識された表現型変化であり、これにより前立腺がん細胞はNE様細胞に分化転換する。NE様細胞はアンドロゲン受容体の発現および前立腺特異抗原を欠き、処置に抵抗性である。NE分化は、NEマーカークロモグラニンA（CgA）のタンパク質レベルもしくははmRNAレベル、CgA／前立腺特異抗原（PSA）の比、および／またはニューロン特異的エノラーゼ（NSE）を測定することにより評価できる。例えば、Huら、Front Oncol. 2015年；5：90頁；Berrutiら、Endocr Relat Cancer (2005) 12 (1)：109～17頁. 10.1677/erc.1.00876；Khanら、J Pak Med Assoc (2011) 61 (1)：108～11頁；Taplinら、Urology (2005) 66 (2)：386～91頁. 10.1016/j.urology；Sarkarら、Cancer Biomark (2010) 8 (2)：81～7頁. 10.3233/CBM-2011-0198；Burgioら、Endocr Relat Cancer (2014) 21 (3)：487～93頁. 10.1530/ERC-14-0071；Conteducaら、Prostate (2014) 74 (16)：1691～6頁. 10.1002/pros.22890；Berrutiら、Cancer (2000) 88 (11)：2590～7頁. 10.1002/1097-0142(20000601)88:11；Sasakiら、Eur Urol (2005) 48 (2)：224～9頁. 10.1016/j.eururo.2005.03.017参照。前記文献の開示は参照によりその全体をここに組み込まれる。

10

20

【0150】

【00253】一部の実施形態では、前立腺がんは、参照レベルよりも低いレベルの前立腺特異抗原（PSA）を有することをさらに特徴とする。

【0151】

【00254】PSAは、ARの古典的下流標的である。通常、PSAは血液中にはほとんど分泌されない。良性前立腺肥大、前立腺炎、または前立腺がんにより引き起こされる腺サイズの増加および組織損傷は、循環するPSAレベルを増加する場合がある。分化が不十分であるまたは未分化である進行期の前立腺がん細胞は、産生するPSAはより少なく、低いレベルのPSAを伴う（例えば、4 ng/ml未満）。低レベルのPSAを有するまたはPSAが陰性である前立腺がん細胞が、抗アンドロゲン、化学療法剤、酸化促進剤、または放射線に抵抗性であることが可能だと考えられ、去勢抵抗性の場合があるとも考えられる（Skvortsov S.ら、STEM CELLS、36巻、10号、1457～1474頁）。

30

【0152】

【00255】PSAの参照レベルは、PSA陽性前立腺がんに通常見出されるPSAの閾値レベルであってもよい。PSAの参照レベルは、全前立腺がん患者集団でのまたは進行期に進む前の前立腺がんを有する患者集団でのPSAの平均レベルも可能である。血液中のPSAのある特定の参照レベルは、例えば、免疫検出できるアッセイ、例えば、Hybritech (San Diego, Calif)、Tosoh (Foster City, Calif)、Bayer Centaur PSAアッセイキット (Tarrytown, NY)、またはAbbottアッセイ (Chicago, Ill) を使用して測定された場合、例えば、約2 ng/ml、約4 ng/ml、約6 ng/ml、約8 ng/mlまたは約10 ng/mlが可能である。例えば、Danら、Cancer、109巻、2号、2007年。https://doi.org/10.1002/cnrcr.22372；およびOesterlingら、J Urol. 1995年；154：1090～1095頁を参照のこと。前記文献の開示は参照によりその全体をここに組み込まれる。

40

【0153】

50

[00256]ある特定の実施形態では、前立腺がんはPSAについて陰性である。例えば、前立腺がんはPSAを発現しない、またはPSAについての試験で検査が陰性とでる。

【0154】

[00257]一部の実施形態では、前立腺がんは去勢抵抗性である。去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)は、低レベルの循環アンドロゲンにもかかわらず成長することができる進行前立腺がんである。CRPCは、ADT後、血清テストステロン値が50ng/dLより下であるにもかかわらず、PSAレベルの連続上昇、先行疾患の進行、および／または新たな転移の出現として現れることがある(Toshiyuki Kamotoら、Nihon Rinsho. 2014年 Dec; 72(12): 2103~7頁; Fred Saadら、Can Urol Assoc J. 2010年 Dec; 4(6): 380~384頁)。

10

【0155】

[00258]一部のCRPCは、アンドロゲンの枯渇または減少にもかかわらずARシグナル伝達に依存したままであることがある。例えば、CRPCは、疾患進行をAR経路に依存したままでいるように、AR発現を増幅させる、AR遺伝子および／もしくは活性化補助因子／補助抑制因子をコードする遺伝子を変異させる、アンドロゲン非依存性AR経路を活性化する、ならびに／または代替アンドロゲンを産生することにより発症させることができる(Thenappanら、Transl Androl Urol. 2015年 Jun; 4(3): 365~380頁)。一部のCRPCは、ARシグナル伝達の必要性を迂回することができる。

20

【0156】

[00259]一部の実施形態では、前立腺がんは、a) アンドロゲン受容体(AR)発現に陰性である、b) アンドロゲン受容体(AR)発現と神経内分泌(NE)分化の両方で陰性である; c) アンドロゲン除去療法に抵抗性である、任意選択で、去勢抵抗性である、d) 参照レベルよりも低いレベルの前立腺特異抗原(PSA)を示す、またはe) a)~d)の任意の組合せである。

【0157】

[00260]一部の実施形態では、がんは、PTENおよび／またはp53欠損しているとさらに決定される。

【0158】

30

[00261]ある特定の実施形態では、がんは転移性である。転移性がんは、原発部位から身体の別の部分に広がることできるまたは広がっている。転移性腫瘍は、原発腫瘍と同じタイプのがんである。転移性がんは、原発部位近くの領域まで、または身体の遠隔部分まで広がることできる。

【0159】

[00262]GREM1過剰発現

[00263]いかなる理論にも縛られたくはないが、ARシグナル伝達はGREM1発現と負に相関していると考えられており、ARシグナル伝達の減少は、GREM1の発現の増加をもたらすと考えられている。

【0160】

40

[00264]一部の実施形態では、減少したARシグナル伝達を有するがんは、さらにGREM1発現または過剰発現を特徴とする。GREM1発現または過剰発現は、疾患細胞においてまたは疾患微小環境において存在することが可能である。

【0161】

[00265]本明細書で使用されるGREM1に関して用語「過剰発現」とは、参照レベルと比べて増加した発現レベルのことである。参照レベルは、同じ組織型の正常な細胞で見られる、任意選択で、別の遺伝子(例えば、ハウスキーピング遺伝子)の発現レベルに対して正規化されているGREM1発現のレベルであってもよい。代わりに、参照レベルは、健康な対象に見られるGREM1発現のレベルであってもよい。発現レベルは、核酸レベルまたはタンパク質レベルに基づいて決定することができる。一部の実施形態では、

50

G R E M 1 発現がんは、参照レベルより少なくとも 10 % 高い（例えば、少なくとも 15 %、20 %、30 %、35 %、40 %、50 % または 1 倍、2 倍、3 倍もしくはもっと高い）G R E M 1 発現レベルを有する。

【0162】

[00266] アンドロゲン除去療法に対する A R 発現がんの感受性を増加する方法

[00267] 別の態様では、本開示は、対象でのアンドロゲン除去療法（A D T）に対する A R 発現がんの感受性を増加する方法であって、対象に治療有効量の G R E M 1 アンタゴニストを投与するステップを含む方法をさらに提供する。

【0163】

[00268] いかなる理論にも縛られたくはないが、A D T により A R シグナル伝達が減少すれば、G R E M 1 発現または増加した発現をもたらすことができると考えられ、G R E M 1 アンタゴニストを使用すれば、A D T に対する A R 発現がんの感受性をさらに改善できる。

【0164】

[00269] がんに関して用語「感受性」とは、処置（例えば、G R E M 1 アンタゴニストを用いた処置）にがんが応答する能力のことである。がんの感受性は、例えば、がん細胞増殖の阻害またはがん細胞死の促進の点から測定できる。増加した感受性は、同じ用量下での有効性の増加、または類似する有効性に対する用量の減少に基づいて決定できる。

【0165】

[00270] 一部の実施形態では、方法は、A D T と組み合わせて G R E M 1 アンタゴニストを対象に投与するステップを含む。

【0166】

[00271] P T E N および／または p 5 3 の欠損を特徴とする G R E M 1 関連疾患または状態を処置する方法

[00272] 種々の実施形態では、本開示は、対象での P T E N および／または p 5 3 の欠損を特徴とする G R E M 1 関連疾患または状態を処置する方法を提供する。

【0167】

[00273] P T E N および／または p 5 3 欠損

[00274] P T E N および p 5 3 は、前立腺前駆体および前立腺がんの推定腫瘍開始細胞における自己再生および分化の調節に寄与する。本明細書で提供される用語 P T E N および／または p 5 3 は、m R N A、タンパク質および D N A（例えば、ゲノム D N A）も含む異なる形態を包含することが意図されている。したがって、P T E N および／または p 5 3 のレベルおよび／または活性および／または変異状態は、R N A（例えば、m R N A）、タンパク質または D N A（例えば、ゲノム D N A）を用いて測定できる。

【0168】

[00275] 用語「T P 5 3」および「p 5 3」は本明細書では互換的に使用される。T P 5 3 は、例えば、細胞周期およびアポトーシスを調節する遺伝子の数を調節することができる転写因子である。p 5 3 の代替名は、例えば、抗原 N Y - C O - 1 3、リン酸化タンパク質 p 5 3、腫瘍抑制因子 p 5 3 および細胞腫瘍抗原 p 5 3 を含む。本明細書で使用される p 5 3 は、すべてのアイソフォームおよび変異体を含む、T P タンパク質ならびに T P 5 3 タンパク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、D N A または R N A）を示すことができる。ある特定の実施形態では、p 5 3 の遺伝子は、N G _ 0 1 7 0 1 3 . 2 の N C B I 参照配列の下 G e n B a n k データベースで入手可能であり、ヒト p 5 3 タンパク質の例示的配列は、受入番号 P 0 4 6 3 7（P 5 3 - H U M A N）下 U n i P r o t K B データベースで入手可能である。ある特定の実施形態では、p 5 3 のタンパク質は配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含む。

【0169】

[00276] 用語「P T E N」、「P t e n」および「P T E N チロシンホスファターゼ」は、本明細書では互換的に使用される。P T E N は、染色体 10 で削除されたホスファターゼおよびテンシン相同体としても知られるが、その脂質ホスファターゼ活性を通じて

P I 3 K シグナル伝達経路に拮抗し、そのタンパク質ホスファターゼ活性を通じて M A P K 経路を負に調節する二重特異性タンパク質ホスファターゼとして作用する腫瘍抑制因子である (P e z z o l e s i ら、H u m . M o l e c . G e n e t . 1 6 : 1 0 5 8 ~ 1 0 7 1 頁、2 0 0 7 年)。本明細書で使用される P T E N は、すべてのアイソフォームおよび変異体を含む P T E N タンパク質ならびに P T E N をコードする D N A (例えば、コード遺伝子配列) または R N A を指すことができる。ヒト P T E N の例示的配列は、受入番号 P 6 0 4 8 4 (P T E N _ H U M A N) 下 U n i P r o t K B データベースで入手可能であり、3 つのアイソフォーム: アイソフォーム 1 (P 6 0 4 8 4 - 1)、アイソフォーム アルファ (P 6 0 4 8 4 - 2) およびアイソフォーム 3 (P 6 0 4 8 4 - 3) を有する。P T E N の遺伝子の例示的配列は、N C _ 0 0 0 0 1 0 . 1 1 の N C B I 参照配列の下 G e n B a n k データベースで入手可能である。ある特定の実施形態では、P T E N のタンパク質は配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む。

10

【0170】

【00277】本明細書で使用される場合、「欠損」または「欠損した」とは、活性またはレベルの不十分さのことであり、例えば、正常な活性もしくはレベル未満であること、または活性もしくはレベルがないもしくはゼロであることを含むことができる。例えば、P T E N および／または p 5 3 の活性またはレベルが欠損すれば、生体試料において、P T E N および／もしくは p 5 3 が正常な機能がないもしくはそれ未満である、または P T E N および／もしくは p 5 3 の発現レベルがないもしくは減少していることになる。

20

【0171】

【00278】ある特定の実施形態では、P T E N および／または p 5 3 の欠損は、機能的な P T E N および／または p 5 3 がいないことを特徴とする。

【0172】

【00279】ある特定の実施形態では、P T E N および／または p 5 3 の活性またはレベルの欠損は、P T E N および／または p 5 3 における不活性化変異の存在により示すことができる。

【0173】

【00280】本開示は、いかなる特定の P T E N または p 5 3 変異にも限定されないことは理解されるべきである。P T E N または p 5 3 でのいかなる不活性化変異も本開示では有用であることが可能である。

30

【0174】

【00281】ある特定の実施形態では、P T E N および／または p 5 3 の活性またはレベルの欠損は、生体試料中の P T E N および／または p 5 3 の発現レベルまたはコピー数により示すことが可能である。したがって、生体試料中の P T E N および／または p 5 3 の活性またはレベルに欠損があるかどうかを決定するために、本明細書で提供される方法は、P T E N および／または p 5 3 の発現レベルまたはコピー数が参照レベルと比べて生体試料において減少しているかどうかを決定するステップを含むことができる。

【0175】

【00282】D N A または R N A レベルでの P T E N および／または p 5 3 の変異状態または発現レベルは、当技術分野で公知であるいかなる方法でも、例えば、限定せずに、増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、またはシーケンシングアッセイにより測定可能である。タンパク質レベルでの P T E N および／または p 5 3 の変異状態または発現レベルは、当技術分野で公知であるいかなる方法でも、例えば、限定せずに、免疫アッセイにより測定可能である。

40

【0176】

【00283】ある特定の実施形態では、P T E N および／または p 5 3 の欠損は、P T E N および／または p 5 3 発現がないことを特徴とする。

【0177】

【00284】ある特定の実施形態では、P T E N および／または p 5 3 の活性またはレベルの欠損は、P T E N および／または p 5 3 のエピジェネティックサイレンシング、転写

50

抑制、またはマイクロRNA (miRNA) 調節により示すことができる。

【0178】

【00285】いかなる理論にも縛られたくはないが、例えば、不活性化変異によるp53／PTENの欠損はGREM1の発現の増加をもたらすと考えられている。一部の実施形態では、PTENおよび／またはp53の欠損を特徴とするGREM1関連疾患または状態は、GREM1発現または過剰発現をさらに特徴とする。GREM1発現は上に提供される方法を使用して決定することができる。

【0179】

【00286】ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は、任意選択で、対象から得られた生体試料において、GREM1発現または過剰発現を有することで特定される。

10

【0180】

【00287】GREM1関連疾患または状態

【00288】一部の実施形態では、GREM1関連疾患または状態は、がん、線維疾患、血管新生、緑内障または網膜疾患、腎臓疾患、肺動脈性肺高血圧症、および変形性関節症(OA)からなる群から選択される。

【0181】

【00289】一部の実施形態では、GREM1関連疾患または状態はがんである。ある特定の実施形態では、がんは転移性がんである。ある特定の実施形態では、がんは、前立腺がん、乳がん、神経膠腫、脂肪肉腫、肝細胞癌、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜癌、子宮平滑筋肉腫、頭頸部の扁平上皮癌、甲状腺がん、肝臓がん、膵臓がん、膀胱がん、結腸がん、食道がん、胆管がん、骨肉腫、神経膠芽腫、卵巣がん、胃がん、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)、小細胞肺癌または黒色腫である。

20

【0182】

【00290】一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。

【0183】

【00291】一部の実施形態では、前立腺がんは、a) アンドロゲン受容体(AR)発現に陰性である、b) アンドロゲン受容体(AR)発現と神経内分泌(NE)分化の両方が陰性である；c) アンドロゲン除去療法に抵抗性、任意選択で去勢抵抗性である、d) 参照レベルよりも低い前立腺特異抗原(PSA)のレベルを示す、またはe) a)～d)の任意の組合せである。

30

【0184】

【00292】一部の実施形態では、がんは乳がんである。乳がんはトリプルネガティブ乳がんであることが可能である。

【0185】

【00293】一部の実施形態では、線維性疾患は、肺線維症、皮膚線維症、糖尿病性腎症、または虚血性腎臓損傷である。

【0186】

【00294】方法は、対象に治療有効量のGREM1アンタゴニストを投与するステップを含む。GREM1関連疾患または状態は、GREM1活性の調節(例えば、GREM1活性の低減)から利益を得ると考えられる疾患または状態が可能である。一部の実施形態では、GREM1関連疾患または状態は、GREM1発現または過剰発現を特徴とする。

40

【0187】

【00295】一部の実施形態では、PTENおよび／またはp53の欠損を特徴とするGREM1関連疾患または状態は、がん、線維疾患、血管新生、緑内障または網膜疾患、腎臓疾患、肺動脈性肺高血圧症、および変形性関節症(OA)からなる群から選択することができる。GREM1のレベルの増加は、強皮症、糖尿病性腎症、神経膠腫、頭頸部がん、前立腺がんおよび結腸直腸がんなどのこれらの疾患および状態の多くと関連付けられている。

【0188】

50

【00296】i. がん

【00297】一部の実施形態では、PTENおよび／またはp53の欠損を特徴とするGREM1関連疾患または状態は、がん、特に、GREM1発現がんである。

【0189】

【00298】本明細書で提供される処置方法は、以前分かっていなかったPTENおよび／またはp53が欠損しているがん細胞でのGREM1の有意な上方調節という驚くべき知見に基づいている。

【0190】

【00299】ある特定の実施形態では、がんは、固形腫瘍または血液腫瘍から選択される。ある特定の実施形態では、固形腫瘍は、副腎皮質癌、肛門がん、星状細胞腫、小児小脳または大脳、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨腫瘍、脳がん、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫／悪性神経膠腫、脳室上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、乳がん、バーキットリンパ腫、子宮頸がん、結腸がん、肺気腫、子宮内膜がん、食道がん、ユーイング肉腫、網膜芽細胞腫、胃がん、神経膠腫、頭頸部がん、心臓がん、ホジキンリンパ腫、膵臓細胞癌（膵内分泌部）、カポジ肉腫、腎臓がん（腎細胞がん）、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌（腎臓がん）、網膜芽細胞腫、ユーイングファミリー腫瘍、皮膚がん、胃がん、精巣がん、咽頭がん、甲状腺がん、または膣がんである。

【0191】

【00300】血液腫瘍は、白血病（例えば、急性リンパ腫白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ腫白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML））、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫（例えば、ワンデンストレーム高ガンマグロブリン血症（WM）））、または骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫（MM））である。ある特定の実施形態では、がんは多発性骨髄腫（MM）である。GREM1は、骨髄（BM）間葉系間質細胞のサブセットにより豊富に分泌されることが見出されており、MM疾患発症で決定的役割を果たすと考えられる。ヒトおよびマウスBM間質試料の定量的PCRによる分析により、GREM1／Grem1発現がMM担腫瘍コホートにおいて健康な対象と比べて有意に高いことが示された。抗GREM1抗体は、マウスにおいてMM腫瘍負荷を減少させることが明らかにされている（K. Clarkら、Cancers 2020年、12、2149頁）。

【0192】

【00301】ある特定の実施形態では、がんは、前立腺がん、胃食道がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、肝臓がん、膵臓がん、乳がん、気管支がん、骨がん、肝臓胆管がん、卵巣がん、精巣がん、腎臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、脊椎がん、脳がん、子宮頸がん、子宮がん、子宮内膜がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、肛門がん、胃腸がん、皮膚がん、脳下垂体がん、胃がん（stomach cancer）、膣がん、甲状腺がん、神経膠芽腫、星状細胞腫、黒色腫、骨髄異形成症候群、肉腫、奇形腫、神経膠腫、腺癌、白血病（例えば、急性リンパ腫白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ腫白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML））、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫（例えば、ワンデンストレーム高ガンマグロブリン血症（WM）））、または骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫（MM））、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）、小細胞肺がん、食道がん、骨肉腫、および胃がん（gastric cancer）である。

【0193】

【00302】ある特定の実施形態では、がんは、前立腺がん、胃食道がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、肝臓がん、結腸がん、結腸直腸がん、神経膠腫、膵臓がん、膀胱がんおよび乳がんからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、がんはトリプルネガティブ乳がんである。ある特定の実施形態では、がんは多発性骨髄腫である。

【0194】

[00303]ある特定の実施形態では、がんは転移性である。ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書で提供される抗体を使用してがん転移を処置するまたは予防する方法をさらに提供する。がん転移は、がん細胞がその最初の部位から身体内の別の部位に広がる過程である。

【0195】

[00304]ある特定の実施形態では、がんは前立腺がん、乳がんまたは肝臓がんである。腫瘍抑制因子 P t e n および p 5 3 は、前立腺がんまたは乳がんでは失われていることが多い。

【0196】

[00305]ある特定の実施形態では、乳がんはトリプルネガティブ乳がんである。用語「トリプルネガティブ乳がん」または「TNBC」とは、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、および過剰 H E R 2 タンパク質についての検査で陰性である乳がんのことである。TNBCは、ホルモン療法または H E R 2 を標的にする薬物に対して非応答性のあることがある。試料中の発現は、減少したアンドロゲン受容体シグナル伝達を有する G R E M 1 関連前立腺がんを処置する方法というセクション下の上記の通りに検出することができる。

【0197】

[00306] P T E N および／または p 5 3 が欠損している TNBC は、これらの腫瘍抑制因子が正常なレベルである他の TNBC と比べて悪い予後を有する (J e f f C . L . ら、E M B O M o l M e d (2 0 1 4) 6 : 1 5 4 2 ~ 1 5 6 0 頁)。混合 P t e n - p 5 3 変異は、活性化過剰 A K T シグナル伝達および P t e n または p 5 3 単一変異腫瘍と比べてより多くの間充織特徴を示すクローディン低型トリプルネガティブ様乳がん (TNBC) の形成を加速することが見出されている。

【0198】

[00307]一部の実施形態では、P T E N および／または p 5 3 の欠損を特徴とする G R E M 1 関連疾患または状態は、肝臓がん、例えば、肝細胞癌 (HCC) である。一部の実施形態では、肝臓がんは、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染関連 HCC である。HCC は世界のがん関連死の第 2 の主因である。遷延性 HBV 感染は、HCC 発症の主要なリスク因子の 1 つであり、これは世界規模で HCC の 50 % 以上を占める。HBV 感染関連 HCC は、P T E N および／または p 5 3 の欠損をもたらす p 5 3 および P T E N 遺伝子座の C R I S P R / C a s 9 媒介変異を介して発症させることができる (Y o n g z h e n L . ら、S c i e n t i f i c R e p o r t s (2 0 1 7) 7 : 2 7 9 6 頁)。HCC の起源は、肝臓前駆体／幹細胞の増強された増幅および成熟停止だと見なされており、これは BMP 機能を遮断する線維芽細胞分泌 G R E M 1 を介して線維症により促進されることが明らかにされた (G u i m e i M ら、B M C R e s N o t e s 2 0 1 2 年 ; 5 : 3 9 0 頁)。

【0199】

[00308] i i . 線維性疾患

[00309] P T E N および／または p 5 3 欠損疾患または状態は、疾患が、G R E M 1 上方調節とさらに関連のある P T E N および／または p 5 3 欠損を特徴とする限り、非がん疾患でもよい。例えば、肺および皮膚線維症ならびに糖尿病性および虚血性腎臓損傷などの非がん疾患は、p 5 3 または P T E N の調節不全を含むと報告されており、これらの疾患は G R E M 1 発現と関連することも知られている (詳しくは、R o h a n S a m a r a k o o n ら、L o s s o f T u m o u r S u p p r e s s o r P T E N E x p r e s s i o n i n R e n a l I n j u r y I n i t i a t e s S M A D 3 a n d p 5 3 D e p e n d e n t F i b r o t i c R e s p o n s e s , J P a t h o l . 2 0 1 5 年 A u g ; 2 3 6 (4) : 4 2 1 ~ 4 3 2 頁 ; N a g a r a j a M . R . ら、「p 5 3 E x p r e s s i o n i n L u n g F i b r o b l a s t s I s L i n k e d t o M i t i g a t i o n o f F i b r o t i c L u n g R e m o d e l i n g」、A m J P a t h o l . 2 0 1 8 年 O c t ; 1 8

8 (10) : 2207 ~ 2222 頁参照のこと)。本発明者らは、GREM1 と PTEN / p53 の間の相関関係を思いがけず発見し、したがって、PTEN および / または p53 の欠損を特徴とする非がん疾患または状態も、GREM1 アンタゴニストを含む GREM1 調節剤を投与することにより処置しうることが予想される。

【0200】

[00310] 一部の実施形態では、PTEN および / または p53 の欠損を特徴とする GREM1 関連疾患または状態は、線維性疾患である。線維性疾患は、線維症に関連する疾患または状態である。線維症は、例えば、肺、肝臓、腎臓、皮膚、心臓、腸または筋肉での慢性臓器損傷の一般的な特長である癒痕化過程である。線維症は、細胞外基質および他の線維症関連タンパク質の増加し変更された沈着をもたらすトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) の活性の上昇を特徴とする。上昇した GREM1 発現は多くの線維性疾患で見い出されており、GREM1 が線維症の重要なマーカーである可能性が示唆される (Costello ら、2010 年、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 42 : 517 ~ 523 頁 ; Lappin ら、2002 年、Nephrol. Dial. Transplant. 17 : 65 ~ 67 頁 ; Boers ら、2006 年、J. Biol. Chem. 281 : 16289 ~ 16295 頁)。

【0201】

[00311] 線維性疾患は、肺、肝臓、腎臓、眼、皮膚、心臓、腸または筋肉での線維性疾患を含むことができる。肺での線維性疾患の例は、肺線維症、嚢胞性線維症、肺高血圧症、進行性塊状線維症、閉塞性細気管支炎、慢性喘息に関連する気道リモデリングまたは特発性肺線維症を含む。肝臓での線維性疾患の例は、肝硬変または非アルコール性脂肪性肝炎を含む。腎臓での線維性疾患の例は、例えば、腎線維症、虚血性腎臓損傷、尿細管間質性線維症、糖尿病性腎症、腎硬化症、または腎毒性を含む。眼での線維性疾患の例は、例えば、角膜線維症、網膜下線維症を含む。皮膚での線維性疾患の例は、例えば、腎性全身性線維症、ケロイドまたは強皮症を含む。心臓での線維性疾患の例は、心内膜心筋線維症または陳旧性心筋梗塞を含む。

【0202】

[00312] i i i . 他の疾患

[00313] 一部の実施形態では、GREM1 関連疾患または状態は、肺動脈高血圧 (PAH) である。用語「肺動脈高血圧」(「PAH」) とは、肺動脈圧の持続する上昇を特徴とする進行性の肺障害のことである。GREM1 は、低酸素症中にマウスの小肺内血管の壁で上昇していることが見出されている。抗 GREM1 抗体は、PAH に関連のある 1 つまたは複数の症状を軽減するまたは回復させる、例えば、PAH を有する対象において、例えば、肺動脈の肥厚を阻害し、心拍出量および / または心拍出量対収縮末期容量比 (SV / ESV) を増やし、右心室心拍出量および / または心臓指数 (CI) を増やし、例えば、右心房圧、肺動脈圧、呼気終末圧の存在下での肺毛細血管けつ入圧、全身動脈圧、心拍、肺血管抵抗、および / または全身血管抵抗などの他の血行動態測定値を改善することが見出されている (詳しくは、米国特許出願公開第 20180057580 号参照のこと)。

【0203】

[00314] 一部の実施形態では、GREM1 関連疾患または状態は、変形性関節症 (OA) である。GREM1 は、軟骨細胞での機械的荷重誘引因子として報告されており、繰返し歪または静水圧負荷後、軟骨の中間および深層において高レベルで検出される。GREM1 は、変形性関節症では上方調節されていることが報告されており、血清中および滑液中での GREM1 濃度は、膝 OA の発病および重症度と相関している (J. Yi ら、Med Sci Monit、2016 年 ; 22 : 4062 ~ 4065 頁)。GREM1 は核内因子 κ B シグナル伝達を活性化し、それに続いて分解酵素を誘導する。マウスでの GREM1 抗体の関節内投与または GREM1 の軟骨細胞特異的欠失は、変形性関節症の発症を減速することが報告された (S. H. Chang ら、Nature Communications、(2019) 10 : 1442 頁参照)。

【0204】

【00315】一部の実施形態では、GREM1 関連疾患または状態は、血管新生である。GREM1 は、主要血管新生促進受容体である血管内皮増殖因子受容体-2 (VEGFR-2) のアゴニストである。ヘパラン硫酸 (HS) およびヘパリン、その抗凝固効果で知られるグリコサミノグリカン (GAG) は GREM1 に結合することが示されている。GREM1 はヘパリンに結合して VEGFR-2 を BMP 非依存的に活性化 (Chiodelli ら、2011 年; Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31: e116-e127)。抗 GREM1 抗体は、血管新生またはヘパリン媒介血管新生と関連のある 1 つまたは複数の症状を軽減するまたは回復させることが見出されている (詳しくは、米国特許出願公開第 20200157194 号参照のこと)。

10

【0205】

【00316】一部の実施形態では、GREM1 関連疾患または状態は、緑内障である。緑内障は、眼中で 1 つまたは複数の BMP ファミリー遺伝子の発現の変更により引き起こされる場合があり、この変更により増加した眼圧および／または緑内障性市神経症が上昇する。GREM1 は、緑内障線維柱帯細胞において増加した発現を有することが見出されている。GREM1 アンタゴニストは、血管新生または緑内障に関連のある 1 つまたは複数の症状を軽減するまたは回復させることが見出されている (詳しくは、米国特許第 7744873 号参照のこと)。

【0206】

【00317】一部の実施形態では、GREM1 関連疾患または状態は、網膜疾患である。一部の実施形態では、GREM1 関連疾患または状態は、腎臓疾患である。

20

【0207】

【00318】GREM1 アンタゴニスト

【00319】一部の実施形態では、GREM1 アンタゴニストは、GREM1 レベルまたは GREM1 活性を減少させる。例えば、GREM1 アンタゴニストは、GREM1 の発現および／もしくは活性を部分的に阻害する、すなわち、減少させることができる、または GREM1 の発現および／もしくは活性を完全に阻害する、すなわち、完全に取り除くことができる。

【0208】

【00320】GREM1 アンタゴニストは、GREM1 レベルまたは活性を、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 減少させる。

30

【0209】

【00321】GREM1 のいかなる機能または活性も減少させることができる。ある特定の実施形態では、GREM1 アンタゴニストは、任意選択で、がん細胞において、BMP シグナル伝達に対する GREM1 媒介阻害および／または MAPK シグナル伝達の GREM1 媒介活性化を減少させる。一部の実施形態では、GREM1 アンタゴニストは、BMP 非依存性 GREM1 活性を阻害する。

【0210】

【00322】ある特定の実施形態では、GREM1 アンタゴニストは、非がん細胞よりもがん細胞において GREM1 の機能または活性を選択的に減少させる。GREM1 の機能または活性またはレベルの減少は、GREM1 アンタゴニストの存在下および非存在下で実施されるいかなる適切なアッセイでも使用して測定することが可能である。

40

【0211】

【00323】一部の実施形態では、GREM1 アンタゴニストは、GREM1-FGFR 1 軸インヒビターを含む。本開示は、驚くべきことに、GREM1 が、BMP とは独立している可能性がある MAPK シグナル伝達の活性化で役割を果たしていると思われ、おそらく FGFR の新規のリガンドとして作用することを見出した。したがって、本明細書で提供される GREM1-FGFR 1 軸インヒビターとは、GREM1 依存性 FGFR 1 シ

50

グナル伝達のシグナル伝達を妨害するもしくは阻害することができる、または G R E M 1 と F G F R 1 との間の結合を遮断する任意のインヒビターのことである。

【0212】

【00324】一部の実施形態では、G R E M 1 - F G F R 1 軸インヒビターは、F G F R 1 結合インヒビターを含む。

【0213】

【00325】一部の実施形態では、F G F R 1 結合インヒビターは、F G F R 1 の細胞外ドメイン2に結合し、任意選択で、残基 G l u 1 6 0 を含むエピトープで F G F R 1 に結合し、残基番号は配列番号75に従う。

【0214】

【00326】一部の実施形態では、G R E M 1 - F G F R 1 軸インヒビターは、残基 L y s 1 2 3 および／もしくは残基 L y s 1 2 4 を含むエピトープで h G R E M 1 に結合し、残基番号は配列番号69に従う；または F G F R 1 が、F G F R 1 の残基 L y s 1 2 3 および／もしくは残基 L y s 1 2 4 に結合するのを遮断する。

【0215】

【00327】一部の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストまたは G R E M 1 - F G F R 1 軸インヒビターは、本明細書で提供される h G R E M 1 に対する抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0216】

【00328】種々の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストは、抗 G R E M 1 抗体もしくはその抗原結合断片、G R E M 1 模倣ペプチド、グレムリンRNAもしくはDNAを標的にする核酸、グレムリンとBMPとの間の相互作用を阻害する化合物、またはG R E M 1 媒介生物活性を阻害する化合物でもよい。G R E M 1 アンタゴニストは、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合断片、阻害性 G R E M 1 模倣ペプチド、G R E M 1 RNA またはDNAを標的にする阻害性核酸、グレムリンとBMPとの間の相互作用を阻害する化合物、阻害性核酸をコードするポリヌクレオチド、G R E M 1 活性を阻害する化合物を含むことができる。

【0217】

【00329】一部の実施形態では、G R E M 1 RNA またはDNAを標的にする阻害性核酸は、低分子ヘアピン型RNA (s h RNA)、マイクロ干渉RNA (m i RNA)、二本鎖RNA (d s RNA)、低分子干渉RNA (s i RNA)、ガイドRNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【0218】

【00330】ある特定の実施形態では、グレムリンRNAもしくはDNAを標的にする核酸は、非コード核酸、例えば、低分子ヘアピン型RNA (s h RNA)、マイクロ干渉RNA (m i RNA)、二本鎖RNA (d s RNA)、低分子干渉RNA (s i RNA)、ガイドRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはそのようなものをコードするポリヌクレオチドである。

【0219】

【00331】ある特定の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストは、G R E M 1 のレベルをmRNAレベルまたはタンパク質レベルで減少させてよい。例えば、G R E M 1 アンタゴニストは、G R E M 1 の分解をmRNAレベルまたはタンパク質レベルで促進する、G R E M 1 をコードするDNAを破壊する、またはG R E M 1 をコードするDNAからの転写を減少させてもよい。そのようなG R E M 1 アンタゴニストは、G R E M 1 mRNA またはDNAを標的にする非コード核酸、例えば、低分子ヘアピン型RNA (s h RNA)、マイクロ干渉RNA (m i RNA)、二本鎖RNA (d s RNA)、低分子干渉RNA (s i RNA)、ガイドRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびそのようなものをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。G R E M 1 アンタゴニストは、G R E M 1 タンパク質の分解を促進する作用物質も含むことができる。

【0220】

[00332]ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、GREM1がBMP2/4/7などのBMPに結合するのを妨害する（例えば、減少させる）作用物質でよい。例えば、GREM1アンタゴニストは、抗GREM1抗体、GREM1模倣ペプチド、またはBMPへのGREM1の結合を減少させるもしくは遮断し、それによりBMPシグナル伝達に対するGREM1媒介阻害を減少させる化学化合物でもよい。GREM1アンタゴニストは、BMPへの結合を巡ってGREM1と競合しうるが、GREM1アンタゴニストは、BMPへのGREM1結合に直接影響を及ぼさない異なるエピトープまたは結合部位にも結合することがある。しかし、それでもGREM1により媒介されるその生物学的機能を減少させる。

[0221]

[00333]ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、抗GREM1抗体、GREM1とBMPの間の相互作用を阻害する化合物、またはGREM1媒介生物活性（例えば、MAPKシグナル伝達の活性化、またはBMPシグナル伝達に対する阻害）を阻害する化合物を含む。

[0222]

[00334]ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、本明細書で提供される抗GREM1抗体のいずれか、または、例えば、WO2018/115017、WO2019/158658、WO2019/243801、WO2014159010に開示されている抗体などの任意の既存の抗GREM1抗体を含むことができ、前記特許文献の開示は参照によりその全体をここに組み込まれる。

[0223]

[00335]GREM1抗体

[00336]ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、他の抗GREM1抗体とは異なるエピトープに結合するヒトグレムリン1（hGREM1）に対する抗体またはその抗原結合断片を含む。例えば、GREM1アンタゴニストとして使用されるヒトグレムリン1（hGREM1）に対する抗体またはその抗原結合断片は、配列番号63のアミノ酸配列を含むBMP結合ループに結合しない。

[0224]

[00337]ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、重鎖可変（VH）領域および／または軽鎖可変（VL）領域を含む、ヒトグレムリン1（hGREM1）に対する抗体またはその抗原結合断片を含み、重鎖可変領域は：

- a) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号2の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3；
 - b) 配列番号11の配列を含むHCDR1、配列番号12の配列を含むHCDR2、および配列番号13の配列を含むHCDR3；
 - c) 配列番号21の配列を含むHCDR1、配列番号22の配列を含むHCDR2、および配列番号23の配列を含むHCDR3；ならびに
 - d) 配列番号31の配列を含むHCDR1、配列番号32配列を含むHCDR2、および配列番号33の配列を含むHCDR3
- からなる群から選択される。

[0225]

[00338]ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、重鎖可変（VH）領域および／または軽鎖可変（VL）領域を含む、ヒトグレムリン1（hGREM1）に対する抗体またはその抗原結合断片を含み、軽鎖可変領域は：

- a) 配列番号4の配列を含むLCDR1、配列番号5の配列を含むLCDR2、および配列番号6の配列を含むLCDR3；
- b) 配列番号14の配列を含むLCDR1、配列番号15の配列を含むLCDR2、および配列番号16の配列を含むLCDR3；
- c) 配列番号24の配列を含むLCDR1、配列番号25の配列を含むLCDR2、および配列番号26の配列を含むLCDR3；ならびに

d) 配列番号 34 の配列を含む L C D R 1、配列番号 35 配列を含む L C D R 2、および配列番号 36 の配列を含む L C D R 3 からなる群から選択される。

【0226】

[00339]ある特定の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストは、重鎖可変 (V H) 領域および／または軽鎖可変 (V L) 領域を含む、ヒトグレムリン 1 (h G R E M 1) に対する抗体またはその抗原結合断片を含み、

a) 重鎖可変領域は、配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含み；軽鎖可変領域は、配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む；

10

b) 重鎖可変領域は、配列番号 11 の配列を含む H C D R 1、配列番号 12 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 13 の配列を含む H C D R 3 を含み；軽鎖可変領域は、配列番号 14 の配列を含む L C D R 1、配列番号 15 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 16 の配列を含む L C D R 3 を含む；

c) 重鎖可変領域は、配列番号 21 の配列を含む H C D R 1、配列番号 22 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 23 の配列を含む H C D R 3 を含み；軽鎖可変領域は、配列番号 24 の配列を含む L C D R 1、配列番号 25 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 26 の配列を含む L C D R 3 を含む；または

d) 重鎖可変領域は、配列番号 31 の配列を含む H C D R 1、配列番号 32 配列を含む H C D R 2、および配列番号 33 の配列を含む H C D R 3 を含み；軽鎖可変領域は、配列番号 34 の配列を含む L C D R 1、配列番号 35 配列を含む L C D R 2、および配列番号 36 の配列を含む L C D R 3 を含む。

20

【0227】

[00340]ある特定の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストは、重鎖可変 (V H) 領域および／または軽鎖可変 (V L) 領域を含む、ヒトグレムリン 1 (h G R E M 1) に対する抗体またはその抗原結合断片を含み、重鎖可変領域は、配列番号 7、配列番号 17、配列番号 27、配列番号 37、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55、および配列番号 57、ならびに、少なくとも 80 % 配列同一性を有するが、グレムリンに対する特異的結合特異性または親和性を保持しているその相同配列からなる群から選択される配列を含む。

30

【0228】

[00341]ある特定の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストは、重鎖可変 (V H) 領域および／または軽鎖可変 (V L) 領域を含む、ヒトグレムリン 1 (h G R E M 1) に対する抗体またはその抗原結合断片を含み、軽鎖可変領域は、配列番号 8、配列番号 18、配列番号 28、配列番号 38、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 59 および配列番号 61、ならびに、少なくとも 80 % 配列同一性を有するが、グレムリンに対する特異的結合特異性または親和性を保持しているその相同配列からなる群から選択される配列を含む。

【0229】

40

[00342]ある特定の実施形態では、G R E M 1 アンタゴニストは、

a) 配列番号 7 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 の配列を含む軽鎖可変領域：または

b) 配列番号 17 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 18 の配列を含む軽鎖可変領域：または

c) 配列番号 27 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 28 の配列を含む軽鎖可変領域：または

d) 配列番号 37 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 38 の配列を含む軽鎖可変領域：または

e) 配列番号 41、配列番号 43、および配列番号 45 からなる群から選択される配列を

50

含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 47 および配列番号 49 からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域；または

f) 配列番号 41 / 47、41 / 49、43 / 47、43 / 49、45 / 47、および 45 / 49 からなる群から選択される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列の対；または

g) 配列番号 51、配列番号 53、および配列番号 55 からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 59 および配列番号 61 からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域；または

h) 配列番号 51 / 59、51 / 61、53 / 59、53 / 61、55 / 59、55 / 61、57 / 59、および 57 / 61 からなる群から選択される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列の対

10

を含む。

【0230】

[00343]ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、抗 h G R E M 1 抗体 14E3、69H5、22F1、56C11 の 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、または 6）の C D R 配列を含む。

【0231】

[00344]本明細書で使用される「14E3」とは、配列番号 7 の重鎖可変領域、および配列番号 8 の軽鎖可変領域を有するマウス抗体のことである。

【0232】

20

[00345]本明細書で使用される「69H5」とは、配列番号 27 の重鎖可変領域、および配列番号 28 の軽鎖可変領域を有するマウス抗体のことである。

【0233】

[00346]本明細書で使用される「22F1」とは、配列番号 17 の重鎖可変領域、および配列番号 18 の軽鎖可変領域を有するマウス抗体のことである。

【0234】

[00347]本明細書で使用される「56C11」とは、配列番号 37 の重鎖可変領域、および配列番号 38 の軽鎖可変領域を有するマウス抗体のことである。

【0235】

[00348]表 1 は、これらの h G R E M 1 抗体の C D R 配列を示す。重鎖および軽鎖可変領域配列は下の表 2 にも提供されている。

30

【0236】

【00349】

【0237】

40

50

【表 2】
表 1. 抗 hGREM1 抗体の CDR 領域の配列

抗体	領域	CDR1	CDR2	CDR3
14E3	HCDR	配列番号 1 TYGMA	配列番号 2 WINTLSGEPTYADDF KG	配列番号 3 EPMDY
	LCDR	配列番号 4 KSSQSLDSDGKTYL S	配列番号 5 LVSKLDS	配列番号 6 WQGAHFPLT
22F1	HCDR	配列番号 11 DYVMN	配列番号 12 DINPKDGDSGYSHKF KG	配列番号 13 GFTTVVARGDY
	LCDR	配列番号 14 KSSQSLDSDGKTYL N	配列番号 15 LVSKLDS	配列番号 16 WQGTHFPYT
69H5	HCDR	配列番号 21 DDYMH	配列番号 22 WIDPENGDT EY ASKF QG	配列番号 23 WATVPDFDY
	LCDR	配列番号 24 KSSQSLNRSNQKNY LA	配列番号 25 FTSTRES	配列番号 26 QQHYSTPFT
56C11	HCDR	配列番号 31 DFVMN	配列番号 32 DINPNNGGTSYNQKF KG	配列番号 33 DPIYYDYDEVA Y
	LCDR	配列番号 34 RSSQSLVHSNGNTYL H	配列番号 35 KVSNRFS	配列番号 36 SQSTHVPLT

【 0 2 3 8 】
【 0 0 3 5 0 】
【 0 2 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表2. マウス抗体 VH/VL の配列

	VH	VL
14E3	配列番号 7 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGS TFTTYGMAWMKQAPGKGLTWMGW INTLSGEPTYADDFKGRFAFSLKTSAN TAYLQINNLNKNEAATYFCAREPMD YWGQGTSVIVSS	配列番号 8 DVVMTQTPLTILSITIGQPASISCKSSQ SLDSDGKTYLSWLLQRPDQSPKRL ISLVSKLDSGVPDRITGSGSGTDFIL KISRVEAEDLGIYYCWQGAHFPLTF GAGTKLELK
22F1	配列番号 17 EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YSFTDYIMNWLKQSHGKSLEWIGDI NPKDGD SGYSHKFKGKAITLVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCASGFTT VVARGDYWGQGTILTVSS	配列番号 18 DVVMTQTPLTILSVTIGQPASISCKSS QSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPK RLIYLVSKLDSGFDPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVIYYCWQGTHFPY TFGGGTKLEIK
69H5	配列番号 27 EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASG FNIKDDYMHVVKRRPEQGLEWIGWI DPENGDT EYASKFQGKAITTADTSSN TAYLQLSSLTSED TAVYYCTTWAIVP DFDYWGQGTILTVSS	配列番号 28 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCK SSQSLNRSNQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLVHFTSITRESGVPDRFIGSGSG TDFILTISNLQAEDLADYFCQQHYS TPFTFGSGGTKLEIK
56C11	配列番号 37 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YTFTDFYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNNGGTSYNQKFKGKAITLVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCARDPIY YDYDEVAYWGQGTILTVSA	配列番号 38 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPLT FGAGTKLELK

【0240】

【00351】本明細書で提供される抗hGREM1抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え抗体、二特異性抗体、標識抗体、二価抗体、または抗イディオタイプ抗体が可能である。組換え抗体は、動物でというよりもむしろ組換え方法を使用してインビトロで調製される抗体である。

【0241】

【00352】

【0242】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 3. ヒト化 14E3 (Hu14E3)およびヒト化 22F1 (Hu14E3)の配列

抗体鎖	配列
Hu14E3-Ha VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMAWMRQAP GQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCAREPMDYWGQGTMTVTVSS (配列番号 41)
Hu14E3-Hb VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMAWMRQAPG QGLEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISS KAEDTAVYYCAREPMDYWGQGTMTVTVSS (配列番号 43)
Hu14E3-Hc VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGSTFTTYGMAWMKQAPG QGLTWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISS KAEDTAVYYCAREPMDYWGQGTMTVTVSS (配列番号 45)
Hu14E3-La VL	DVVMITQSPLSLPVTILGQPASISCKSSQSLSDGKTYLSWLQQR PGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGAHFPLTFGQGTKLEIK (配列番号 47)
Hu14E3-Lb VL	DVVMITQSPLSLPVTILGQPASISCKSSQSLSDGKTYLSWLQQR PGQSPRRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGAHFPLTFGQGTKLEIK (配列番号 49)
Hu22F1-Ha VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYMNWVRQAP GQGLEWMGDINPKDGDGSGYSHKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTITVTVSS (配列番 号 51)

【 0 2 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

Hu22F1-Hb VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYIMNWVRQAP GQGLEWMGDINPKDGD SGYSHKFKGRVTMTVDKSTSTVYME LSSLRSED TAVYYC ASGFTTVVARGDYWGQGTTTVTVSS (配列 番号 53)
Hu22F1-Hc VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYIMNWVRQAP GQGLEWMGDINPKDGD SGYSHKFKGRVILTVDKSTSTVYME RSLRSED TAVYYC ASGFTTVVARGDYWGQGTTTVTVSS (配列番 号 55)
Hu22F1-Hd VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYIMNWL RQAP GQGLEWIGDINPKDGD SGYSHKFKGRATLTVDKSTSTVYME SLRSED TAVYYC ASGFTTVVARGDYWGQGTTTVTVSS (配列番 号 57)
Hu22F1-La VL	DVVMITQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQR PGQSPRR LIYLVS KLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGTHFPYTFGGG TKVEIK (配列番号 59)
Hu22F1-Lb VL	DVVMITQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQR PGQSPRR LIYLVS KLDSGF PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGTHFPYTFGGG TKVEIK (配列番号 61)

10

20

30

【0244】

【00353】ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、抗ヒトGREM1抗体またはその抗原結合断片を含み、これはa) 残基Gln27および／もしくは残基Asn33を含むエピトープでhGREM1に結合することができ、残基番号は配列番号69に従い；ならびに／またはb) 残基Gln27および／もしくは残基Asn33を含むhGREM1断片に結合することができ、任意選択で、hGREM1断片は少なくとも3（例えば、4、5、6、7、8、9または10）アミノ酸残基の長さを有し；ならびに／またはc) 非がん細胞よりもがん細胞でのほうがBMPシグナル伝達に対するhGREM1媒介阻害を選択的に減少させることができ；ならびに／またはd) 非がん細胞においてBMPシグナル伝達に対するhGREM1媒介阻害の50%以下の減少を示し；ならびに／またはe) 配列番号68のアミノ酸配列を含むキメラhGREM1に結合でき；ならびに／またはf) MAPKシグナル伝達に対するhGREM1媒介活性化を減少させることができ；ならびに／またはg) Fortebioにより測定した場合、1nM以下のK_DでhGREM1に結合できる。

40

50

【0245】

【00354】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、1つまたは複数のアミノ酸残基置換または改変をさらに含むが、hGREM1に対する特異的結合特異性または親和性を保持している。

【0246】

【00355】ある特定の実施形態では、置換または改変のうちの少なくとも1つは、CDR配列のうちの1つもしくは複数に、および／またはVHもしくはVL配列の非CDR領域のうちの1つもしくは複数に存在する。

【0247】

【00356】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、免疫グロブリン定常領域、任意選択で、ヒトIgの定常領域、またはヒトIgGの定常領域をさらに含む。

10

【0248】

【00357】ある特定の実施形態では、定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の定常領域を含む。

【0249】

【00358】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片はヒト化されている。

【0250】

【00359】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、一本鎖抗体分子(scFv)、scFvダイマー(二価ダイアボディ)、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、および二価ドメイン抗体である。

20

【0251】

【00360】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は二特異性である。本明細書で使用される用語「二特異性」は、2つよりも多い特異性を有する分子および2つよりも多い特異性を有する、すなわち、多特異性の分子を包含する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される二特異性抗体およびその抗原結合断片は、hGREM1の第1のおよび第2のエピトープに特異的に結合することができる、またはhGREM1および第2の抗原に特異的に結合することができる。ある特定の実施形態では、hGREM1の第1のエピトープおよび第2のエピトープは互いに全く別であるまたは重複していない。ある特定の実施形態では、二特異性抗体およびその抗原結合断片は、第1のエピトープと第2のエピトープの両方に同時に結合することができる。

30

【0252】

【00361】ある特定の実施形態では、第2の抗原はhGREM1とは異なっている。ある特定の実施形態では、第2の抗原は免疫関連標的を含む。ある特定の実施形態では、第2の抗原は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGFβ、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKP80、CD160、B7-H3、LFA-1、ICOS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16またはCD83を含む。

40

【0253】

【00362】ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を含む。腫瘍抗原は、前立腺特異抗原(PSA)、CA-125、ガングリオシドG(D2)、G(M2)およびG(D3)、CD20、CD52、CD33、EpcAM、CEA、ボンベシン様ペプチド、HER2/neu、上皮増殖因子受容体(EGFR)、e

50

erbB2、erbB3／HER3、erbB4、CD44v6、Ki-67、がん関連ムチン、VEGF、VEGFR（例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3）、エストロゲン受容体、Lewis-Y抗原、TGFβ1、IGF-1受容体、EGFα、c-Kit受容体、トランスフェリン受容体、クローディン18.2、GPC-3、ネクチン-4、ROR1、メソセリン、PCMA、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、BCR-ABL、E2APRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、IL-2R、CO17-1A、TROP2、またはLIV-1を含む。

【0254】

【00363】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、マウスグレムリン1に対して交差反応性ではない。

10

【0255】

【00364】ある特定の実施形態では、抗GREM1抗体またはその抗原結合断片は、マウスグレムリン1に対して交差反応性である。

【0256】

【00365】ある特定の実施形態では、GREM1アンタゴニストは、MARKシグナル伝達に対するGREM1媒介活性化を減少させることができる。

【0257】

【00366】組合せ処置方法

【00367】本明細書で提供される処置方法は、第2の治療薬を提供するステップおよび治療有効量の第2の治療薬を対象に投与し、それによって対象におけるGREM1関連疾患または状態を処置する、予防する、その重症度を減少させるおよび／またはその進行の速度を遅くするステップをさらに含むことができる。これらの実施形態のうちのいくつかでは、GREM1関連疾患または状態は、PTENおよび／もしくはp53の欠損を特徴とすることができる、ならびに／または減少したアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達を特徴とするがんである。

20

【0258】

【00368】これらの実施形態のうちのいくつかでは、本明細書で開示され1つまたは複数の追加の治療薬と組み合わせて投与されるGREM1アンタゴニストは、1つまたは複数の追加の治療薬と同時に投与してもよく、これらの実施形態のうちのいくつかでは、GREM1アンタゴニストと追加の治療薬（複数可）は、同じ医薬組成物の一部として投与してもよい。しかし、別の治療薬と「組み合わせて」投与されるGREM1アンタゴニストは、その薬剤と同時にまたはその薬剤と同じ組成物で投与される必要はない。別の薬剤に先立ってまたはその後で投与されるGREM1アンタゴニストは、たとえGREM1アンタゴニストと第2の薬剤が異なる経路を経て投与される場合でも、その語句が本明細書で使用されるように、その薬剤と「組み合わせて」投与されると見なされる。可能な場合、本明細書で開示されるGREM1アンタゴニストと組み合わせて投与される追加の治療薬は、追加の治療薬の製品情報シートに記載されているスケジュールに従って、または医師用添付文書集2003（Physicians' Desk Reference、第57版；Medical Economics Company；ISBN：1563634457；第57版（November 2002年））もしくは当技術分野で周知のプロトコルに従って投与される。

30

40

【0259】

【00369】i）がんに対する組合せ処置

【00370】一部の実施形態では、本明細書で開示されるGREM1アンタゴニストは、第2の抗がん剤、例えば、化学療法剤（例えば、シスプラチン）、抗がん薬、放射線療法、免疫療法（例えば、免疫チェックポイントインヒビター、MPDL-3280A）抗血管形成剤、標的療法、細胞療法、遺伝子療法剤、ホルモン療法剤、サイトカイン、緩和ケア、がん処置のための手術（例えば、腫瘍摘出）、1つまたは複数の制吐薬、化学療法から生じる合併症に対する処置、またはがん患者のための食事補助剤と組み合わせてがんを

50

処置するために投与してもよい。

【0260】

【00371】本明細書で使用される用語「免疫療法」とは、がんなどの疾患と戦う免疫系を刺激するまたは一般的に免疫系をブーストするタイプのことである。免疫療法は、確立した腫瘍免疫反応性を有し（例えば、エフェクター細胞）抗腫瘍効果を直接的にまたは間接的に媒介することができるが必ずしも無傷の宿主免疫系に依存してはいない（例えば、抗体療法またはCAR-T細胞療法）薬剤を送達することによる受動免疫療法を含む。免疫療法は能動免疫療法をさらに含むことができ、ここでは処置は、内在性宿主免疫系のインビボ刺激に依拠して、免疫応答改変剤の投与で疾患細胞に対して反応する。

【0261】

【00372】免疫療法の例は、限定せずに、チェックポイントモジュレータ、養子細胞移入、サイトカイン、腫瘍溶解性ウイルスおよび治療ワクチンを含む。

【0262】

【00373】チェックポイントモジュレータは、免疫系攻撃を回避するがん細胞の能力を妨げ、腫瘍に対する免疫系応答をもっと強力に助けることができる。免疫チェックポイント分子は、共刺激シグナルを媒介して免疫応答を増強することができるまたは共阻害性シグナルを媒介して免疫応答を抑制することができる。チェックポイントモジュレータの例は、限定せずに、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、A2AR、CD160、2B4、TGFβ、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD47、CD122、ICAM-1、IDO、NKG2C、SLAMF7、SIGLEC7、NKP80、CD160、B7-H3、LFA-1、ICOS、4-1BB、GITR、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、CD3、CD16およびCD83のモジュレータを含む。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントモジュレータは、PD-1/PD-L1軸インヒビターを含む。

【0263】

【00374】養子細胞移入は、T細胞のがんと闘う天然の能力をブーストしようと企てる処置である。この処置では、T細胞は患者から採取され、インビトロで増やされ、活性化される。ある特定の実施形態では、T細胞はインビトロでCAR-T細胞に改変される。がんに対して最も活性のあるT細胞またはCAR-T細胞は、大型バッチで2～8週間インビトロで培養される。この期間中、患者は、化学療法および放射線療法などの処置を受けて身体の免疫を減少させる。これらの処置後、インビトロ培養T細胞またはCAR-T細胞は患者に戻される。ある特定の実施形態では、免疫療法はCAR-T療法である。

【0264】

【00375】サイトカイン療法を使用すれば、免疫系への腫瘍抗原提示を増強することもできる。がんの処置に使用されるサイトカインの2つの主要なタイプはインターフェロンとインターロイキンである。サイトカイン療法の例は、限定せずに、インターフェロンα、β、およびγなどのインターフェロン、マクロファージ-CSF、顆粒球マクロファージ-CSF、および顆粒球-CSFなどのコロニー刺激因子、インスリン成長因子（IGF-1）、血管内皮増殖因子（VEGF）、形質転換成長因子（TGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、およびIL-12などのインターロイキン、TNF-αおよびTNF-βなどの腫瘍壊死因子またはその任意の組合せを含む。

【0265】

【00376】腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞を死滅させることができる遺伝子改変ウイルスである。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に特異的に感染し、それにより腫瘍細胞溶解をもたらし、続いて大量の腫瘍抗原を放出して、これが免疫系の引き金を引いてそのような腫瘍抗原を有するがん細胞を標的にして取り除くことができる。腫瘍溶解性ウイルスの例は、限定せずに、タリモジーン・ラハーパレブベックを含む。

【0266】

【00377】治療ワクチンは、がん細胞に対する免疫系の応答をブーストすることによりがんにも不利に作用する。治療ワクチンは、非病原性微生物（例えば、マイコバクテリウム・ボビス（*Mycobacterium bovis*）カルメットグラヌ菌、BCG）、腫瘍細胞を標的にする遺伝子改変ウイルス、または1つもしくは複数の免疫原性成分を含むことができる。例えば、BCGは、カテーテルを用いて膀胱中に直接挿入することができる、膀胱がん細胞に対して免疫応答を引き起こすことができる。

【0267】

【00378】抗血管形成剤は、腫瘍成長を支える血管の成長を遮断することができる。抗血管形成剤の一部は、VEGFまたはその受容体であるVEGFRを標的にする。抗血管形成剤の例は、限定せずに、アキシチニブ、ベバシズマブ、カボザンチニブ、エベロリムス、レナリドミド、レンバチニブメシレート、パゾパニブ、ラムシルマブ、レゴラフェニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、サリドマイド、バンデタニブ、およびZiv-Aフリベルセプトを含む。

【0268】

【00379】「標的療法」は、がん細胞中に存在するが正常細胞中には存在しないもしくはがん細胞中のほうが豊富である特定のタンパク質などのがんに関連する特定の分子、またはがんの成長および生存に寄与するがん微小環境中の標的分子に作用するタイプの療法である。標的療法は、治療薬を腫瘍に向け、それによって正常組織を治療薬の効果から温存する。

【0269】

【00380】標的療法は、例えば、チロシンキナーゼ受容体および核内受容体を標的にすることができる。そのような受容体の例は、erbB1（EGFRまたはHER1）、erbB2（HER2）、erbB3、erbB4、FGFR、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）、およびインスリン様成長因子-1受容体（IGF-1R）、アンドロゲン受容体（AR）、エストロゲン受容体（ER）、核内受容体（NR）およびPRを含む。

【0270】

【00381】標的療法は、ErkおよびPI3K/Akt、AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）、PTEN、p53、p19ARF、Rb、Apaf-1、CD-95/Fas、TRAIL-R1/R2、カスパーゼ-8、フォークヘッド、ボックス03A、MDM2、IAPs、NF-kB、Myc、P13K、Ras、FLIP、ヘレグリン（HRG）（gp30としても知られる）、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bak、Bad、Bok、Bik、Blk、Hrk、BNIP3、BimL、Bid、ならびにEGL-1などの、チロシンキナーゼまたは核内受容体シグナル伝達カスケード中の分子を標的にすることができる。

【0271】

【00382】標的療法は、エストロゲン、エストラジオール（E2）、プロゲステロン、エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイド、プロラクチン、甲状腺ホルモン、インスリン、P70S6キナーゼタンパク質（PS6）、サバイビン、線維芽細胞成長因子（FGF）、EGF、Neu分化因子（NDF）、形質転換成長因子アルファ（TGF- α ）、IL-1A、TGF-ベータ、IGF-1、IGF-II、IGFBP、IGFBPプロテアーゼ、およびIL-10などの腫瘍関連リガンドも標的にすることができる。

【0272】

【00383】一部の実施形態では、本明細書で開示されるGREM1アンタゴニストは、前立腺がんを処置するために第2の抗がん薬と組み合わせて投与してよい。ある特定の実施形態では、抗がん薬は抗前立腺がん薬を含む。一部の実施形態では、抗前立腺がん薬は、アンドロゲン軸インヒビター；アンドロゲン合成インヒビター；ADPリボースポリメラーゼ（PARP）インヒビター；またはそれらの組合せを含む。

【0273】

【00384】ある特定の実施形態では、アンドロゲン軸インヒビターは、黄体ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、LHRHアンタゴニストおよびアンドロゲン受容体アンタゴニストからなる群から選択される。

【0274】

【00385】ある特定の実施形態では、アンドロゲン軸インヒビターは、デガレリクス、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、アパルタミド、ダロルタミド、エンザルタミド、またはアビラテロンである。

【0275】

【00386】ある特定の実施形態では、アンドロゲン合成インヒビターは、アビラテロンアセテートまたはケトコナゾールである。

10

【0276】

【00387】ある特定の実施形態では、PARPインヒビターは、オラパリブ、またはルカパリブである。

【0277】

【00388】ある特定の実施形態では、抗前立腺がん薬は、アビラテロンアセテート、アパルタミド、ピカルタミド、カバジタキセル、カソデックス（ピカルタミド）、ダロルタミド、デガレリクス、ドセタキセル、エリガード（リュープロリドアセテート）、エンザルタミド、アーリーダ（アパルタミド）、フィルマゴン（デガレリクス）、フルタミド、ゴセレリンアセテート、ジェブタナ（カバジタキセル）、リュープロリドアセテート、リ
ュープロン（リュープロリドアセテート）、ルプロンデポット（リュープロリドアセテ
ート）、リムパーザ（オラパリブ）、ミトキサントロン塩酸塩、ニランドロン（ニルタミド
）、ニルタミド、ニューベクオ（ダロルタミド）、オラパリブ、プロベンジ（シプリューセ
ル－T）、二塩化ラジウム223、ルブラカ（ルカパリブカンシレート）、ルカパリブカ
ンシレート、シプリューセル－T、タキソテル（ドセタキセル）、ゾーフィゴ（二塩化
ラジウム223）、イクスタンジ（エンザルタミド）、ゾラデックス（ゴセレリンアセテ
ート）およびサイティガ（アビラテロンアセテート）からなる群から選択される。

20

【0278】

【00389】ある特定の実施形態では、がん患者のための食事補助剤は、がんに対する防
御効果がある適切な栄養補助剤が可能である。ある特定の実施形態では、食事補助剤は、
インドール－3－カルビノールを含むまたは消化後にインドール－3－カルビノールを生
じるその誘導体を含む。インドール－3－カルビノールは、がんに対する防御効果がある
と考えられており、前がん状態に対しても予防的である可能性がある。

30

【0279】

【00390】ある特定の実施形態では、本明細書で開示される抗体または抗原結合断片は
、インドール－3－カルビノールまたは消化後にインドール－3－カルビノールを生じる
その誘導体と組み合わせて投与してもよい。ある特定の実施形態では、そのような組合せ
は、グレムリン関連疾患を処置するのに有用である。ある特定の実施形態では、そのよう
な組合せは、がん、例えば、乳がん、肝細胞癌、および結腸直腸がんを処置するのに有用
である。ある特定の実施形態では、そのような組合せは、乳がん、例えば、トリプルネガ
ティブ乳がんを処置するのに有用である。

40

【0280】

【00391】i i) 非がん性疾患に対する組合せ処置

【00392】一部の実施形態では、第2の治療薬は、非がん疾患（例えば、線維症）また
はがんに関連する少なくとも1つの合併症を管理するまたは処置するために投与してもよ
い。

【0281】

【00393】一部の実施形態では、第2の治療薬は、ピルフェニドンなどの抗線維症薬、
抗炎症薬、NSAID、プレドニゾンなどのコルチコステロイド、栄養補助剤、血管内皮
成長因子（VEGF）アンタゴニスト〔例えば、米国特許第7,087,411号に記載

50

されるアフリベルセプトなどの「VEGFトラップ」もしくは他のVEGF阻害融合タンパク質、または抗VEGF抗体もしくはその抗原結合断片（例えば、ベバシズマブ、またはラニズマブ）]、IL-1、IL-6、IL-13、IL-4、IL-17、IL-25、IL-33またはTGF- β などのサイトカインに対する抗体、および線維症関連状態またはがんに関連する少なくとも1つの症状を改善するのに有用な任意の他の緩和ケアである。ある特定の実施形態では、第2の治療薬は、抗インテグリンインヒビターである。

【0282】

【00394】別の態様では、本開示は、本明細書で提供されるGREM1アンタゴニストおよび第2の治療薬を含むキットまたは医薬組成物を提供し、このアンタゴニストと治療薬は1つの組成物で、または異なる組成物で処方してもよい。併用療法をどのように実行すべきかに関する情報を提供するために、使用または効能についての説明書をさらに含むことができる。

10

【0283】

【00395】ある特定の実施形態では、がん患者のための食事補助剤は、がんに対する防御効果がある適切な栄養補助剤が可能である。ある特定の実施形態では、食事補助剤は、インドール-3-カルビノールを含むまたは消化後にインドール-3-カルビノールを生じるその誘導体を含む。インドール-3-カルビノールは、がんに対する防御効果があると考えられており、前がん状態に対しても予防的である可能性がある。

【0284】

20

【00396】ある特定の実施形態では、本明細書で開示される抗体または抗原結合断片は、インドール-3-カルビノールまたは消化後にインドール-3-カルビノールを生じるその誘導体と組み合わせて投与してもよい。ある特定の実施形態では、そのような組合せは、グレムリン関連疾患を処置するのに有用である。ある特定の実施形態では、そのような組合せは、がん、例えば、乳がん、肝細胞癌、および結腸直腸がんを処置するのに有用である。ある特定の実施形態では、そのような組合せは、乳がん、例えば、トリプルネガティブ乳がんを処置するのに有用である。

【0285】

【00397】投与経路および投与計画

【00398】本明細書で提供されるGREM1アンタゴニストは、治療有効投薬量で投与してよい。本明細書で提供される抗体または抗原結合断片の治療有効量は、例えば、対象の体重、年齢、過去の病歴、現在の薬物療法、健康状態、ならびに交差反応、アレルギー、感受性および有害副作用の可能性、ならびに投与経路および疾患発症の程度などの、当技術分野で公知の種々の要因に依存する。投薬量は、これらのおよび他の事情または要件により示されるのに比例して、当業者（例えば、医師または獣医師）が減らすまたは増やしてもよい。

30

【0286】

【00399】ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるGREM1アンタゴニスト（例えば、抗体または抗原結合断片）は、約0.01mg/kg～約100mg/kgの治療有効投薬量で投与してよい。ある特定の実施形態では、投与用量は、処置の間に変わってよい。ある特定の実施形態では、投与用量は、対象の反応に応じて、処置の間に変動してよい。

40

【0287】

【00400】投与計画は、最適な望ましい応答（例えば、治療応答）を提供するように調整してよい。例えば、単一用量を投与してもよいし、または数回の分割用量を時間をかけて投与してもよい。

【0288】

【00401】本明細書で開示されるGREM1アンタゴニスト（例えば、抗体および抗原結合断片）は、例えば、非経口（例えば、皮下、腹腔内、点滴静注をふくむ静脈内、筋肉内、または皮内注射）または非経口ではない（例えば、経口、鼻腔内、眼球内、舌下、直

50

腸、または局所) 経路などの当技術分野で公知のいかなる経路によって投与捨ててもよい。

【0289】

[00402] 検出および／または診断の方法

[00403] A R 発現またはシグナル伝達決定

[00404] 一態様では、本開示は、がんを有するまたはがんを有すると疑われる対象において G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性を決定する方法であって、(a) 対象由来の生体試料においてアンドロゲン受容体 (A R) 発現またはシグナル伝達を検出するステップ、および (b) ステップ (a) で検出される A R 発現またはシグナル伝達に基づいて応答性の可能性を決定するステップを含む方法を提供する。

【0290】

[00405] 本開示で使用される場合、用語「可能性」および「見込みがある」は、治療応答がどれくらい確実に起こることになるかのパーセントでの見込みを意味する。一部の実施形態では、「応答する見込みがある」と同定された疾患または状態 (例えば、がん) を有する対象とは、本明細書で提供される G R E M 1 アンタゴニストでの処置に応答する 30 % を超える見込み、40 % を超える見込み、50 % を超える見込み、60 % を超える見込み、70 % を超える見込み、80 % を超える見込み、90 % を超える見込みを有する疾患または状態を抱えた対象のことである。

【0291】

[00406] 患者では、有益な応答は、検出可能な腫瘍の消失 (完全奏功)、腫瘍サイズおよび／もしくは腫瘍細胞数の減少 (部分奏功)、腫瘍成長停止 (安定している疾患)、抗腫瘍免疫応答の増強、おそらく腫瘍の後退もしくは排除をもたらす；腫瘍に関連する 1 つもしくは複数の症状のある程度の軽減；処置に続く生存の長さの増加；ならびに／または処置に続く所与の時点での死亡率の減少を含むいくつかの臨床パラメータの点から表すことができる。

【0292】

[00407] A R 発現は、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して検出することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、生体試料を、生体試料中の A R 発現の存在またはレベルを検出することができる薬剤と接触させるステップを含む。A R 発現の検出は、A R 発現の存在または非存在に基づくことができ、A R 発現の非存在は、試料が A R について陰性であることを示す。

【0293】

[00408] A R シグナル伝達は、限定せずに、P S A などの A R 感受性遺伝子産物を測定することによりを含む、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して検出するまたは決定することができる。A R 感受性遺伝子産物のレベルは決定し参照レベルと比較することができ、参照レベルよりも有意に低い検出レベルは減少した A R シグナル伝達を示す。A R シグナル伝達についての参照レベルは、比較可能な対象での A R シグナル伝達の参照レベルを有すると決定されている 1 つまたは複数の参照試料 (例えば、データベースから得られる試料) から得ることができ、この参照レベルは、1 つまたは複数の参照試料由来のデータ、標準、またはレベルのコレクションを含む。一部の実施形態では、データ、標準またはレベルのそのようなコレクションは正規化される。

【0294】

[00409] 減少した A R シグナル伝達は、アンドロゲン除去療法を用いた処置、または A R 中に不活性化変異の存在に基づいて決定することもできる。D N A または R N A レベルでの A R の変異状態または発現レベルは、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定せずに、増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、またはシーケンシングアッセイにより測定することができる。タンパク質レベルでの A R の変異状態または発現レベルは、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定せずに、免疫アッセイにより測定可能である。

【0295】

[00410] 一部の実施形態では、対象が A R 発現もしくはシグナル伝達がないと検出さ

10

20

30

40

50

れる、または参照レベルと比べて減少した A R 発現もしくはシグナル伝達を有すると検出される場合、対象は G R E M 1 アンタゴニストに対して応答性の可能性を有すると決定される。

【 0 2 9 6 】

[00411] 一部の実施形態では、対象が A R 発現もしくはシグナル伝達がないと検出される、または参照レベルと比べて減少した A R 発現もしくはシグナル伝達を有すると検出される場合、方法は、対象に G R E M 1 発現を検査するように勧めるステップをさらに含む。

【 0 2 9 7 】

[00412] 一部の実施形態では、方法は、対象由来生体試料中で G R E M 1 発現を検出するステップをさらに含む。

【 0 2 9 8 】

[00413] G R E M 1 発現は、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して検出することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、生体試料を、生体試料中の G R E M 1 発現の存在またはレベルを検出することができる薬剤と接触させるステップを含む。G R E M 1 発現の検出は、G R E M 1 発現の存在または非存在に基づくことができ、G R E M 1 発現の存在は、試料が G R E M 1 について陽性であることを示す。

【 0 2 9 9 】

[00414] 代わりに、検出は G R E M 1 発現のレベルに基づくことができ、参照レベルよりも高い検出レベルは、G R E M 1 陽性を示す。参照レベルは、1 つまたは複数の参照試料（例えば、健康な対象から、健康な組織または腫瘍患者の前がん組織さえから得られる試料）から得ることができる。G R E M 1 発現の検出は、参照試料と目的の生体試料で並行して行うことができる。参照レベルはデータベースから得ることもでき、これには1 つまたは複数の参照試料由来のデータ、標準、またはレベルのコレクションが含まれる。一部の実施形態では、データ、標準またはレベルのそのようなコレクションは正規化される。

【 0 3 0 0 】

[00415] 一部の実施形態では、G R E M 1 発現が生体試料中で検出されない場合、方法は、時間の経過後、例えば、1 ヶ月後、2 ヶ月後、3 ヶ月後、などで対象において G R E M 1 発現をモニターするステップをさらに含む。

【 0 3 0 1 】

[00416] 一部の実施形態では、対象が、G R E M 1 発現または参照レベルと比べて上昇した G R E M 1 発現を有すると検出された場合、対象は G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性を有すると決定される。

【 0 3 0 2 】

[00417] 別の態様では、本開示は、A R 発現がないと決定されたまたは減少したアンドロゲン受容体（A R）シグナル伝達を有すると決定された試料中で G R E M 1 の存在または量を検出する方法であって、試料を G R E M 1 の検出用の検出試薬と接触させるステップ、および試料中の G R E M 1 の存在または量を決定するステップを含む方法を提供する。

【 0 3 0 3 】

[00418] 一部の実施形態では、試料は、本明細書で開示されるように、がんを有するまたはがんを有すると疑われる対象から得られる。

【 0 3 0 4 】

[00419] 一部の実施形態では、方法は、治療有効量の G R E M 1 アンタゴニスト（例えば、本明細書で提供される抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合断片のいずれか）を G R E M 1 アンタゴニストに対する応答性の可能性を有すると決定された対象に投与するステップをさらに含む。

【 0 3 0 5 】

10

20

30

40

50

【00420】PTEN / p53 検出

【00421】別の態様では、本開示は、疾患または状態を有するまたはこれを有すると疑われる対象においてGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性を決定する方法であって、(a) 対象由来の生体試料においてPTENおよび／またはp53の欠損を検出するステップ、ならびに(b) ステップ(a) で検出されたPTENおよび／またはp53の欠損に基づいて応答性の可能性を決定するステップを含む方法を提供する。

【0306】

【00422】PTENおよび／またはp53の活性またはレベルが欠損すると、正常な機能がないもしくは正常な機能より劣るPTENおよび／もしくはp53が生じる、または生体試料中で機能的PTENおよび／もしくはp53が存在しなくなるもしくは発現レベルが減少することがある。

10

【0307】

【00423】一部の実施形態では、方法は、当技術分野で公知の任意の適切な方法、例えば、限定せずに、増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、シーケンシングアッセイ、または免疫アッセイを使用して機能的PTENおよび／またはp53の発現レベルを検出するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、生体試料を、生体試料中の機能的PTENおよび／またはp53の存在またはレベルを検出することができる薬剤と接触させるステップを含む。機能的PTENおよび／またはp53発現の検出は、機能的PTENおよび／またはp53の存在もしくは非存在またはそのレベルに基づくことが可能であり、機能的PTENおよび／またはp53の非存在または減少したレベルは、試料がPTENおよび／またはp53の活性またはレベルを欠損していることを示す。一部の実施形態では、方法は、例えば、DNAまたはRNAレベルでのPTENおよび／またはp53の変異状態を検出するステップをさらに含む。

20

【0308】

【00424】一部の実施形態では、対象がPTENおよび／またはp53を欠損していると検出される場合は、対象はGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性を有すると決定される。

【0309】

【00425】一部の実施形態では、方法は、対象がPTENおよび／またはp53を欠損していると検出される場合は、対象にGREM1発現を検査するように勧めるステップをさらに含む。

30

【0310】

【00426】一部の実施形態では、方法は、対象由来の生体試料においてGREM1発現を検出するステップをさらに含む。同様に、GREM1発現は、上記のいずれかの類似する方法を使用して検出し決定することが可能である。

【0311】

【00427】一部の実施形態では、対象がGREM1発現を有すると検出される場合、対象はGREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性を有すると決定される。

【0312】

【00428】一部の実施形態では、生体試料においてGREM1発現が検出されない場合、方法は、時間の経過後、例えば、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、などで対象においてGREM1発現をモニターするステップをさらに含む。

40

【0313】

【00429】一態様では、本開示は、PTENおよび／またはp53を欠損していると決定された試料においてGREM1の存在または量を検出する方法であって、試料をGREM1の検出用の検出試薬と接触させステップ、および試料中のGREM1の存在または量を決定するステップを含む方法を提供する。

【0314】

【00430】一部の実施形態では、本明細書で開示されるように、試料は、GREM1関連疾患または状態を有するまたは有すると疑われる対象から得られる。

50

【0315】

【00431】一部の実施形態では、方法は、治療有効量のGREM1アンタゴニスト（例えば、本明細書で提供される抗GREM1抗体またはその抗原結合断片のいずれか）を、GREM1アンタゴニストに対する応答性の可能性を有すると決定された対象に投与するステップをさらに含む。

【0316】

【00432】生体試料

【00433】バイオマーカー（例えば、AR、PTEN、p53、および／またはGREM1）の存在および／または発現レベルおよび／または変異状態は、対象から得られる適切な生体試料を使用して決定することができる。

10

【0317】

【00434】一部の実施形態では、生体試料は、がん細胞を含有するまたはこれを含有すると疑われている。一部の実施形態では、生体試料はがん微小環境から得られる。一部の実施形態では、生体試料は、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織、新鮮な生検、血液（循環している腫瘍細胞を含有すると疑われている）、または他の体液として、対象から得られるまたはこれに由来することが可能である。一部の実施形態では、がん細胞、間質細胞および／または細胞外基質は生体試料から単離してよい。ある特定の実施形態では、生体試料は、例えば、核酸またはタンパク質などの分析物を単離するためにさらに加工してよい。

【0318】

【00435】ある特定の実施形態では、生体試料は、がん細胞、間質細胞、間質または線維性細胞を含む。

20

【0319】

【00436】検出および／または決定

【00437】本明細書で使用される場合、用語「決定する」、「測定する」および「検出する」は互換的に使用可能であり、定量的と半定量的決定の両方のことである。

【0320】

【00438】本明細書で提供されるバイオマーカーAR、PTEN、p53、および／またはGREM1は、mRNA、タンパク質およびDNA（例えば、ゲノムDNA）も含む異なる形態を包含することが意図されている。したがって、これらのバイオマーカーのレベルおよび／または活性は、それぞれのバイオマーカーのRNA（例えば、mRNA）、タンパク質またはDNA（例えば、ゲノムDNA）を用いて測定することができる。同様に、バイオマーカーの変異状態も、DNA（例えば、ゲノムDNA）、RNA（例えば、mRNA）、またはタンパク質（例えば、変異遺伝子によりコードされた変異タンパク質産物について測定することにより）を用いて測定可能である。

30

【0321】

【00439】DNAまたはRNAレベルでのバイオマーカーの発現レベルは、限定せずに、RNAシーケンシング（RNA-seq）およびRNAスコープ（Wang、Z.、Gerstein、M.、& Snyder、M.（2009）. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics、10（1）、57～63頁；Wangら、RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues、J Mol Diagn. 2012年 Jan；14（1）：22～9頁）を含む技法を使用して、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定せずに、増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、またはシーケンシングアッセイにより測定可能である。タンパク質レベルでのバイオマーカーの発現レベルは、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定せずに、免疫アッセイ（例えば、ウェスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、酵素免疫アッセイ（EIA）、放射免疫アッセイ（RIA）、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、免疫蛍光染色およびイ

40

50

メージング、免疫組織化学（IHC）、ならびに蛍光活性化セルソーティング（FACS）により測定可能である。

【0322】

【00440】DNAまたはRNAレベルでのバイオマーカーの変異状態は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定せずに、増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、またはシーケンシングアッセイにより測定可能である。タンパク質レベルでのバイオマーカーの変異状態は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定せずに、免疫アッセイにより測定可能である。

【0323】

【00441】バイオマーカーの活性レベルは、当技術分野で公知の適切な機能アッセイにより測定可能である。

【0324】

【00442】これらの方法は当技術分野で周知であり、模範的な例として下で詳細に説明される。

【0325】

【00443】i. 増幅アッセイ

【00444】核酸増幅アッセイは、標的核酸（例えば、DNAまたはRNA）をコピーし、それによって増幅される核酸配列のコピー数を増やすステップを含む。増幅は指数関数的でも線形でもよい。模範的な核酸増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」、米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,202号参照；PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications（Innisら編、1990年））、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）；TaqMan（登録商標）などの定量的PCR、ネステッドPCR、リガーゼ連鎖反応（Abravaya, K.ら、Nucleic Acids Research、23:675～682頁、（1995）参照）、分岐DNAシグナル増幅（Urdea、M. S.ら、AIDS、7（suppl 2）:S11～S14、（1993）参照）、増幅可能RNAレポーター、Q-ベータ複製（Lizardiら、Biotechnology（1988）6:1197頁参照）、転写ベースの増幅（Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1989）86:1173～1177頁参照）、ブーメランDNA増幅、鎖置換活性化、サイクリングプローブ技術、自家持続配列複製（Guatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1990）87:1874～1878頁）、ローリングサークル複製（米国特許第5,854,033号）、等温核酸配列ベースの増幅（NASBA）、および遺伝子発現の逐次分析（SAGE）を使用する増幅を含むがこれらに限定されない。

【0326】

【00445】ハイブリダイゼーションアッセイ

【00446】核酸ハイブリダイゼーションアッセイは、標的核酸にハイブリダイズするプローブを使用し、それによって標的核酸の検出が可能になる。ハイブリダイゼーションアッセイの非限定的例は、ノーザンブロットング、サザンブロットング、インサイツハイブリダイゼーション、マイクロアレイ分析、およびマルチプレックスハイブリダイゼーションベースのアッセイを含む。

【0327】

【00447】ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションアッセイ用のプローブは、検出可能的に標識化されている。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションアッセイ用の核酸ベースのプローブは標識化されていない。そのような非標識化プローブは、マイクロアレイなどの固体支持体上に固定化することができ、検出可能的に標識化されている標的核酸分子にハイブリダイズすることができる。

【0328】

【00448】一部の実施形態では、ハイブリダイゼーションアッセイは、マイクロアレイ

10

20

30

40

50

上で実施可能である。

【0329】

[00449]シーケンシング法

[00450]シーケンシング法により標的核酸の核酸配列を決定することができ、配列決定された標的核酸の数え上げも可能になり、それによって標的核酸のレベルが測定される。シーケンシング法の例は、限定せずに、RNAシーケンシング、パイロシーケンシング、およびハイスループットシーケンシングを含む。

【0330】

[00451]ハイスループットシーケンシングは、合成によるシーケンシング (sequencing-by-synthesis)、ライゲーションによるシーケンシング (sequencing-by-ligation)、およびウルトラディープシーケンシング (Marguilesら、Nature 437 (7057) : 376~80頁 (2005) に記載されているなどの) を含む。合成によるシーケンシングは、フォールドバックPCRおよびアンカードプライマーを使用して固体表面 (またはマイクロアレイまたはチップ) 上で実施する。標的核酸断片は、アンカードプライマー、および増幅されたブリッジへのハイブリダイズにより固体表面に結合させることが可能である。この技術は、例えば、Illumina (登録商標) シーケンシングプラットフォームで使用される。

【0331】

[00452]ある特定の実施形態では、本明細書に記載される目的のバイオマーカーの変異および／または野生型状態の検出ならびにそのレベルの測定は、全トランスクリプトームシーケンシング、またはRNAシーケンシング (例えば、RNA-Seq) による。手短に言えば、RNA-Seqは、標的mRNAをcDNAに逆転写するステップ、cDNAを断片化しシーケンシングするステップ、およびmRNA定量化のために配列データを分析するステップを含み；RNAスコープは標的mRNAを蛍光プローブをコンジュゲートされた1つまたは複数のオリゴヌクレオチドとインサイツハイブリダイズするステップおよび蛍光強度を測定することによりmRNAのレベルを検出するステップを含む。

【0332】

[00453]免疫アッセイ

[00454]免疫アッセイは典型的には、バイオマーカーポリペプチドまたはタンパク質 (例えば、本明細書で提供されるATM、ATR、MDM2、および／またはp53タンパク質) に特異的に結合する抗体を使用して標的ポリペプチドまたはタンパク質の存在またはレベルを検出するまたは測定するステップを含む。そのような抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して得ることができる (例えば、Huseら、Science (1989) 246 : 1275~1281頁；Wardら、Nature (1989) 341 : 544~546頁参照)、または商業的供給源から得ることができる。免疫アッセイの例は、限定せずに、ウェスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、酵素免疫アッセイ (EIA)、放射免疫アッセイ (RIA)、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、免疫蛍光染色およびイメージング、免疫組織化学 (IHC)、ならびに蛍光活性化セルソーティング (FACS) を含む。免疫学および免疫アッセイ手順の概説では、基礎的および臨床的免疫学 (Stites & Terr編、第7版、1991年) を参照のこと。さらに、免疫アッセイは、いくつかの構成のいずれかで実施可能であり、これらの構成は酵素免疫アッセイ (Maggio、編、1980年) ; およびHarlow & Lane (上記参照) で広範に概説されている。一般的免疫アッセイの概説では、Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology、37巻 (Asai編、1993年) ; Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr編、第7版、1991年) も参照のこと。

【0333】

[00455]ある特定の実施形態では、本開示の方法は、AR、PTEN、p53および／またはGREM1の発現レベルまたは遺伝子コピーを測定するステップを含む。p53

の活性は、p 5 3 の 1 5 位のアミノ酸残基のリン酸化を検出することにより、または p 5 3 の下流標的遺伝子の発現レベルの変化を検出することにより測定可能である。複数の生物活性を発揮するタンパク質の能力のせいで、いくつかの受け入れ可能なバイオアッセイが特定のタンパク質に対して存在しうる。AR、PTEN、p 5 3 および／または GRE M 1 の活性を測定するための模範的機能アッセイは、Lee J-H ら、J Biol Chem、288:12840~12851 頁(2013)、Loughery J ら、Nucleic Acids Research、42:7666~7680 頁(2014)、Thompson T ら、Journal Biological Chemistry、279:53015~53022 頁(2004)、Wienken, M. ら、J. Mol. Cell Biol. 2017 年; 9 (1): 74~80 頁に見出せる。

10

【0334】

【00456】ある特定の実施形態では、それぞれ AR、PTEN および／または p 5 3 遺伝子産物の参照レベルと比べて AR、PTEN および／または p 5 3 遺伝子産物の発現レベルの減少（例えば、少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、または 95 % 減少）は、生体試料中の AR、PTEN および／または p 5 3 の活性またはレベルの欠損を示している。

【0335】

【00457】ある特定の実施形態では、AR、PTEN および／または p 5 3 の発現レベルは内部対照値にまたは標準曲線に対して正規化することができる。例えば、本明細書に記載される、AR、PTEN および／または p 5 3 のそれぞれのレベルは、標準マーカーについての標準レベルに対して正規化することができる。標準マーカーの標準レベルは、前もって決める、同時に決める、または試料を対象から得た後で決めることが可能である。標準マーカーは同じアッセイで実行することができるまたは以前のアッセイからの既知の標準マーカーで可能である。PTEN および／または p 5 3 のレベルがシーケンシングアッセイ（RNA シーケンシングなどの）により決定される場合、バイオマーカーのレベルは、シーケンシングの総読取りデータに対して正規化することができる。

20

【0336】

【00458】ある特定の実施形態では、AR、PTEN および／または p 5 3 の RNA または DNA レベルを測定するつもりであれば、方法は、試料から核酸を単離するステップをさらに含む。フェノールとクロロホルム抽出、および、例えば、Ausubel ら、Current Protocols of Molecular Biology (1997) John Wiley & Sons、ならびに Sambrook および Russell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 3 版(2001)に記載される種々の他の方法などの、様々な抽出方法が、細胞または組織から DNA または RNA を単離するのに適している。

30

【0337】

【00459】NucliSens 抽出キット (Biomerieux、Marcy l'Étoile、France)、QIAamp (商標) ミニ血液キット、Agencourt Genfind (商標)、Rneasy (登録商標) ミニカラム (Qiagen)、PureLink (登録商標) RNA ミニキット (Thermo Fisher Scientific)、および Eppendorf Phase Lock Gels (商標) を含む市販のキットも RNA を単離するのに使用できる。当業者であれば、製造業者のプロトコルに従って RNA または DNA を容易に抽出または単離することができる。

40

【0338】

【00460】キット

【00461】別の態様では、本開示は、本明細書に記載される方法において使用するためのキットをさらに提供する。

【0339】

【00462】一実施形態では、キットは、PTEN／p 5 3 中の 1 つもしくは複数の不活

50

性化変異の存在もしくは非存在を検出するための第1の試薬、もしくは第1の試薬のセット；またはPTEN／p53の発現レベルを測定するための1つもしくは複数の試薬を含む。一実施形態では、キットは、GREM1の存在もしくは非存在または発現レベルを検出するための第2の試薬をさらに含む。

【0340】

【00463】一実施形態では、キットは、ARの不活性化変異の発現レベルまたはこの存在もしくは非存在を測定するための第1の試薬を含む。一実施形態では、キットは、GREM1の存在もしくは非存在または発現レベルを検出するための第2の試薬をさらに含む。

【0341】

【00464】ある特定の実施形態では、第1の試薬は、PTENまたはp53またはARに対する1つもしくは複数のプライマー、1つもしくは複数のプローブ、および／または1つもしくは複数の抗体を含む。ある特定の実施形態では、第2の試薬は、GREM1に対する1つもしくは複数のプライマー、1つもしくは複数のプローブ、および／または1つもしくは複数の抗体を含む。プライマー、プローブ、および／または抗体は、検出可能に標識化されていてもされていなくてもよい。

【0342】

【00465】ある特定の実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法を実施するための他の試薬をさらに含んでよい。そのような適用では、キットは、以下の：適切なバッファー、核酸を単離するための試薬、核酸を増幅するための試薬（例えば、ポリメラーゼ、dNTP混合液）、核酸をハイブリダイズするための試薬、核酸をシーケンシングするための試薬、核酸を定量化するための試薬（例えば、挿入剤、検出プローブ）、タンパク質を単離するための試薬、およびタンパク質を検出するための試薬（例えば、二次抗体）のいずれかまたはすべてを含んでよい。典型的には、本明細書で提供される方法のいずれかで有用である試薬は、キャリアまたは複室容器に含有される。キャリアは、例えば、バッグ、箱、チューブ、ラックの形態の容器または担体が可能であり、任意選択で、仕切られている。

【0343】

【00466】ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書で提供される診断方法において使用するための診断試薬の製造における、任意選択で第2の試薬と一緒に、本明細書で提供される第1の試薬の使用を提供する。

【0344】

【00467】一部の実施形態では、本開示は、対象においてGREM1発現がんを処置するまたは診断するための薬品の製造でのGREM1アンタゴニスト（例えば、本明細書で提供される抗体またはその抗原結合断片）の使用も提供し、GREM1関連疾患または状態はPTENおよび／またはp53の欠損であると決定されている。

【0345】

【00468】一部の実施形態では、本開示は、対象においてGREM1関連疾患または状態を処置するまたは診断するための薬品の製造でのGREM1アンタゴニスト（例えば、本明細書で提供される抗体またはその抗原結合断片）の使用も提供し、GREM1関連疾患または状態はPTENおよび／またはp53の欠損であると決定されている。

【実施例】

【0346】

【0001】本開示は、特定の実施形態（その一部は好ましい実施形態である）を参照して特に示され記載されてきたが、本明細書で開示される本開示の精神および範囲から逸脱することなくそこに形態および詳細の様々な変化を加えてもよいことは当業者であれば理解すべきである。

【0347】

実施例1：前立腺がん（PCa）中のグレムリン1の上方調節は去勢抵抗性の発現および不十分な疾患転帰と強く関連している

10

20

30

40

50

[0002]分泌されたタンパク質は、抗がん薬開発にとり重要な潜在的治療標的のグループである。去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）において特異的に上方調節された分泌タンパク質をスクリーニングするため、本発明者らは、公表されているRNAシーケンシングデータセットでデータマイニングを実施した。グレムリン1の発現は、ホルモン抵抗性PCaで分泌タンパク質をコードする差示的に発現される遺伝子のトップに位置付けられた（Best, C. J. ら、Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. Clin Cancer Res 11、6823～6834頁（2005））。他のPCaデータセットに関する追加の解析により、グレムリン1発現レベルは、原発PCaよりも進行性転移性CRPCにおいて、またはホルモンナイーブPCaと比べてホルモン抵抗性PCaにおいて有意に増加したことが示唆された（Yu, Y. P. ら、Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. J Clin Oncol 22、2790～2799頁（2004）；Best, C. J. ら、Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. Clin Cancer Res 11、6823～6834頁（2005）からのシーケンシングデータに基づいて）。重要なことに、GREM1の増幅は、前立腺腺癌に関するデータ解析に基づいて、短くなった無病／無増悪生存と関連していた（TCGA、Firehose Legacy）。次に、本発明者らは、上海交通大学医学院附属仁濟医院において139人のヒトPCa患者の大きなコホートでグレムリン1免疫組織化学（IHC）染色を実施した。139の患者検体のうち、60試料は去勢抵抗性前立腺腫瘍患者から得た。IHC結果の定量的研究により、ホルモン感受性PCa（HSPC）よりもCRPC試料においてグレムリン1の有意に増強された染色強度が示された（図1A、1B）。PCaでさらに高いグレムリン1発現を有する患者は、顕著により短い全生存を有していた（図1H）。SU2C 2019 PCaデータセットのシーケンシングデータに基づけば（A Robinsonら、Cell 161（5）、1215～1228頁（2015））、それによりGREM1の転写が上昇している患者はもっと短い全生存を示すことも明らかにされた。まとめると、グレムリン1はCRPCにおいて上方調節されており、不十分な疾患転帰と強く相関している。

10

20

30

【0348】

実施例2：GREM1の転写はARにより抑制されておりADT後に増加する

[0003]ARはPCaにおいて中心的役割を果たしている。グレムリン1とARシグナル伝達の間の関係性を評価するため、本発明者らは、CRPC検体の切片でグレムリン1およびARの古典的下流標的であるPSAについてさらなるIHC染色を実施した。統計解析によれば、グレムリン1発現は、PSAの染色強度が低いCRPCにおいて明らかに上方調節されておることが明らかになった（図1C）。さらに、本発明者らは、無傷のマウスにおける異種移植片から生じた対照LNCaP細胞株と比べて、去勢マウスに移植された異種移植片LNCaP腫瘍に由来する去勢抵抗性LNCaP細胞株（LNCaP Rと呼ばれる）でGREM1の有意な増加を検出した（図2A）。次に、本発明者らは、GREM1の発現がARシグナル伝達により調節されるのかどうかを調べた。AR発現レンチウイルスまたはCRI SPR／Cas9法を利用して、AR上方調節を達成し（図2B）またはLNCaP PCa細胞株でノックアウトした（図2D）。免疫プロットティングおよびq-PCR実験を合わせると、ARがGREM1の転写を抑制することが示された（図2B～2E）。この結論は、ARアゴニストであるR1881およびアンタゴニストであるエンザルタミド処置実験により支持された（図1D、1E）。

40

【0349】

[0004]さらに、本発明者らはルシフェラーゼレポーターアッセイを実行した。GREM1プロモーター駆動ルシフェラーゼ活性は、R1881の処置により大きく阻害され、

50

エンザルタミドの添加により増強された（図1F）。ChIP実験結果により、ARがGREM1のプロモーター領域に結合することがさらに示唆された（図1G）。これらの結果を合わせると、GREM1がCRPCでは上昇しており、ARにより負の調節を受けていることが実証された。

【0350】

実施例3：GREM1はアンドロゲン除去するとPCa細胞増殖および腫瘍成長を促進する

[0005]転移性前立腺がんは悲惨な疾患であり、アンドロゲン受容体アンタゴニストまたは化学療法を用いた連続処置により大半のがんが進行する。これらの処置に抵抗性である重要な細胞型の1つが、浮遊培養で腫瘍球体を形成する能力を有する幹細胞用の特性を有する細胞である。CRPCの進行でのGREM1の役割を調べるため、本発明者らは、AR非依存性CRPC細胞株PC3、ならびにAR依存性PCa細胞株LNCaPおよびLAPC4を利用した。GREM1発現を喪失したまたは獲得した細胞垂系を作製した（図3A、4Aおよび5A）。PC3でのGREM1ノックダウンにより球体形成能力、細胞成長および生存が抑制され、GREM1過剰発現または培養培地で100ng/mlのGREM1タンパク質の添加により、対応する対照垂系よりも球体形成および細胞増殖が有意に上昇した（図3B、3C、3Dおよび4B）。さらに、GREM1のノックダウンによりインビボでのPC3腫瘍成長が著しく抑制され、限界希釈アッセイではGREM1の過剰発現により腫瘍成長および腫瘍形成発生率が増強されることを見出した（図3E、3F）。

10

20

【0351】

[0006]さらに、PCaについて遺伝子操作されたマウスモデル（GEMM）であるHi-Mycマウスから生み出されたPCaオルガノイドでのGREM1の外因性発現によりアンドロゲン除去条件でオルガノイド成長が促進される（図3Gおよび3H）。GREM1ノックダウンは、AR依存性LNCaPおよびLAPC4細胞へのエンザルタミドの阻害効果を大いに増強し、GREM1過剰発現またはGREM1タンパク質の添加によりLNCaPおよびLAPC4細胞でのエンザルタミド処置に対して応答が損なわれた（図4A～4Dおよび5A～5D）。それらのデータを合わせると、PCaおよび去勢抵抗性の発現でのGREM1の腫瘍促進的役割が示唆された。

30

【0352】

実施例4：PCaでのGREM1の発癌作用はFGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の活性化に依存している

[0007]GREM1の発癌作用の根底にある機序に取り組むため、本発明者らは、RNAシーケンシングを実施して、GREM1過剰発現LNCaP垂系とその対照細胞の間の転写の違いを比較した。図6Aに最も有意に差次的な発現遺伝子セットを収載した。FGFRおよびMAPKシグナル伝達が上方調節されたシグナル伝達経路中トップのヒットであった。さらなる遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）により、FGFR1によるシグナル伝達のエンリッチメントおよびGREM1発現レンチウイルスをトランスフェクトされたLNCaP細胞でのMARK活性の活性化が示された（図6B）。さらに、GREM1の上方調節（図2A）に加えて、本発明者らは、MARKとFGFR1が両方とも、ホルモンナীবLNCaP細胞と比べて去勢抵抗性LNCaP細胞で活性化されていることを見出した（図7A）。これは、FGFシグナル活性化がCRPCのAR非依存性成長に必要とされるという最近の知見に照らして特に関連性がある。

40

【0353】

[0008]グレムリン1がFGFR-MAPKシグナル伝達を促進したかどうかを調べるため、まずCRPC患者において4つのFGFRの発現レベルの分析を実施した。SU2C CRPCコホートのシーケンシングデータに基づいて（Robinsonら、Cell 161（5）、1215～1228頁（2015））、CRPCではFGFR1が最も豊富に発現されたFGFRであった。したがって、本発明者らは、GREM1処置に続いて主にFGFR1活性化を調べた。LNCaPおよびPC3をGREM1を用いて異な

50

る濃度（1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml）で処置し、FGFR1、MEKおよびERKのリン酸化レベルを調べた。既知のFGFR1リガンドであるFGF1を正の対照として使用した。図6Cで示されるように、GREM1処置によりp-FGFR1、p-MEK1/2およびp-ERK1/2は用量依存的に増加した。BMP4を添加してもGREM1刺激に続いてFGFR1、MEK1/2およびERK1/2のリン酸化レベルは変更されなかったため、GREM1によるFGFR1-MAPK軸の活性化はBMPに非依存性であることがさらに明らかになった（図6D）。興味深いことに、GREM1はFGF1よりもMARKシグナル伝達の延長された活性化を誘導することを見出した。GREM1処置に応答してのMARKの活性化は、GREM1を添加した後最長1時間まで高レベルで維持され、MARKシグナル伝達はFGF1刺激から10分で最も高度に活性化され、その後急速に減少した（図6E、6F）。さらに、GREM1の外因性発現により、Hi-mycマウスPcaモデル由来のPcaオルガノイドにおいてMAPK/FGFR1シグナル伝達軸が活性化された（図7B）。

10

【0354】

【0009】MAPKシグナル伝達は、FGFRの他にも多くの膜受容体を通じて活性化することができる。GREM1によるMAPK経路の活性化はFGFRを介してなのかどうかを調べるため、本発明者らは、CRISPR/Cas9法によりFGFR1ノックアウトLNCaP垂系を構築した。図6Gに示されるように、GREM1の処置によるERK1/2およびMEK1/2のリン酸化は、FGFR1ノックアウトにより抑止することができる。さらに、Pca細胞成長および球体形成に対するGREM1媒介促進効果は、FGFR1のノックアウトにより無効にすることができる（図8A～8E）。GREM1の腫瘍促進効果がFGFRを通じてなのかどうかをさらに調べるため、FGFRまたはEGFRの小分子インヒビターを利用した。GREM1によるMAPK/FGFR1シグナル伝達軸の活性化は、FGFR1インヒビターであるBGJ398により減弱させることができるが、EGFRインヒビターであるエルロチニブではできない（図6H、6I）。さらに、図8A、Bで示されるように、GREM1のPca増殖および球体形成促進の役割は、FGFRインヒビターであるBGJ398またはMEKインヒビターであるトラメチニブを用いた処置により有意に損なわれたが、BMP4の添加による影響は受けなかった。これらの結果は、グレムリン1（Gremlin1）の発癌作用が、FGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の活性化に起因していることを示していた。

20

30

【0355】

実施例5：GREM1はPcaでは新規のFGFR1リガンドである

【0010】次に、GREM1によるFGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の活性化をもたらす機序を調べた。本発明者らは、表面プラズモン共鳴分析（Fortebio）を実施して、まず、GREM1がFGFR1に結合できるかどうかを評価した。図9Aに示されるように、FGFR1は、Fortebioセンサーチップ上に固定化されたGREM1に高親和性で結合した（ $KD=1.06E-08M$ ）。コンピュータシミュレーションは、GREM1がFGFR1の細胞外ドメインにダイマーとして結合することを模倣した（図9B）。FGFR1とGREM1の間の結合は、293T細胞とLNCaP細胞の両方で外因的に発現されたFlagタグ付きGREM1およびHAタグ付きFGFR1（図9C）、またはLNCaP細胞で外因性タンパク質（図9D）を使用して共免疫沈降アッセイによりさらに実証された。FGFR1とGREM1の間の直接会合は、図9Fに示されるプルダウン実験により支持された。図9Eは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）により測定した場合、グレムリン1はFGFR1に結合するがグレムリン2もDNAタンパク質ファミリーの他のメンバーもFGFR1に結合しないことをさらに示している。さらに、FGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路上でのGREM1の活性化は、過剰量の可溶性FGFR1を添加することにより減弱できた（図9G）。

40

【0356】

【0011】二分子蛍光補完（BiFC）アッセイを行ってGREM1とFGFR1の相互作用を調べた。黄色蛍光タンパク質（YFP）のコード配列の断片と融合させたGREM

50

1 および FGF R1 cDNA を 293T 細胞に個別にまたは同時にトランスフェクトした。図 9H に示されるように、YFP シグナルは、GREM1 と FGF R1 プラスミドを同時トランスフェクトした場合だけ検出することができる。それと一致して、免疫蛍光染色の共焦点顕微鏡イメージングにより、LNCaP-R 細胞の膜上でのグレムリン1 と FGF R1 の共局在が示された (図 9I)。さらに、競合 ELISA 実験により明らかになったように、可溶性 FGF R1 は、グレムリン1 と FGF R1 の間の結合をめぐって競合できた (図 9G)。グレムリン1 に起因する FGF R1 / MEK / ERK シグナル伝達経路の活性化は、過剰量の可溶性 FGF R1 を適用することにより減弱できた (図 9G)。これらのデータは、グレムリンと FGF R1 の間の特異的結合に対する強力な傍証を提供し、この結合が FGF R1 およびその下流 MAPK シグナル伝達の活性化に必要であるという考えを支持する (図 9G)。

10

【0357】

【0012】グレムリン1 / FGF R1 相互作用の様式をさらに詳しく説明するため、切断型 FGF R1 (図 9J ~ 9K) とグレムリン1 または古典的 FGF R1 リガンドである FGF1 の間で共免疫沈降を実施した。FGF R1 の細胞外領域がドメイン1 (D1)、ドメイン2 (D2) およびドメイン3 (D3) を含むことははっきり定義されてきた。D2 と D3 の間のリンカーが FGF1 と FGF R1 の間の重要な結合領域であるという以前の報告と一致して、D2 または D3 が失われると FGF1 と FGF R1 の共免疫沈降が消滅することを本発明者らは見出した。これとは対照的に、D2 を欠くだけでグレムリン1 と FGF R1 の間の会合が抑止され、グレムリン1 が D2 で FGF R1 に結合することを示唆している (図 9J ~ 9K)。さらに、FGF1 への結合ポケットにおける FGF R1 の以前同定された重要なアミノ酸残基 (C176 および R248) を変異させた (図 9P)。予想通り、FGF R1 - C176G または FGF R1 - R248Q は確かに FGF1 と FGF R1 の共免疫沈降を妨害し、これら2つの変異はグレムリン1 と FGF R1 の間の相互作用には影響しなかった (図 9P ~ 9Q)。これらのデータにより、FGF R1 が、その古典的リガンド FGF1 との結合様式とははっきり異なる様式でグレムリン1 に結合することが示された。それと一致して、Fortebio アッセイ、共免疫蛍光染色および共免疫沈降実験は合わせて、グレムリン1 を添加しても FGF1 と FGF R1 の会合と競合せず、逆もまた同じであることを実証した (図 9R ~ 9U)。したがって、グレムリン1 と FGF1 はおそらく FGF R1 の異なる部位に結合する。次に本発明者らは、公表されている RNA-seq データセットから CRPC 患者試料中のグレムリン1 および種々の FGF の発現レベルを評価した (Robinson ら、Cell 161 (5)、1215 ~ 1228 頁 (2015))。GREM1 転写物が FGF よりも高いことを本発明者らは観察した。これらのデータはまとめると、CRPC ではグレムリン1 が FGF R1 に対する主要なリガンドの役目を果たしていることを示唆していた。

20

30

【0358】

【0013】次の問題は、Gremlin1 / FGF R1 相互作用の構造基盤を読み解くことであった。本発明者らは、HDock プラットホーム (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) を使用して、グレムリン1 の以前特徴付けられたタンパク質構造 (PDB: 5AEJ) (Kisonaiter ら、Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2. Biochem J 473、1593 ~ 1604 頁 (2016)) と FGF R1 細胞外領域 (PDB: 3OJV) のドッキングを実施した (Becken ら、Plasticity in interactions of fibroblast growth factor 1 (FGF1) N terminus with FGF receptors underlies promiscuity of FGF1. J Biol Chem 287、3067 ~ 3078 頁 (2012))。図 9B に示されるように、グレムリン1 中のアミノ酸残基の2つの正電荷を帯びたクラスター (配列番号69に対して Lys66-Arg67; R92-Lys123-Lys124-Arg148-Lys150-Arg153) および FGF R1 の細胞外ドメ

40

50

イン2は、Grem1とFGFR1の間の不可欠な結合領域であると予想された。次に、図9Lおよび9Nに記載される変異誘発を実施して、タンパク質結合シミュレーションを試験した。グレムリン1上でのLys123Lys124からAla123Ala124への変異（番号付けは配列番号69に対する）またはFGFR1のE160A変異体は、グレムリン1とFGFR1の間の共免疫沈降を著しく損ねた（図9Mおよび9O）。ドッキングモジュールは、Grem1とFGFR1の間の結合ポケットでの重要なアミノ酸残基を強調している（図9V）。したがって、グレムリン1のLys123-Lys124（番号付けは配列番号69に対する）およびFGFR1の対応するGlu160は、グレムリン1／FGFR1タンパク質複合体の形成には重要なアミノ酸であった。

10

【0359】

実施例6：抗GREM1抗体はPbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} GEMMでの去勢抵抗性PCa発症を大いに阻害する

[0014] CRPCでのGREM1の上方調節および発癌作用のせいでGREM1は有望な治療標的となった。図10Oは、Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} GEMMでの処置を説明する模式図を示す。2ヶ月目で去勢されたマウスは、抗マウスグレムリン1抗体（抗mGREM1抗体）（腹腔内、10mg/kg）またはIgGを、指示通りに、2ヶ月間週3回受けた。GREM1を標的にするため、マウスGREM1に対するモノクローナル抗体を高い親和性で開発し、この抗体は本開示ではサロゲート抗体とも呼ばれる。このサロゲート抗体は、グレムリン2にもCOCOおよびDNAなどの他のBMPアンタゴニストには結合しなかった（図10A）。PCaに対する抗mGREM1抗体の効果を調べるため、本発明者らは、平均3ヶ月で自発的浸潤性PCaを発症したPbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} GEMMを利用した。Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} PCaは初めから去勢抵抗性であることは以前実証されている。本発明者らは、免疫染色により、無傷のまたは去勢Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} PCaおよび野生型前立腺試料中のGREM1の発現レベルを定量化した。図10Bに示されるように、GREM1は、野生型前立腺と比べて去勢Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} 腫瘍続いて無傷の去勢Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} 腫瘍において高度に上方調節されており、去勢Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} 腫瘍ではさらにエンリッチされていた。

20

30

【0360】

[0015] EカドヘリンおよびGREM1の共免疫染色により、グレムリンが、主として去勢Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} 腫瘍中腫瘍状上皮細胞により発現されることが示唆された（図11A）。とりわけ、Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} マウスのいくつかの主要器官でのGrem1の定量的PCR分析により、Grem1の発現が前立腺がん組織で最も高いが示され（図1I）、これによりグレムリン1はPCaに対する説得力のある治療標的となった。

【0361】

[0016] 本発明者らは、去勢Pbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} マウスに抗mGREM1抗体を塗布し、CRPC発症に対するそのインビボ効果を評価した。生後2ヶ月のPTEN^{fl/fl}；P53^{Δ/Δ} マウスを去勢し、8週間10mg/kgで週3回抗GREM1抗体または対照IgG2a処置を受けさせた（図10C）。去勢2ヶ月後、動物は分析のために殺した。図10C、10Dに示されるように、すべての対照IgG2a処置マウスは侵襲性CRPCを発症した。肉眼的腫瘍出現、腫瘍重量の顕著な抑制、および増殖性PCNA陽性細胞の有意な減少により証明されるように、抗mGREM1抗体は、PCa成長に対して重大な抑制効果を発揮した（図10E）。抗GREM1処置されたPbsn-Cre4；PTEN^{fl/fl}；Trp53^{fl/fl} マウス由来の前立腺切片のH&E染色により、主に、無傷の基底膜を有する腺管内過形成が示され、これはIgG2a注射されたマウスでの侵襲性PCa表現型とは大いに対照的であった（

40

50

図10F)。10mg/kgの投薬量では、2つの実験群間で腸、肺、肝臓、脾臓、骨髄および腎臓を含む主要器官に明白な区別も、末梢血細胞数の変更も観察されず(図11B、11C)、抗mGREM1抗体の重大な抗腫瘍効果は明白な副作用を伴うことはなかった。

【0362】

[0017]マウスにおけるCRPCに対する抗mGREM1抗体の強力な阻害効果の機序を理解するために、本発明者らは、IgG2aまたは抗mGREM1抗体処置されたマウス由来の前立腺試料でRNAシーケンシングを実行した。KEGGおよびGESA分析により、FGFRおよびMAPKシグナル伝達が抗mGREM1抗体処置された群で最も有意に変化したシグナル伝達経路であることが実証された(図10G、10H)。さらなる免疫染色および免疫ブロッティング実験により、抗mGREM1抗体を投与すると、FGFR1、MEKおよびERKリン酸化が著しく減少することが実証された(図10I、10J)。これらの結果はまとめると、FGFR1/MAPKシグナル伝達経路の阻害を通じて、抗mGREM1抗体がPbsn-Cre4;PTEN^{fl/fl};Trp53^{fl/fl}マウスでのCRPC発症を抑制することを示唆していた。

10

【0363】

実施例7:GREM1を標的にする抗体はヒトPCa細胞株において強力な抗腫瘍効果を発揮する

[0018]ヒトPCaにおいてGREM1を標的にする14E3を試験した。hGREM1に対するこの抗体の親和性および特異性はELISAにより確かめられた(図12A)。抗ヒトGREM1抗体である14E3は、LNCaPおよびPC3細胞の球体形成、増殖、および誘導アポトーシスに対して阻害効果を発揮した。この抗体は、AR依存性LNCaP細胞でのエンザルタミドの抗腫瘍効果を増強した(図12B、12C、10K、10L)。生化学的分析により、PC3とLNCaP細胞の両方での抗GREM1抗体処置によるFGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の用量依存性阻害が示された(図12D、10M)。

20

【0364】

[0019]BMPシグナル伝達が14E3の抗腫瘍効果に関与しているのかどうかを調べるため、BMPRIIをCRISP/Cas9によりノックアウトしたが、これはPCa細胞に対する14E3阻害効果を抑止せず、BMPシグナル伝達が抗GREM1抗体の独立した役割であることを示していた(図17A、17Bおよび17C)。

30

【0365】

[0020]CRPCにおけるインビボでの14E3の効果を調べるため、CRPC細胞株PC3異種移植片を保有するヌードマウスに、2週間週3回(10mg/kg体重)抗GREM1抗体またはIgG2aを腹腔内に注射した。14E3はPC3異種移植片腫瘍成長を大いに妨げた。14E3によりもたらされる腫瘍阻害は、二次腫瘍継代中のほうが明白になった(図12E、12F)。

【0366】

[0021]去勢されたPC3 CRPCモデルでの14E3の腫瘍成長阻害活性を研究した。手短に言えば、PC3細胞は、マウス当たり 1×10^6 細胞でBalb/cヌードマウス中の皮下に移植し、次にマウスは去勢手術で処置してCRPC(去勢抵抗性前立腺がん)モデルを作製した。腫瘍量が100mm³になると(20日目)、マウスは、アイソタイプ対照マウスIgG2aまたは14E3ハイブリドーマ抗体(mIgG2a)を用いて処置された。それぞれの群は8頭のマウスがいて、抗体は週2回10mg/kgで腹腔内(i.p.)に与えられた。腫瘍量は週2回キャリパー(INSIZE)を使用して2次元で測定された。図13では、グレムリン抗体14E3がPC3腫瘍の成長を減らし、腫瘍を保有するマウスの生存を延ばすことが示された。

40

【0367】

実施例8:グレムリン1に対する抗体はLNCaP PCa細胞において強い抗腫瘍効果を発揮する

50

[0022] LNCaP PCa細胞においてGREM1を標的にする14E3が試験された。図14では、14E3が、AR依存性LNCaP細胞において球体形成および増殖に対して阻害効果を発揮し、エンザルタミドの抗腫瘍効果を増強することが示された（図14A、B）。生化学的分析により、LNCaP細胞において14E3処置によるFGFR1/MEK/ERKシグナル伝達経路の用量依存性阻害が示された（図14C）。図14Dおよび10Nは、CRPCの腫瘍阻害に対する抗GREM1抗体（例えば、14E3または抗mGREM1抗体）とエンザルタミドの併用療法の相乗効果を示していた。これらのデータは、GREM1を標的にする抗体が、ヒトCRPC患者のための有望な治療アプローチとしての役目を果たすことができることを実証した。

[0368]

10

実施例9：14E3はGREM1媒介腫瘍細胞移動を阻害した

[0023]対数増殖期のPC-3細胞を収集し、細胞培養培地（10%FBSを補給されたDMEM培地）に再懸濁した。細胞は非処置または3日間、1μg/mlのグレムリンもしくは10μg/mlの14E3もしくは10μg/mlの対照mIgG2aで処置した。次に、細胞は6ウェル細胞培養プレートに10⁵細胞/ウェルで蒔いた。細胞がウェルの底の100%カバー度に到達した後、培地は無血清培地に変えた。それぞれのウェルは、200μlチップを使用して一かきで作られた。細胞の移動速度は、ImageJソフトウェアを使用してスクラッチ上の細胞成長の面積を計算することにより解析した。

[0369]

20

[0024]図15に示されるように、GREM1を添加すると前立腺がん細胞の細胞移動が加速され、14E3はそのような加速を減少させた、すなわち、GREM1媒介腫瘍細胞移動を阻害した。

[0370]

実施例10：14E3はLNCaPおよびPC3浮遊培養においてGREM1誘導EMT/幹細胞形成を阻害した

[0025]腫瘍前立腺細胞成長を調節する際のグレムリン1の役割を評価するため、本発明者らは、前立腺がん細胞LNCaPを含むアッセイにおいて本明細書で提供される抗体を試験した。この細胞株に、PSAプロモーター駆動GFP発現レンチウイルスプラスミドをトランスフェクトした。PSAは前立腺細胞の分化型マーカーとして知られており、低レベルのPSAを有する前立腺がん細胞は分化が不十分なまたは未分化前立腺がん細胞を表す。これらの細胞は通常幹細胞様の特性を有し、より侵襲性の成長特性を有する。LNCaPレポーター細胞アッセイは下で手短に説明されている。

30

[0371]

[0026]LNCaP-PSA細胞を、RPMI 1640/10%のFBS（GIBCO）、1%のP/S（完全培地）において10000/ウェルで24ウェルプレートに蒔き、37℃および5%CO₂で一晩インキュベートした。次の日、培地を取り除き、1μg/mlのヒトグレムリン（ACRO）または連続希釈した抗体と一緒にヒトグレムリンを細胞に添加した。培地は3日毎に変える。7日目、培地をウェルから取り除き、PBSで2度洗浄し、FITCチャンネルを使用してフローサイトメーター（Bechman）を実行する。図16Aに示されるように、対照ウェル（ブランク）でのPSA-低LNCaP集団のパーセンテージは約6%であり、パーセンテージはGREM1を添加するにつれ用量依存的に増加し、GREM1が前立腺がん細胞の侵襲性を促進することが示唆される。本明細書で提供されるハイブリドーマ抗体である14E3は、図16Bに示されるように、PSA-低LNCaP集団のグレムリン媒介増加を用量依存的に中和し、14E3がGREM1促進侵襲性を反転させることができることが示された。

40

[0372]

[0027]図16Cは、BMP結合ループを非BMP結合ループで置き換えても、前立腺がん細胞（LNCaP）中のPSA-^{hi}細胞集団のパーセンテージのGREM1媒介増加に影響を及ぼさないことを示していた。これにより、GREM1促進がん細胞侵襲性

50

が G R E M 1 上の B M P 結合ループに依存しないことが示唆された。

【0373】

実施例 11：ヒト C R P C 患者由来のオルガノイドの成長を抑制する上での抗 G R E M 1 抗体の効果

[0028]次に本発明者らは、抗 G R E M 1 抗体が患者由来オルガノイド (P D O) に対して抑制効果を示すのかどうかを調べた。 P D O は仁済医院において P C a 患者から新たに収集した。手短に言えば、9 人の C R P C 患者由来の腫瘍組織を手術から収集し、1 ~ 5 mm³ に切断して、H B S S で 1 度洗浄し、次に組織はコラゲナーゼ I I + 1 0 μ M の Y - 2 7 6 3 2 を使用して 3 7 ° C で 4 時間単細胞懸濁液まで消化し、続いて基本培養培地を使用して消化を中和した。その後、腫瘍組織は 1 m l の T r y p L E + 1 0 μ M の Y - 2 7 6 3 2 を使用して 3 7 ° C で 1 5 分間さらに消化し、続いて 1 0 % の F B S を有する培地を使用して中和した。こうして得られた細胞は、5 0 % のマトリゲル + 5 0 % の培地に再懸濁し、細胞懸濁液の 5 0 μ l を 9 6 ウェルプレートのそれぞれのウェルに分配した。その後、予熱 P D O 培地 (B 2 7 、 N アセチルシステイン、E G F 、ノギン、R - スポンジン 1 、 A 8 3 - 1 、 F G F 1 0 、 F G F 2 、プロスタグランジン E 2 、ニコチンアミド、S B 2 0 2 1 9 0 、 D H T および Y 2 7 6 3 2) を培養物に添加し、新鮮な培地を 2 ~ 3 日毎に添加した。図 1 8 A 、 1 8 B 、 1 8 C および 1 8 D は、1 4 E 3 が 9 つの P D O のうちの 7 つでオルガノイドの成長を様々な程度まで減少させたことを示しており、1 4 E 3 媒介腫瘍成長阻害についての潜在的機序を示し、グレムリンベースの阻害の治療可能性を指し示している。

10

20

【0374】

実施例 12：考察

[0029] P C a に対して第二世代の A D T 薬物を広く適用すると、A R 非依存性 C R P C の数は有意に増加した。この研究では、C R P C での G R E M 1 の発現は、ホルモンナイーブなまたは新たに診断された P C a と比べて異常に増加することを本発明者らは見出している。G R E M 1 は、前立腺がん進行およびアンドロゲン除去に対する耐性を促進する。それらの効果は、F G F R / M A P K シグナル伝達経路を活性化する直接 G R E M 1 - F G F R 結合を通じて達成される。G R E M 1 遮断抗体は、G E M M マウス P C a モデル、ヒト P C a 細胞株、患者由来オルガノイドおよび異種移植片において P C a の去勢抵抗性発現を効果的に阻害できる。これらの結果は合わせると、G R E M 1 / F G F R 1 / M A P K シグナル伝達軸が P C a 進行を促進することを強く支持しており、グレムリンを重要で有望な治療標的として指し示している。

30

【0375】

[0030]第二世代抗アンドロゲン薬は、A R 非依存性 C R P C についての重要なドライバーの上方調節の引き金を引くことが明らかにされている。しかし、これらのドライバーが A R シグナル伝達により調節される機序は、理解が不完全なままである。本発明者らは、G R E M 1 が C R P C 患者試料において A R シグナル伝達経路と負に相関していることを見出している。A R 活性化または過剰発現は P C a 細胞において G R E M 1 発現の強い減少をもたらす。逆に、G R E M 1 転写は、A R がロックアウトされるまたはエンザルタミドにより阻害されると著しく増加する。C H I P およびルシフェラーゼレポーターアッセイデータを合わせると、G R E M 1 の抑制が、転写抑制のための G R E M 1 プロモーター領域での A R の結合を通じて達成されることを強く支持している。これらの結果は、G R E M 1 の遺伝子発現は、C R P C の強力なドライバーとして、A R により転写的に阻害されることを示唆している。P C a での去勢抵抗性発現の機序は、2 つの大きな範疇、1) A R 増幅、変異もしくは選択的スプライシング、またはグルココルチコイド受容体 (G R) の上方調節を通じた A R シグナル伝達経路の再活性化、2) A R 非依存性腫瘍成長および細胞死の回避のための F G F 、 P R C 1 、 B C L 2 などの代替のシグナル伝達経路の活性化、に要約することができる。G R E M 1 過剰発現を有する前立腺がん細胞株では、F G F R / M A P K シグナル伝達経路が異常に活性化されていることを本発明者らは見出している。F G F シグナル活性化は A R 非依存性 C R P C の不可欠な分子シグネチャであ

40

50

り、CRPCのAR非依存性成長に必要であるという最近の知見に照らしてこれは特に関連性がある。前立腺がんの骨転移でのFGF-FGFR1シグナル軸の関連も報告されている。本研究では、GREM1がFGFR1リン酸化および活性化を濃度依存的に引き起こすことを本発明者らは見出している。グレムリンにより誘導されるFGFR1リン酸化はFGF1刺激よりも永続的である。さらに、SU2C PCaコホートのシーケンシングデータによれば、GREM1のRNA転写存在量はCRPC中の他のFGFよりも高い。したがって、GREM1がCRPCにおけるFGFR1/MAPKシグナルの異常な活性化の主因の少なくとも1つであることを本発明者らは提唱する。批判的には、共免疫染色、bi-FC、fortebio、co-IP、プルダウンおよびコンピュータシミュレーションアプローチを使用して、本発明者らはGREM1がFGFR1に直接結合できるという有力な証拠を提供する。したがって、GREM1により誘導されるFGFR1の活性化は、直接的リガンド-受容体結合から生じる。GREM1は、PCaでのFGFR1に対する新しいリガンドとして機能する。

10

【0376】

【0031】GREM1は、以前BMPの古典的アンタゴニストと見なされていた。BMPシグナル伝達経路および下流標的遺伝子は、コンディショナルノックアウトマウスモデルからの知見に基づいてPCaの進行および転移に有意な影響を及ぼすことが報告された。しかし、BMP4がFGFR/MAPKの活性化に対して有意な影響を与えないことと、GREM1によるPCaに対する腫瘍促進効果を本発明者らは見出している。さらに、PCa細胞に対するGREM1遮断抗体の阻害効果はBMPRIIノックアウトにより無効化することはできない。ところが、PCaに対するGREM1の積極的役割はFGFR1ノックアウトにより大いに無効にすることができる。まとめると、FGFR/MAPKの活性化およびGREM1のCRPC促進効果はBMPシグナル伝達経路に非依存性である。本発明者らの本研究は、GREM1のまったく新しい機能を同定し、FGFRリガンドに新たなメンバーを加えている。もっと大まかには、FGFRシグナル経路は、膀胱がん、胃がん、肺がんおよび乳がんなどの他の腫瘍での中枢的発癌ドライバーでもある。GREM1/FGFR/MAPK軸が他のがんタイプでの腫瘍発生および増悪に関与しているかどうかを理解するためにはさらなる研究を必要とする。

20

【0377】

【0032】GREM1が、GEMMとヒトPCa試料の両方で腫瘍上皮細胞により発現されていることを本発明者らは免疫染色により見出している。それと一致して、腫瘍細胞または腫瘍幹細胞が、結腸がんおよび神経膠腫でGREM1を高度に発現していることが他の独立した研究所により報告されている。しかし、Julie B. Sneddonらは、774の様々な腫瘍症例でGREM1 RNAの発現を分析し、結腸、肺、膵臓および乳がん由来の腫瘍間質細胞の50%より多くはGREM1が陽性であることを見出した。Michael Quanteらは、グレムリンが胃がんモデルにおいて腫瘍関連線維芽細胞(CAF)で有意に増加していることを示した。CRPCに対するGREM1の促進効果は、腫瘍細胞上では自己分泌的やり方だけでなく、おそらく腫瘍微小環境を調節することを通じて作用して、アンドロゲン除去などの厳しい状況でPCa細胞の成長および細胞死の回避に適した微小環境を生み出している可能性がある。

30

40

【0378】

【0033】分泌されたタンパク質は薬物標的の重要な範疇である。本研究では、本発明者らはGREM1に対するモノクローナル抗体を開発する。ヒトPCa細胞株、PDOおよびPDXでの実験、ならびにPbsn-Cre4; PTEN^{fl/fl}; Trp53^{fl/fl}マウスPCaモデルでのインビボ研究に基づいて、本発明者らは、抗GREM1抗体の卓越した抗腫瘍効果を実証する。抗GREM1抗体は、PCaに対しADTとの強い相乗効果を示す。しかし、GREM1は他の組織でも発現されることを考慮に入れなければならない。研究では、マウスでGREM1を従来のノックアウトすると、腸管の異常な発達および造血系の障害を引き起こすことが明らかにされている。本発明者らの研究では、抗GREM1抗体処置後マウスの腸を含む主要器官を慎重に調査する。週3回の腹腔内注

50

射を通じて $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量では、明白な毒性効果も、主要器官または末梢血球数への有意な損傷も観察されない。これらの知見により、適切な投与ウィンドウであれば望ましくない副作用は回避できることが示唆される。

【0379】

【0034】がん治療でFDAより承認されている24の抗体薬の大半は、造血器悪性腫瘍では免疫チェックポイントタンパク質または細胞表面タンパク質を標的にし、その他の少数は、少数の固形腫瘍の処置ではHER2、EGFR、VEGFまたはVEGFRを遮断する。Pcaを含む「冷たい腫瘍」は、低CD8+細胞傷害性T細胞浸潤があるが、免疫チェックポイント療法への応答は不十分である。したがって、「冷たい腫瘍」に対する新しい抗体ベース薬のための新規の標的を同定することが臨床的に非常に重要になる。GREM1 / FGFR1 / MAPK軸がCRPCに対する決定的なドライバーであるという本発明者らの発見は、去勢抵抗性発現の分子機序の理解のための洞察を提供するだけでなく、新規の薬物標的としてのGREM1の直接的治療関連性も実証する。抗GREM1モノクローナル抗体は、CRPCの処置のための大きな治療期待が見込める。

10

【0380】

実施例13：14E3は肺におけるPca転移の形成を強力に減少させることができた
【0035】肺での前立腺がん転移に対するグレムリン1抗体の効果を評価するため、PC3細胞(ATCC)にルシフェラーゼを構成的に発現するプラスミドをトランスフェクトした。PC3-luc細胞を対数成長期から収集し、80mlの基本培地(DMEM)に 1×10^6 細胞で懸濁した。次に細胞懸濁液をBALB/Cヌードマウスの心室中に心臓内注射した(Shanghai SLAC Laboratory Animal)。グレムリン1ハイブリドーマ抗体14E3またはアイソタイプ対照を、3週間週2回 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量で腹腔内に与えた。2日毎に体重を測定した。マウスに麻酔をかけ、D-ルシフェリン(ThermoFisher、L2916)を $15 \text{ mg} / \text{kg}$ で5分間投与した。画像は、インビボイメージングシステム(Caliper IVIS生物発光システム、Caliper LifeScience, USA)により撮った。図19A、19Bおよび19Cではイメージングの結果として、14E3は、体重に影響を与えることなく平均ラジアン強度に対する明白な阻害を示しており、グレムリン1に対する抗体(例えば、14E3)が心臓内注射を受けたマウスモデルでPca転移を有意に減少させたことを示している。図19Dおよび19Eでの微小転移の統計によれば、14E3は肺においてPca転移の形成を強力に減少させることができた。

20

30

【0381】

【0036】

【0382】

40

50

【表 5 - 1】

表 5. 本出願において言及されるまたは使用される配列

配列 番号	配列	記注
1	TYGMA	14E3/Hu14E3-Ha/ Hu14E3-Hb/ Hu14E3- Hc HCDR1
2	WINTLSGEPTYADDFKG	14E3/Hu14E3-Ha/ Hu14E3-Hb/ Hu14E3- Hc HCDR2
3	EPMDY	14E3/Hu14E3-Ha/ Hu14E3-Hb/ Hu14E3- Hc HCDR3
4	KSSQSLLSDGKTYLS	14E3/Hu14E3-La/ Hu14E3-Lb LCDR1
5	LVSKLDS	14E3/Hu14E3-La/ Hu14E3-Lb LCDR2
6	WQGAHFPLT	14E3/Hu14E3-La/ Hu14E3-Lb LCDR3
7	QIQLVQSGPELKPKGETVKISCKTSGSTFTTYGM AWMKQAPGKGLTWMGWINTLSGEPTYADDFK GRFAFSLKTSANTAYLQINNKNEDAATYFCAR EPMDYWGQGTSVIVSS	14E3 VH
8	DVVMTQTPLTSLITIGQPASISCKSSQSLLSDGK TYLSWLLQRPDQSPKRLISLVSKLDSGVPDRITG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGITYYCWQGAHFPLTF GAGTKLELK	14E3 VL
9	CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAACT GAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC TGCAAGACTTCTGGATCTACGTTCAACAACCTA TGGAATGGCCTGGATGAAGCAGGCTCCAGGA AAGGGTTTAACGTGGATGGGCTGGATAAACA CCCTCTCTGGAGAGCCAACATATGCTGATGAC TTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGAAAAC CTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGATCAACA ACCTCAAAAATGAGGACGCGGCTACATATTTC TGTGCACGAGAACCAATGGACTACTGGGGTC AAGGAACCTCAGTCATCGTCTCCTCA	14E3 VH _{nu}

【 0 3 8 3 】

【表 5 - 2】

10	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTT GTCGATTACCATTTGGACAACCAGCCTCCATCT CTTGCAAATCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGT GATGGAAAGACATATTTGAGTTGGTTGTTACA GAGGCCAGACCAGTCTCCAAAGCGCCTAATC TCTCTGGTGTCCAAACTGGACTCTGGAGTCCC TGACAGGATCACTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGG CTGAAGATTTGGGCATCTATTATTGCTGGCAA GGTGCACATTTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA	14E3 VL _{nu}
11	DYYMN	22F1/Hu22F1-Ha/ Hu22F1-Hb/ Hu22F1- Hc/Hu22F1-Hd HCDR1
12	DINPKDGDSGYSHKFKG	22F1/Hu22F1-Ha/ Hu22F1-Hb/ Hu22F1- Hc/Hu22F1-Hd HCDR2
13	GFTTVVARGDY	22F1/Hu22F1-Ha/ Hu22F1-Hb/ Hu22F1- Hc/Hu22F1-Hd HCDR3
14	KSSQSLLDSDGKTYLN	22F1/Hu22F1-La/ Hu22F1-Lb LCDR1
15	LVSKLDS	22F1/Hu22F1-La/ Hu22F1-Lb LCDR2
16	WQGTHFPYT	22F1/Hu22F1-La/ Hu22F1-Lb LCDR3
17	EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYY MNWLKQSHGKSLEWIGDINPKDGDSGYSHKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAS GFTTVVARGDYWGQGTTLTVSS	22F1 VH
18	DVVMQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGFPDRFT GSGSGIDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPY TFGGGTKLEIK	22F1 VL

【 0 3 8 4 】

【表 5 - 3】

19	GAGGCCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAAC TGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC TGTAAGGCTTCTGGATACTCGTTCACTGACTA CTACATGAACTGGCTGAAGCAGAGCCATGGA AAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCC TAAAGATGGTGATAGTGGTTACAGCCATAAG TTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACA AGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTA CTGTGCAAGCGGATTTACCACGGTAGTAGCTA GGGGGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCA	22F1 VHnu
20	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTT GTGGGTTACCATTTGGACAACCAGCCTCCATCT CTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGT GATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACA GAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATC TATTTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGATTCCC TGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGG CTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAA GGTACACATTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG GACCAAGCTGGAAATAAAA	22F1 VLnu
21	DDYMH	69H5 HCDR1
22	WIDPENGDEYASKFQG	69H5 HCDR2
23	WATVPDFDY	69H5 HCDR3
24	KSSQSLLNRSNQKNYLA	69H5 LCDR1
25	FTSTRES	69H5 LCDR2
26	QQHYSTPFT	69H5 LCDR3
27	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDY MHWVKRRPEQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQ GKATTTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTT WATVPDFDYWGQGITLVSS	69H5 VH
28	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNRS NQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVHFTSTRESGVP DRFIGSGSGTDFLTISNLAEDLADYFCQQHYS TPFTFGSGTKLEIK	69H5 VL
29	GAGGTGCAGCTGCAACAGTCCGGCGCTGAAC TGGTGAGGCCTGGAGCCTCCGTGAAGCTGTCC TGCACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACG ACTACATGCACTGGGTGAAGAGGAGGCCTGA GCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTGGATCGAC CCCAGAACGGCGACACCGAGTACGCCTCCA AGTTCCAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGA CACCTCCTCCAACACCGCCTACCTGCAGCTGA GCTCCCTGACCTCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATTGCACCACTGGGGCACCGTGCCCGACTT CGACTACTGGGGACAGGGCACCACTGACC GTGTCCAGC	69H5 VHnu

【 0 3 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

30	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCTCTCT GGCTATGTCAGTGGGACAGAAAGTGACCATG TCTTGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGAACAG GTCCAACCAGAAGAAGTACCTGGCTTGGTACC AGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAGCTGCT GGTGCATTTTACCTCTACCAGGGAATCCGGAG TGCCAGATAGATTTATCGGCTCTGGCTCCGGC ACAGATTTTACACTGACCATCTCCAATCTGCA GGCAGAAGATCTGGCTGACTACTTTTGCCAGC AGCACTACTCCACCCCTTTTACCTTTGGCTCCG GCACCAAGCTGGAGATCAAG	69H5 VL _{nu}
31	DFYMN	56C11 HCDR1
32	DINPNNGGTSYNQKFKG	56C11 HCDR2
33	DPIYYDYDEVAY	56C11 HCDR3
34	RSSQSLVHSNGNTYLH	56C11 LCDR1
35	KVSNRFS	56C11 LCDR2
36	SQSTHVPLT	56C11 LCDR3
37	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDFY MNVVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR DPIYYDYDEVAYWGQGILVTVSA	56C11 VH
38	DVVMQTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNG NTYLHWYLVKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFR SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPL TFGAGTKLELK	56C11 VL
39	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGAGC TGGTGAAGCCTGGAGCCTCCGTGAAGATCTCC TGTAAGGCCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTT CTACATGAACTGGGTGAAGCAGTCCCACGGC AAGTCCCTGGAGTGGATCGGCGACATCAATC CCAACAACGGCGGCACCTCCTACAACCAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGAC AAGTCCTCCAGCACCGCCTACATGGAGCTGA GGTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGACCCCATCTACTACGACTA CGACGAGGTGGCCTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTGACAGTGTCCGCC	56C11 VH _{nu}
40	GATGTGGTGATGACACAGACACCTCTGTCTCT GCCAGTGTCTCTCGGAGATCAGGCTTCTATCT CTTGCAAGATCCTCTCAGTCTCTGGTGCATTCC AACGGAAACACCTACCTGCATTGGTACCTGCA GAAACCAGGACAGTCTCCTAAGCTGCTGATCT ACAAGGTGTCCAACAGGTTCTCCGGAGTGCC AGATAGATTTTCCGGATCTGGATCTGGCACCG ATTTTACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAAGCA GAGGATCTGGGAGTGTACTTTTGTAGCCAGTC TACCCACGTGCCTCTGACATTTGGAGCAGGAA CAAAGCTGGAGCTGAAG	56C11 VL _{nu}

10

20

30

40

【 0 3 8 6 】

【表 5 - 5】

41	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYG MAWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDF KGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA REPM DYWGQGTMTVTVSS	Hu14E3-Ha VH
42	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGAGCT GAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCC TGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCACCTA CGGCATGGCCTGGATGAGGCAGGCTCCTGGC CAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACA CCCTGTCCGGCGAACCCACCTACGCCGACGAC TTCAAGGGCAGGTTTCGTGTCTCCCTGGACAC CAGCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCT CCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGCGCCAGGGAGCCCATGGACTACTGGGGC CAGGGCACCATGGTGACCGTGTCTCTCC	Hu14E3-Ha VHnu
43	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYG MAWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDF KGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA REPM DYWGQGTMTVTVSS	Hu14E3-Hb VH
44	CAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGC TGAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAGGTGTC CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCT ACGGCATGGCCTGGATGAGGCAGGCTCCTGG ACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAAC ACCCTGTCCGGCGAGCCTACCTACGCCGACGA CTTCAAGGGCAGGTTTCGCCTTCTCCCTGGACA CCTCCGTGAGCACCGCCTACCTGCAGATCTCC AGCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGGGAGCCTATGGACTACTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGTCCAGC	Hu14E3-Hb VHnu
45	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGSTFTTYG MAWMKQAPGQGLTWMGWINTLSGEPTYADDF KGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA REPM DYWGQGTMTVTVSS	Hu14E3-Hc VH
46	CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCAGCGAGC TCAAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGAAGGTGTC CTGCAAGGCCAGCGGCTCCACCTTACCACAT ACGGCATGGCCTGGATGAAGCAGGCTCCTGG CCAGGGCCTGACCTGGATGGGATGGATCAAC ACCCTGTCCGGCGAGCCTACCTACGCCGATGA CTTCAAGGGCAGGTTTCGCCTTCTCCCTGGACA CCTCCGTGTCCACCGCTTACCTGCAGATCTCC TCCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGGGAGCCCATGGACTACTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGTCTCTCC	Hu14E3-Hc VHnu
47	DVVM TQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDS DG KTYLSWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGAHFPL TFGQGTKLEIK	Hu14E3-La VL

10

20

30

40

【 0 3 8 7 】

50

【表 5 - 6】

48	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCT GCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCT CTTGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCC GACGGAAAGACCTATCTGTCTTGGCTGCAGCA GAGACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATC TACCTGGTGTCCAAGCTGGATTCTGGAGTGCC AGATAGATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAG ATTTACCCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCA GAAGACGTGGGAGTGTACTATTGTTGGCAGG GAGCTCACTTCCCTCTGACATTTGGACAGGGA ACAAAGCTGGAGATCAAG	Hu14E3-La VLnu
49	DVVMTQSPISLPVTLGQPASISCKSSQSLLDS DG KTYLSWLQQRPGQSPRRLISLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGAHFPL TFGQGTKLEIK	Hu14E3-Lb VL
50	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCT GCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCT CTTGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCC GACGGAAAGACCTATCTGTCTTGGCTGCAGCA GAGACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGATC TCCCTGGTGTCTAAGCTGGATTCCGGAGTGCC AGATAGATTTTCCGGATCTGGATCTGGCACCG ATTTTACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCA GAAGACGTGGGAGTGTACTATTGTTGGCAGG GAGCTCACTTCCCTCTGACATTTGGACAGGGA ACAAAGCTGGAGATCAAG	Hu14E3-Lb VLnu
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDY YMNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGD SGYSHK FKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC ASGFTTVVARGDYWGQGTITVTVSS	Hu22F1-Ha VH
52	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGG TGAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCT TGTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGATTA CTACATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGT CAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACC CCAAGGACGGCGACTCCGGCTATTCCCACAA GTTCAAGGGTCGTGTGACCATGACCAGGGAC ACGTCCACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGTC CTCTTTAAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTA CT ACTGCGCCAGCGGATTCACCACCGTGGTGGCT AGGGGCGACTATTGGGGCCAAGGTACCACCG TGACAGTGTCCAGC	Hu22F1-Ha VHnu
53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDY YMNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGD SGYSHK FKGRVTMTVDKSTSTVYMESSLRSEDTAVYY CASGFTTVVARGDYWGQGTITVTVSS	Hu22F1-Hb VH

10

20

30

40

【 0 3 8 8 】

【表 5 - 7】

54	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGG TGAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCT TGTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGATTA CTACATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGGT CAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAACC CCAAGGACGGCGACTCCGGCTATTCCCACAA GTTCAAGGGTCGTGTGACCATGACCGTGGAC AAGTCCACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGTC CTCTTTAAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGCGGATTCACCACCGTGGTGGCT AGGGGCGACTATTGGGGCCAAGGTACCACCG TGACAGTGTCCAGC	Hu22F1-Hb VHnu
55	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDY YMNWVRQAPGQGLEWMGDINPKDGSYSHK FKGRVTLTVDKSTSTVYMEIRSLRSEDTAVYYC ASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hc VH
56	CAAGCTCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGG TGAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGTC TTGTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGACT ACTACATGAACTGGGTGAGGCAAGCTCCCGG TCAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGACATCAAC CCCAAGGACGGCGACAGCGGCTACTCCCACA AGTTCAAGGGTCGTGTGACTTTAACCGTGGAC AAGTCCACCTCCACCGTCTACATGGAGCTGAG GTCTTTAAGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACT ACTGCGCTAGCGGCTTCACCACCGTGGTGGCT CGTGGCGATTACTGGGGACAAGGTACCACCG TGACCGTGTCTCTCC	Hu22F1-Hc VHnu
57	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDY YMNWLRQAPGQGLEWIGDINPKDGSYSHKF KGRATLTVDKSTSTVYMEIRSLRSEDTAVYYC ASGFTTVVARGDYWGQGTTVTVSS	Hu22F1-Hd VH
58	CAAGCTCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGG TGAAAAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAGGTGAG CTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTTACCGACT ACTACATGAACTGGCTGAGGCAAGCTCCCGG TCAAGGTCTGGAGTGGATCGGCGATATCAAC CCCAAGGACGGCGACTCCGGCTACAGCCATA AGTTCAAGGGTCGTGCCACTTTAACCGTGGAC AAGTCCACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGA GGTCTTTAAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCTCCGGCTTCACCACAGTGGTGGC TCGTGGCGACTATTGGGGCCAAGGTACCACC GTGACCGTGAGCTCC	Hu22F1-Hd VHnu

10

20

30

40

【 0 3 8 9 】

【表 5 - 8】

59	DVVMTQSPFLSLPVTILGQPASISCKSSQSLLDSG KTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCWQGTHTFP YTFGGGTKVEIK	Hu22F1-La VL
60	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCT GCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCT CTTGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCC GACGGAAAGACCTACCTGAATTGGCTGCAGC AGAGACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGAT CTACCTGGTGTCCAAGCTGGATTCTGGAGTGC CAGATAGATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACA GATTTACCCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGC AGAAGACGTGGGAGTGTACTATTGTTGGCAG GGAACCCACTTCCCTTACACATTGGAGGAGG CACAAAGGTGGAGATCAAG	Hu22F1-La VLnu
61	DVVMTQSPFLSLPVTILGQPASISCKSSQSLLDSG KTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGFPDRFS SGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCWQGTHTFPY TFGGGTKVEIK	Hu22F1-Lb VL
62	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCT GCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTCTATCT CTTGCAAGTCCTCTCAGTCTCTGCTGGATTCC GACGGAAAGACCTACCTGAATTGGCTGCAGC AGAGACCAGGACAGTCTCCTAGAAGACTGAT CTACCTGGTGTCCAAGCTGGATTCTGGATTCC CAGATAGATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACA GATTTACCCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGC AGAAGACGTGGGAGTGTACTATTGTTGGCAG GGAACCCACTTCCCTTACACATTGGAGGAGG CACAAAGGTGGAGATCAAG	Hu22F1-Lb VLnu
63	NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSF	BMP-結合ループ
64	FSYSVPNTFPQSTESLVHCDS	DAN の 63-83 アミノ 酸
65	MGWSCILFLVATGVHS	シグナルペプチド
66	MSRTAYTVGALLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAI PPPDKAQHNDSEQTQSPQPGSRNRGRGQGRGT AMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQP LKQTIHEEGCNSRTINRFCYGCNSFYIPRHIRK EEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTK KKRVTRVKQCRCISIDL	ヒトグレムリン 1
67	MNRTAYTVGALLLLGTLLPTAEGKKKGSQGAI PPPDKAQHNDSEQTQSPQPGSRNRGRGQGRGT AMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQP LKQTIHEEGCNSRTINRFCYGCNSFYIPRHIRK EEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTK KKRVTRVKQCRCISIDL	マウスグレムリン 1

10

20

30

40

【 0 3 9 0 】

【表 5 - 9】

68	MSRTAYTVGALLLLLGTTLLPAAEGKKKGSQGAI PPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGT AMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQP LKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGC FSYSVPNTFPQSTESLVHCDSCPKKFTTMMVT LNCPQLQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL	キメラ hGREM1
69	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRN RGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYL KRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGC NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVT LNCPQLQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL	シグナルペプチドの ないヒトグレムリン 1 配列
70	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRT RGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYL KRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGC NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVT LNCPQLQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL	シグナルペプチドの ないマウスグレムリ ン 1 配列
71	MSRTAYTVGALLLLLGTTLLPAAEG	ヒトグレムリン 1 シ グナルペプチド
72	MNRTAYTVGALLLLLGTTLLPTAEG	マウスグレムリン 1 シグナルペプチド
73	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSP LPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPL SSSVPSQKTYQGSYGFRLLHSGTAK SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPP GTRVRAMAIYKQSQHMTVEVVRCPHHE RCSDSDGLAPPQHILRVEGNLRVEYLLDDRNTFR HSVVVPYEPPEVGSDDCTTIHYNMCNS SCMGMNRRPILITILEDSSGNLLGRNSFEVRV CACPGRRDRTEENLRKKGEPHELP PGSTKRALPNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRG RERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPG GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD	p53 タンパク質
74	MTAIIKEIVS RNKRRYQEDGFDLDTYIYP NIIAMGFPAE RLEGVYRNNI DDVVRFLDSK HKNHYKIYNLCAERHYDTAK NCRVAQYPF EDHNPPQLELIKPFCELDQWLSEDDNHVA AIHCKAGKGR TGVMICAYLLRGKFLKAQE ALDFYGEVRTRDKKGVITPS RRYVYYYSY LLKNHLDYRPVALLFHKMMFETIPMFSGGT CNPQFVVCQLKVKIYSSNSG PTRREDKFMY FEFPQPLPVC GDIKVEFFHK NKMLKKDKM FHFVWNTFFIPGPEETSEKV ENGLCDQEI DSICSIERADNDKEYLVLT TKNDLDKANK DKANRYFSPNFKVKLYFTKT VEEPSNPEAS SSTSVTPDVS DNEPDHYRYS DTTDSDPENE PFEDQHTQITKV	PTEN タンパク質ア イソフォーム 1

【 0 3 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 0】

75	SWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPW GAPVEVESFLVHPGDLQLRCRLRDDVQSINWL RDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYA CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSEDDDDDDDD SSEEKETDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLH AVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTRLRWLKNNGKEFKP DHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNVTCIV ENEYGSINHTYQLDVVERSHPRPILQAGLPANKT VALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNNGSK IGPDNLPHYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVS FEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEER PAVMTSPLYLEIIICTGAFLISCMVGSVIVYKMK SGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADS SASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPE DPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGL DKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEM EMMKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVIVEYAS KGNLREYLQARRPPGLECYNP SHNP EEQLSSK DLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVL VTEDNVMKIADFG LARDIHHIDYYKKT TNGRLP VKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTL GGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNEL YMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRIVALT SNQEYLDLSMPLDQYSPSFPDTRSSTCSSGEDSV FSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR	ヒト FGFR1
----	--	----------

【図面】

【図 1 A】

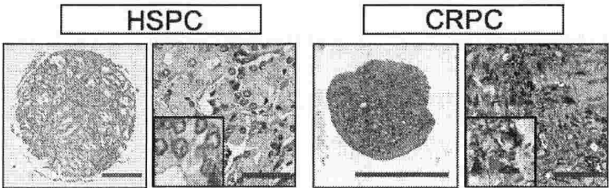


FIG. 1A

【図 1 B】

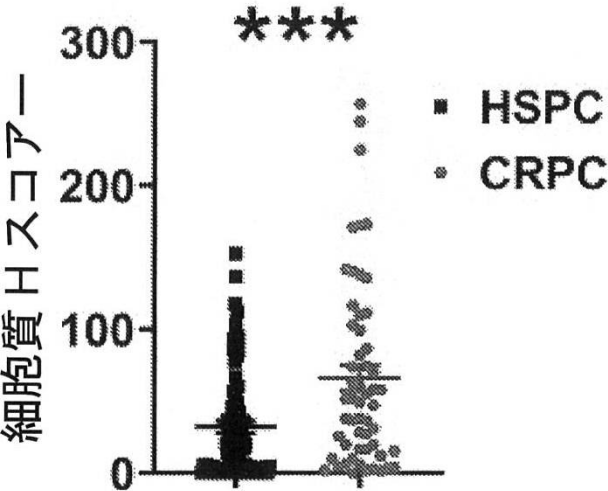


FIG. 1B

【図 1 C】

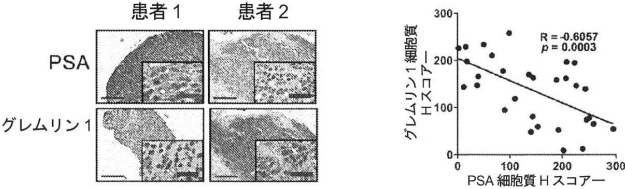


FIG. 1C

【図 1 D】

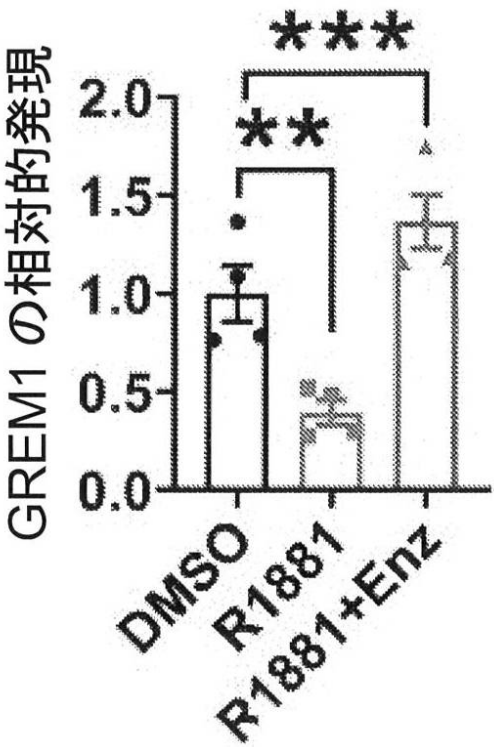


FIG. 1D

【図 1 E】

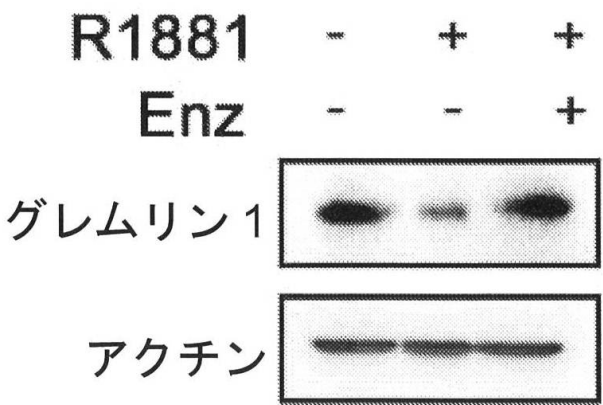


FIG. 1E

【図 1 F】

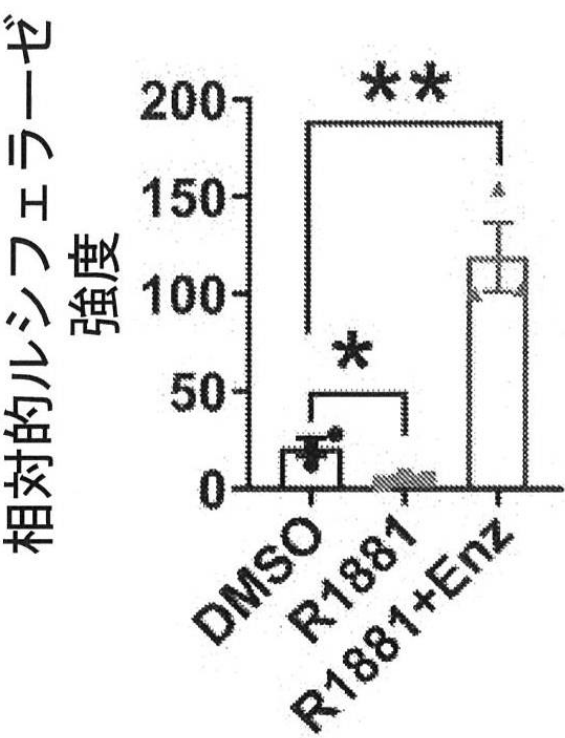


FIG. 1F

【図 1 G】

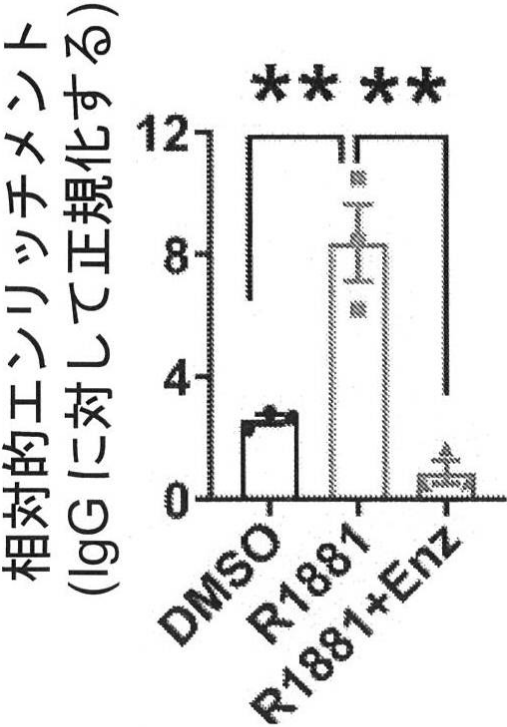


FIG. 1G

【図 1 H】

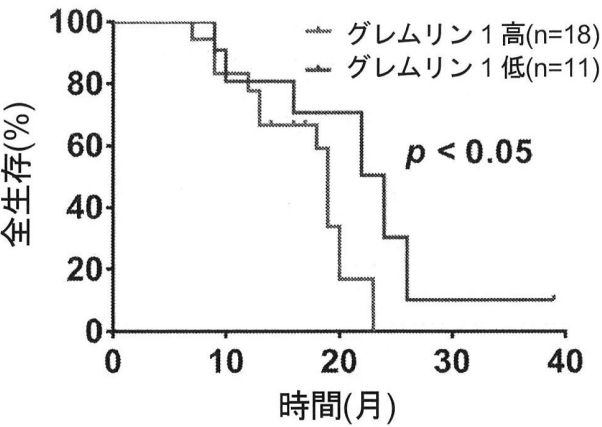


FIG. 1H

【図 1 I】

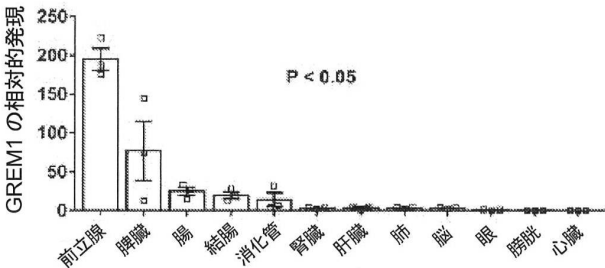


FIG. 1I

【図 2 A】

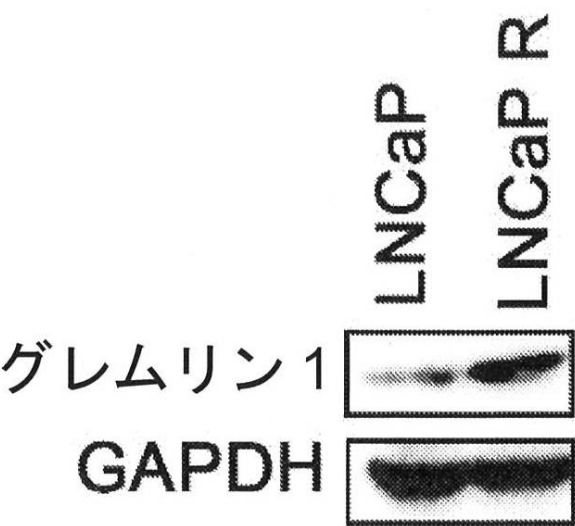


FIG. 2A

10

20

30

40

50

【図 2 B】

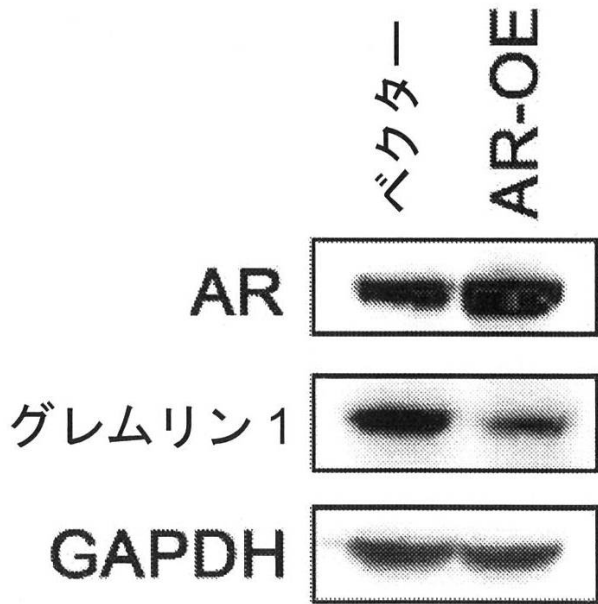


FIG. 2B

【図 2 C】

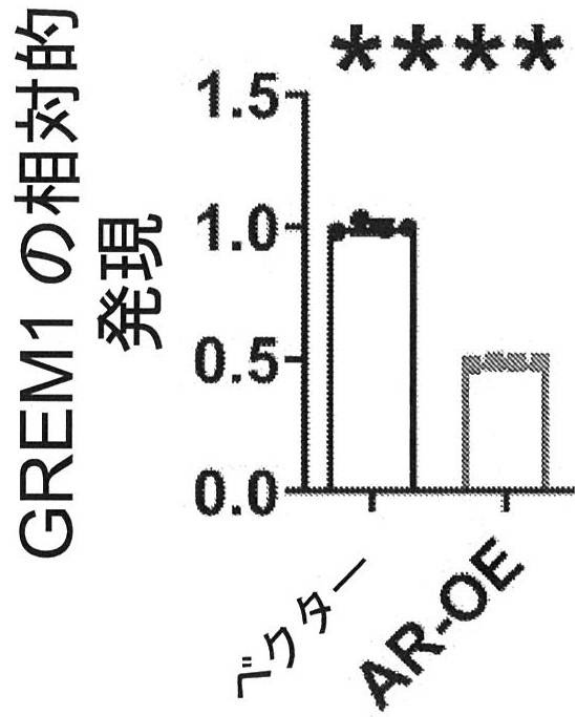


FIG. 2C

【図 2 D】

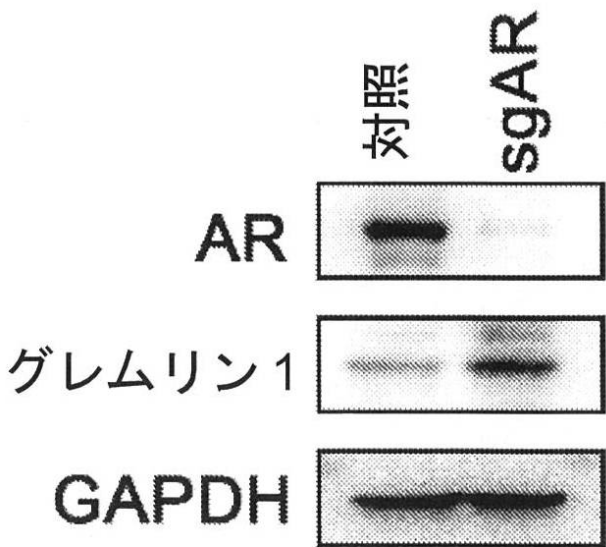


FIG. 2D

【図 2 E】

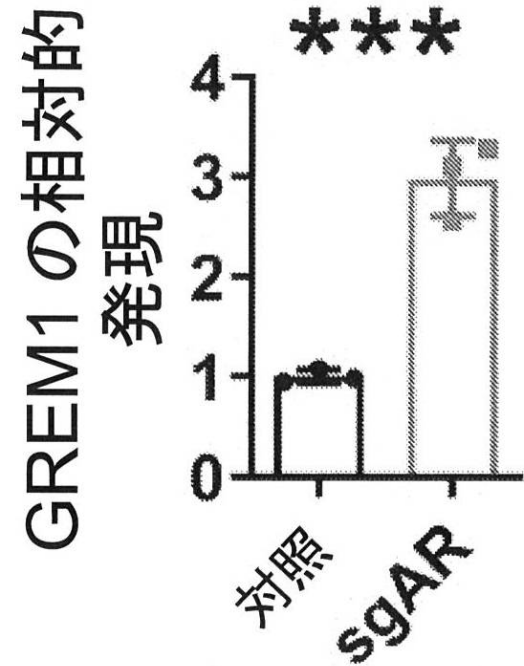


FIG. 2E

10

20

30

40

50

【図 3 A】

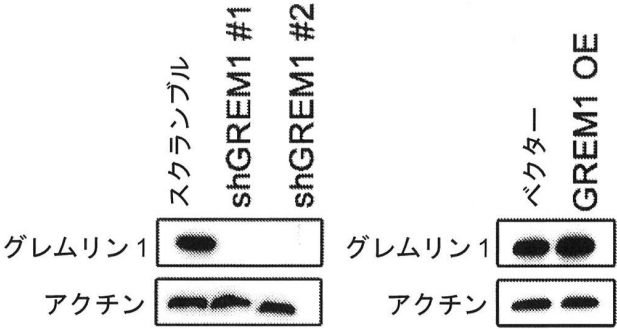


FIG. 3A

【図 3 B】

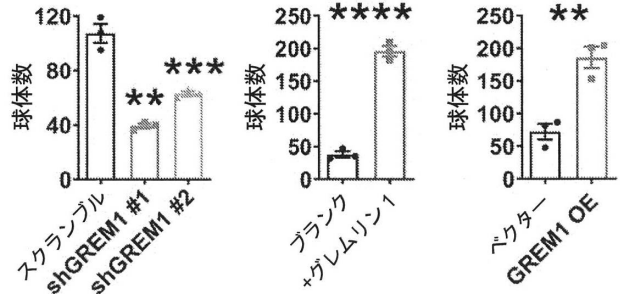


FIG. 3B

【図 3 C】

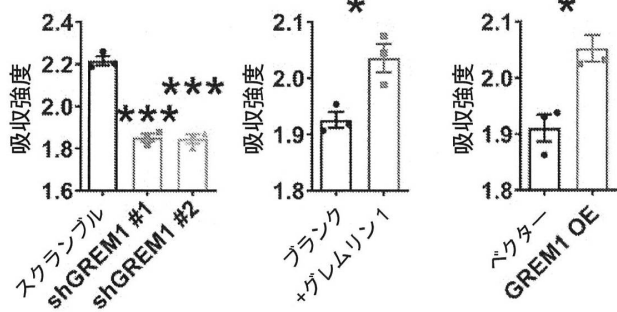


FIG. 3C

【図 3 D】

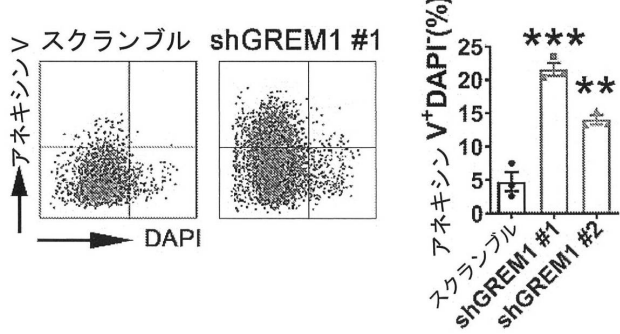


FIG. 3D

10

20

30

40

50

【図 4 A】

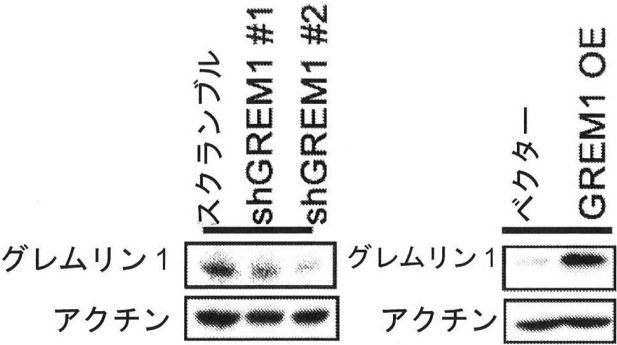


FIG. 4A

【図 4 B】

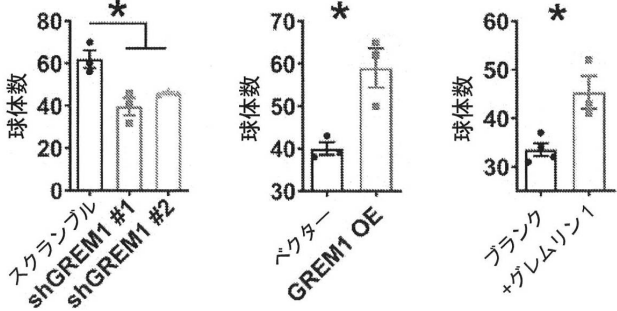


FIG. 4B

【図 4 C】

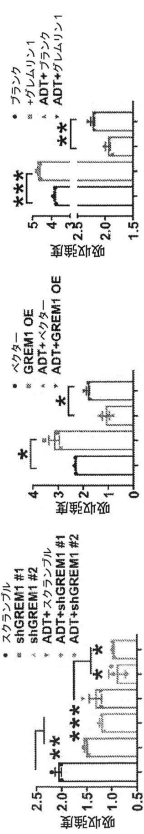


FIG. 4C

【図 4 D】

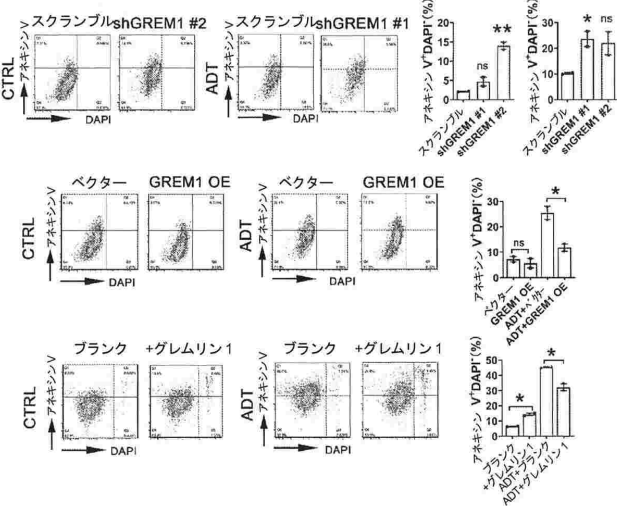


FIG. 4D

【 図 5 A 】

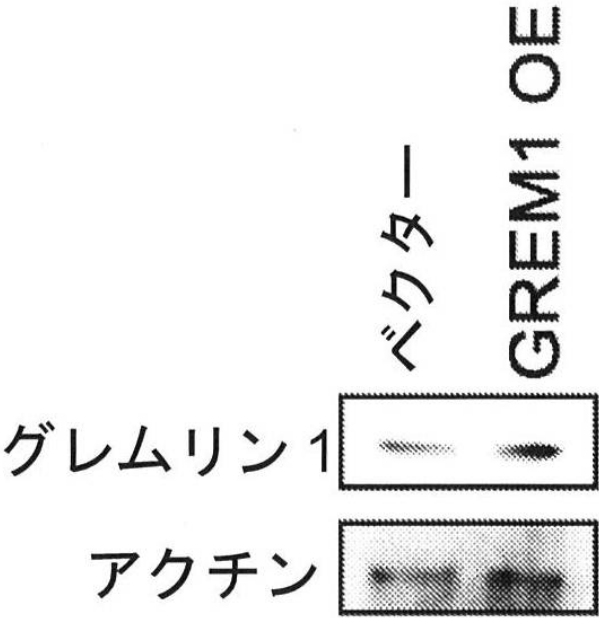


FIG. 5A

【 図 5 B 】

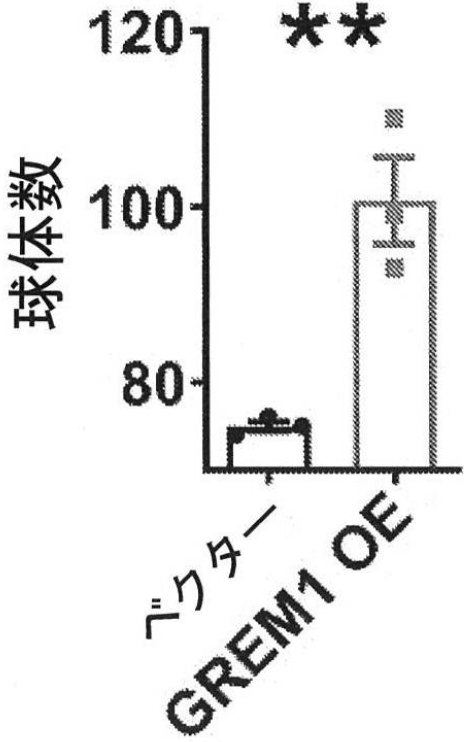


FIG. 5B

【 図 5 C 】

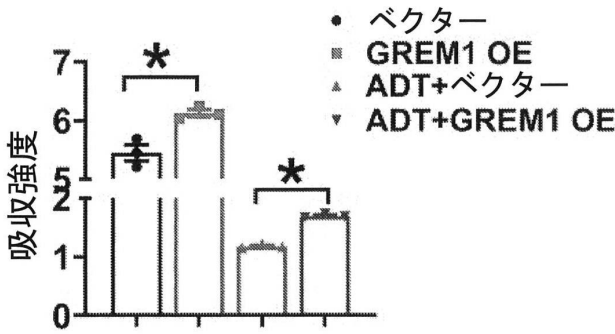


FIG. 5C

【 図 5 D 】

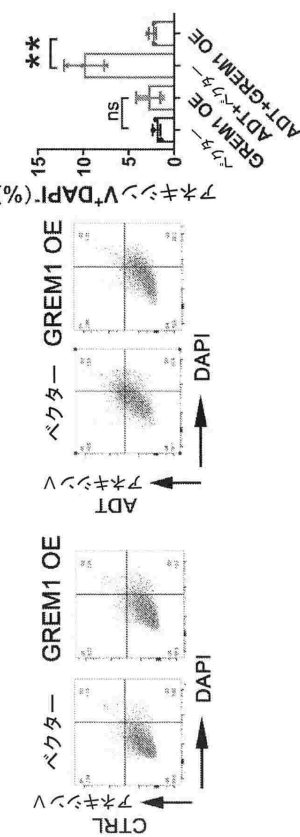


FIG. 5D

【図 6 A】

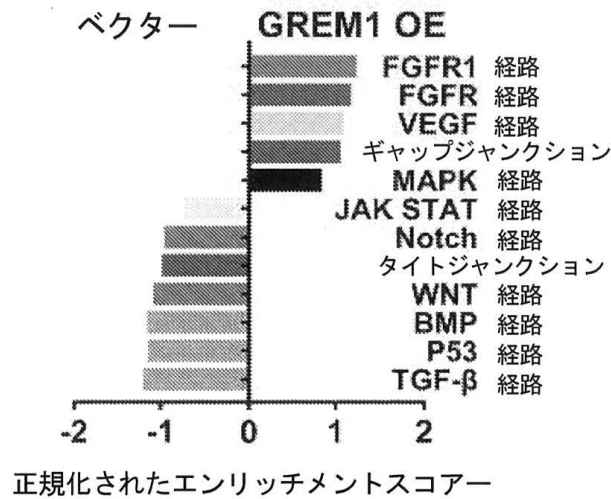


FIG. 6A

【図 6 B】

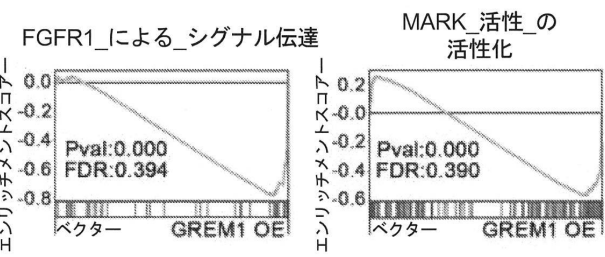


FIG. 6B

【図 6 C】

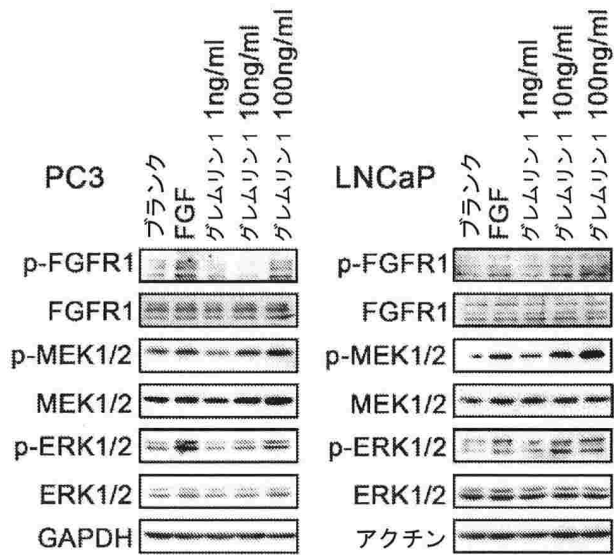


FIG. 6C

【図 6 D】

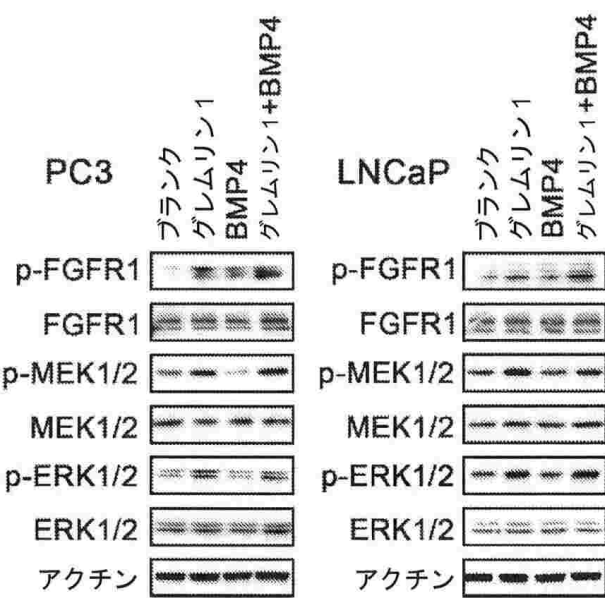


FIG. 6D

【図 6 E】

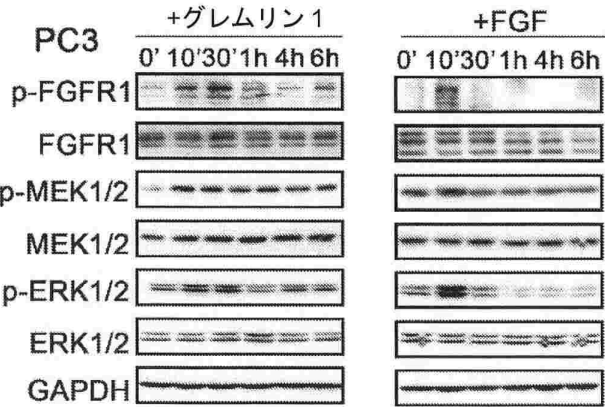


FIG. 6E

【図 6 F】

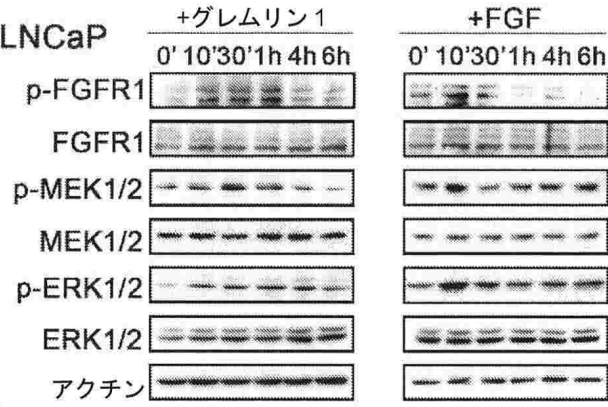


FIG. 6F

【図 6 G】

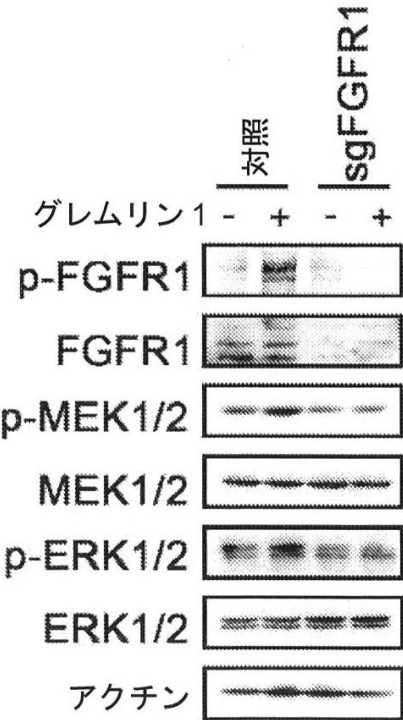


FIG. 6G

【図 6 H】

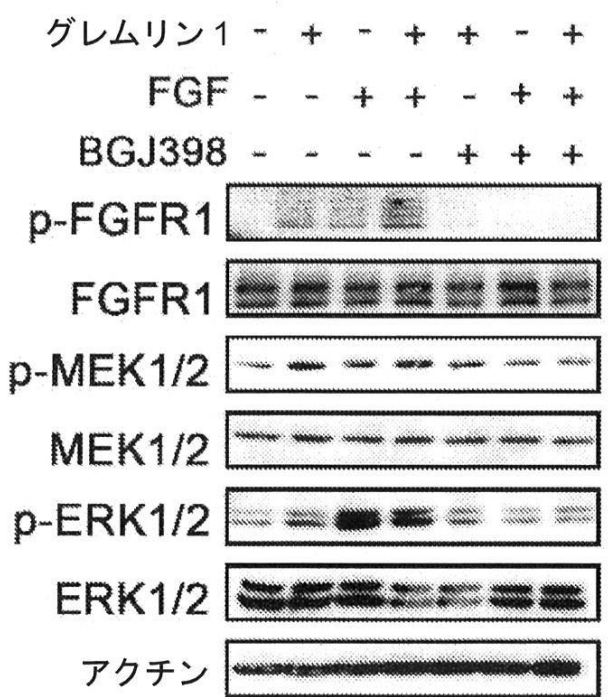


FIG. 6H

10

20

30

40

50

【図 6 I】

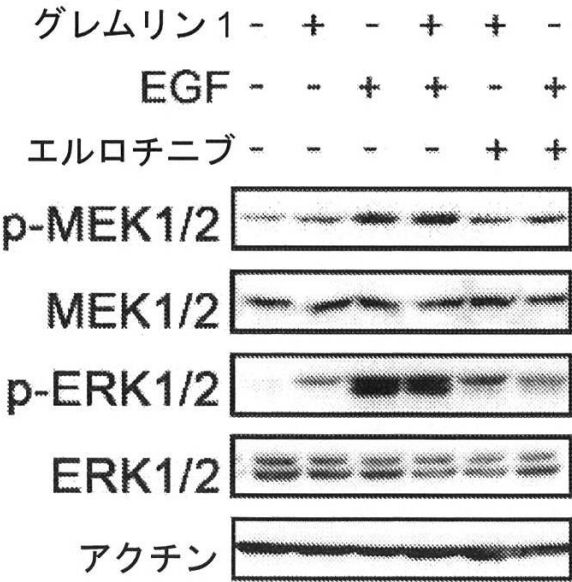


FIG. 6I

【図 7 A】

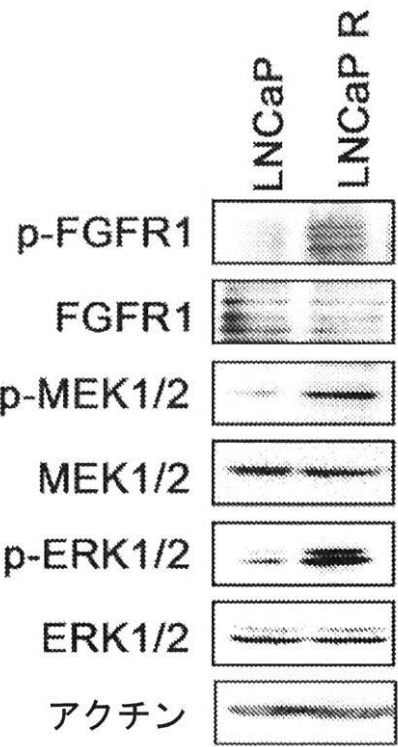


FIG. 7A

【図 7 B】

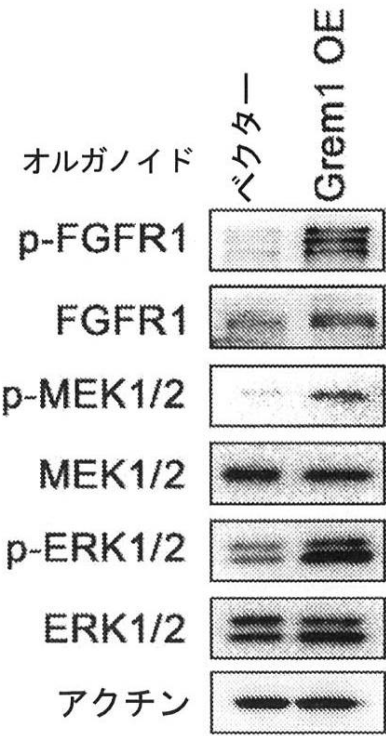


FIG. 7B

【図 8 A】

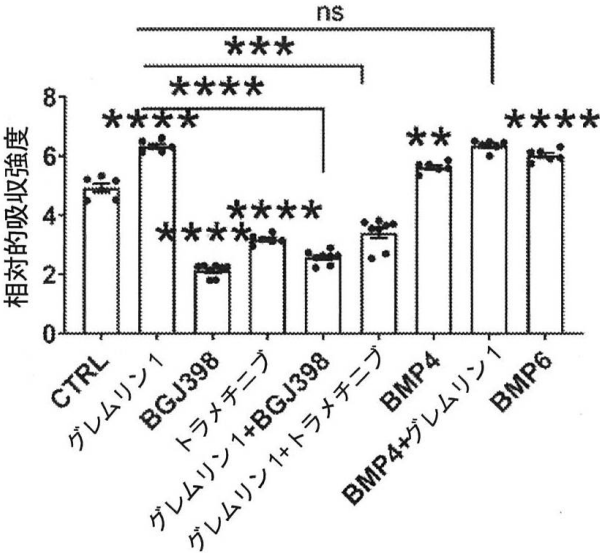


FIG. 8A

10

20

30

40

50

【図 8 B】

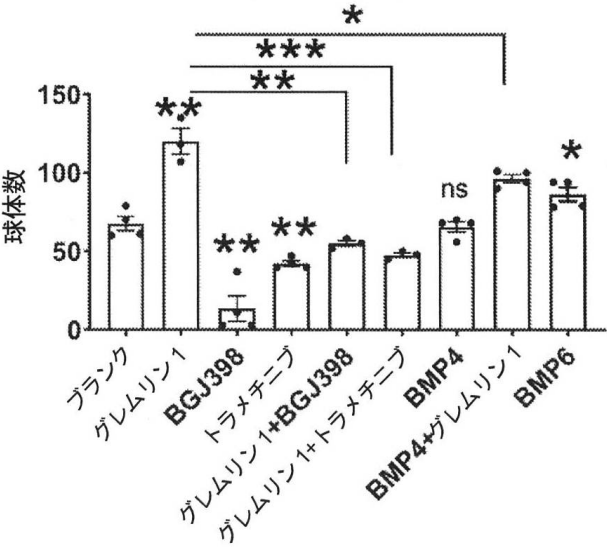


FIG. 8B

【図 8 C】

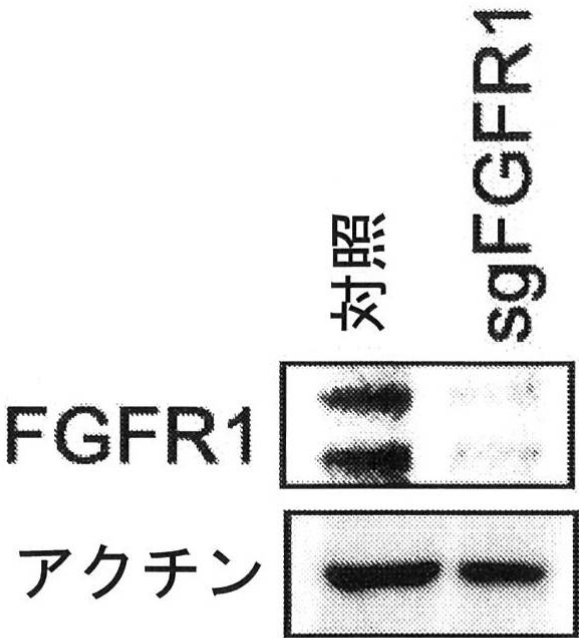


FIG. 8C

【図 8 D】

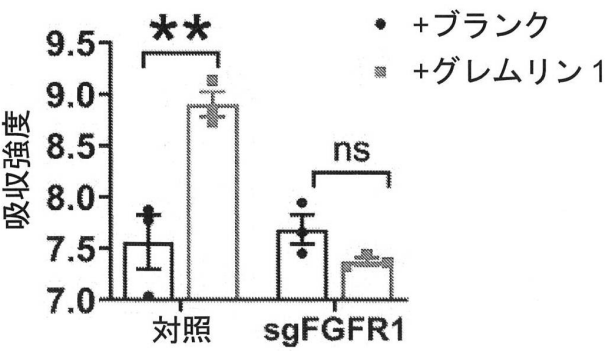


FIG. 8D

【図 8 E】

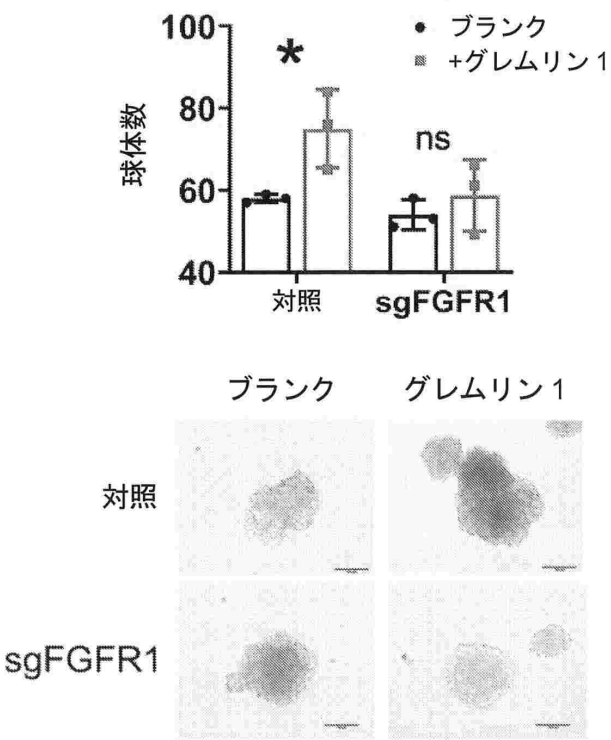


FIG. 8E

【 図 9 A 】

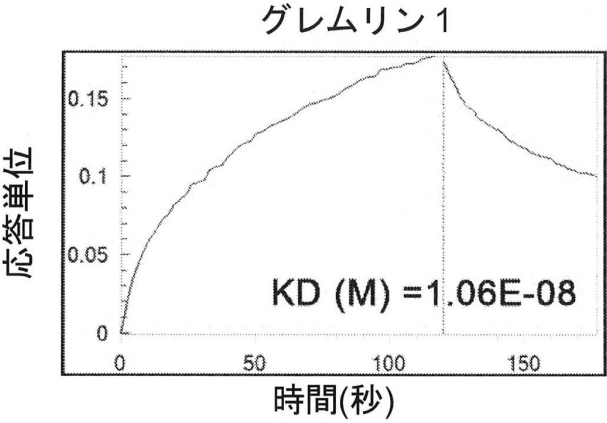


FIG. 9A

【 図 9 B 】

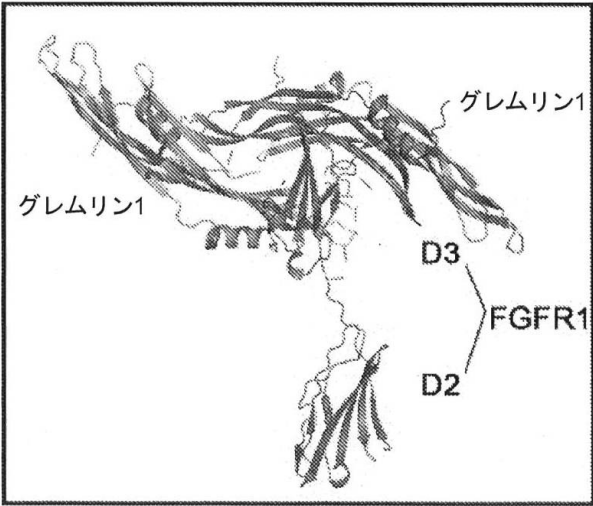


FIG. 9B

【 図 9 C 】

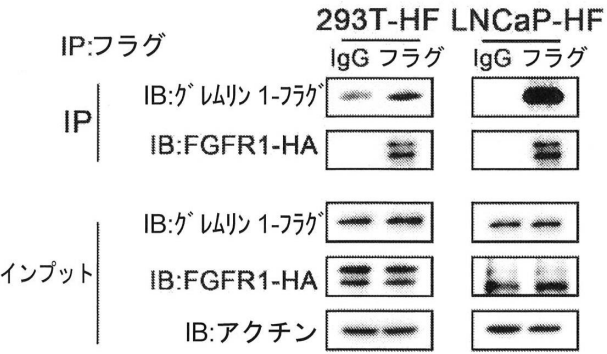


FIG. 9C

【 図 9 D 】

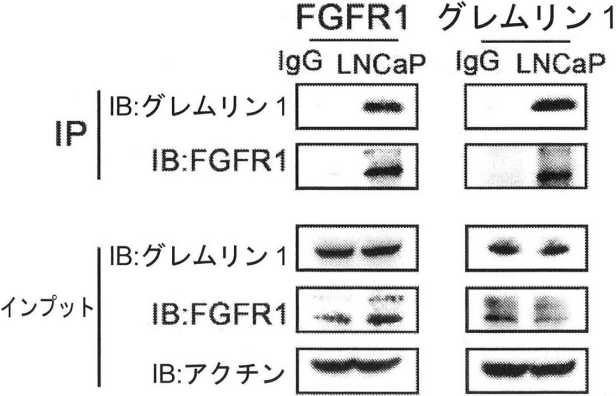


FIG. 9D

10

20

30

40

50

【図 9 E】

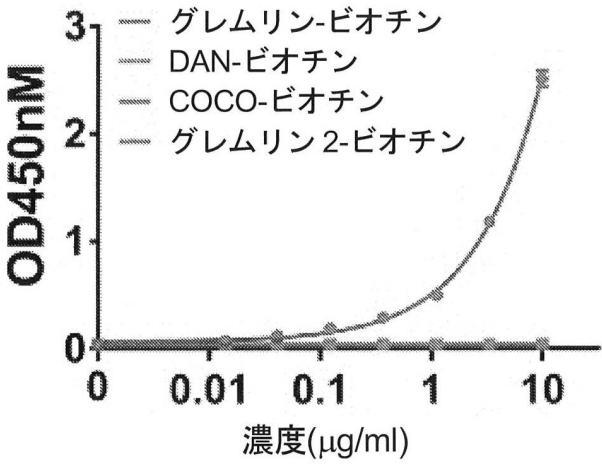


FIG. 9E

【図 9 F】

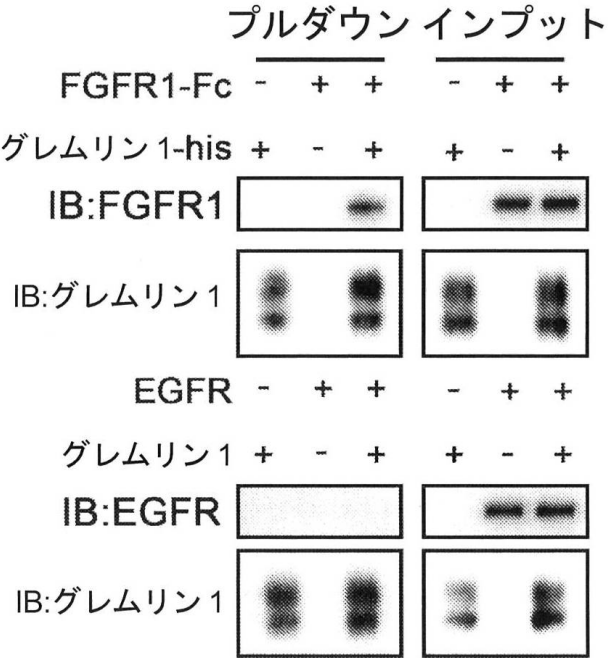


FIG. 9F

【図 9 G】

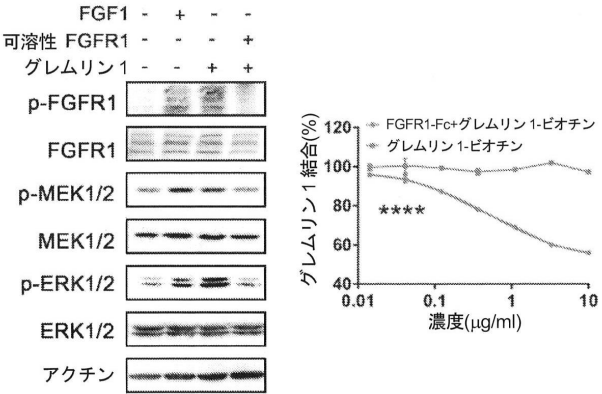


FIG. 9G

【図 9 H】

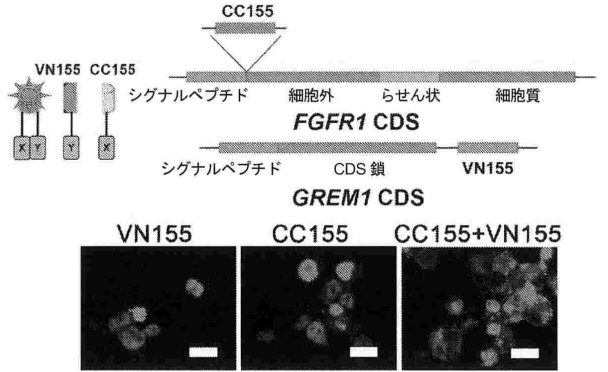


FIG. 9H

【図 9 I】

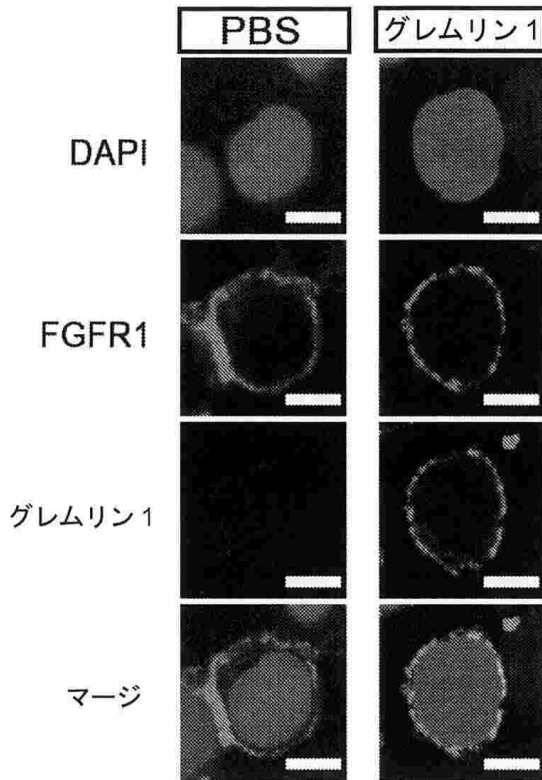


FIG. 9I

【図 9 J】

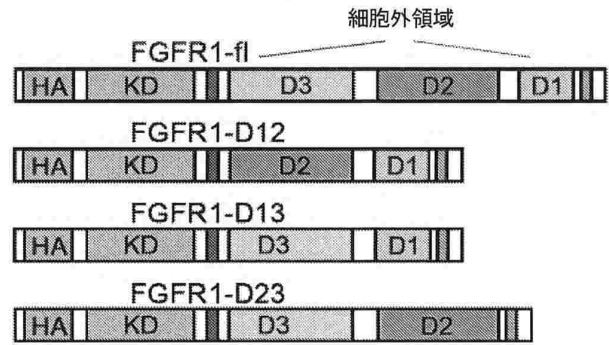


FIG. 9J

10

20

【図 9 K】

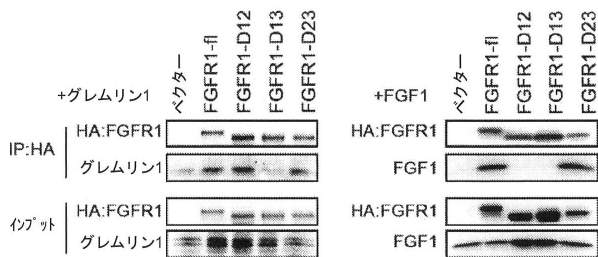


FIG. 9K

【図 9 L】

GREM1-フラグ点変異

WT: R^KY^LK^RD^WC^K
K66GR67G: R^KY^LGGD^WC^K
WT: T^II^NR^FC^YG...K^RV^TR^VK^QC
R92AR148A: T^II^NA^FC^YG...K^RV^TAV^KQ^C

WT: F^CK^PK^KF^TT^M
K123AK124A: F^CK^PA^AF^TT^M

30

FIG.9L

40

50

【図 9 M】

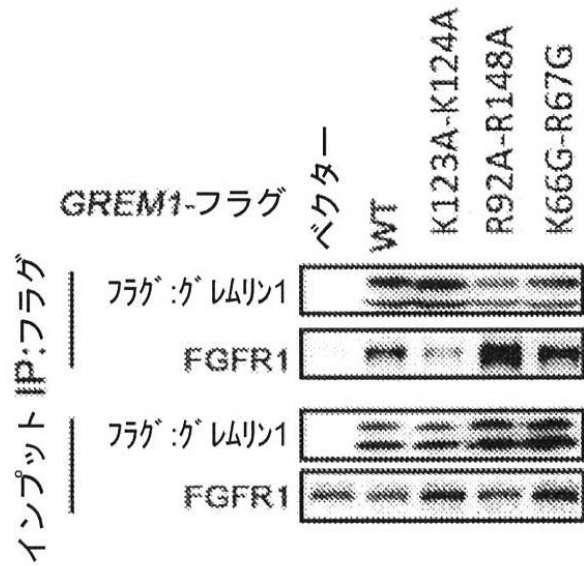


FIG.9M

【図 9 N】

FGFR1点変異

WT: HA-WTSPEKMEKKLHAV
E160A: HA-WTSPEKMAKKLHAV
K162D: HA-WTSPEKMEKDLHAV

WT: HA-TYQLDVVER
D244A: HA-TYQLAVVER

FIG. 9N

10

【図 9 O】

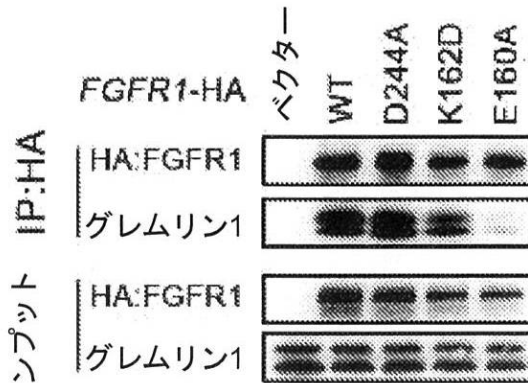


FIG. 9O

【図 9 P】

点変異

FGFR1(WT): HA-VKFKCPSSG
FGFR1(C176G): HA-VKFKGPSSG

FGFR1(WT): HA-DVVERSPHR
FGFR1(R248Q): HA-DVVEQSPHR

FIG. 9P

20

30

40

50

【図 9 Q】

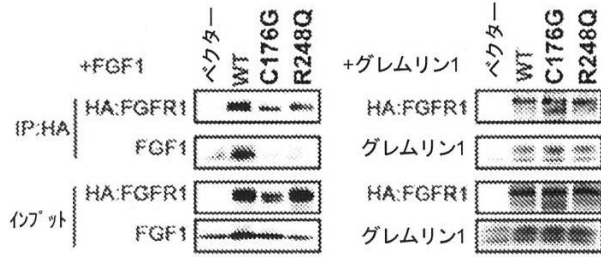


FIG. 9Q

【図 9 R】

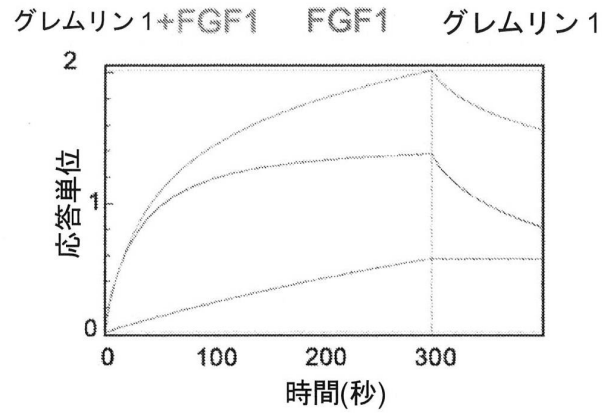


FIG. 9R

【図 9 S】

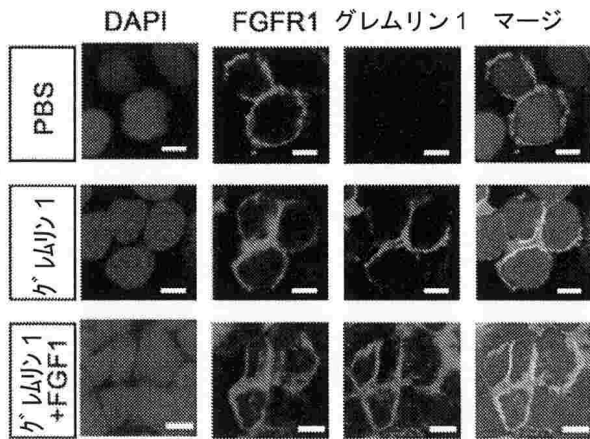


FIG. 9S

【図 9 T】

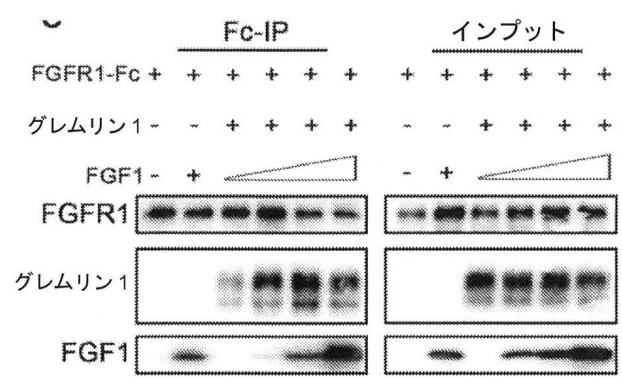


FIG. 9T

10

20

30

40

50

【図 9 U】

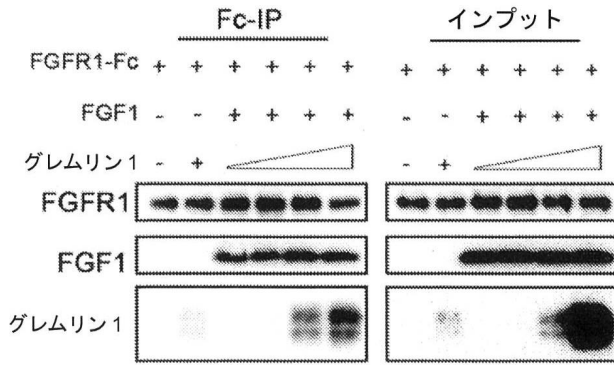


FIG. 9U

【図 9 V】



FIG. 9V

10

【図 10 A】

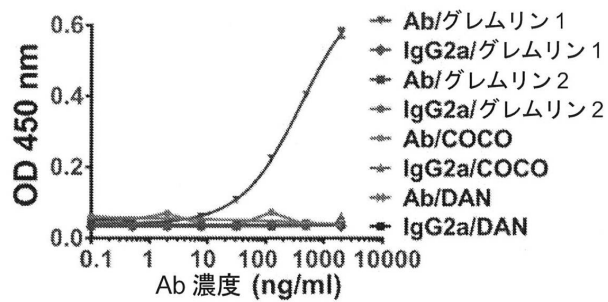


FIG. 10A

【図 10 B】

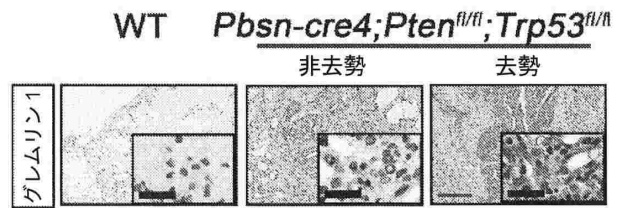


FIG. 10B

20

30

40

50

【図 10 C】

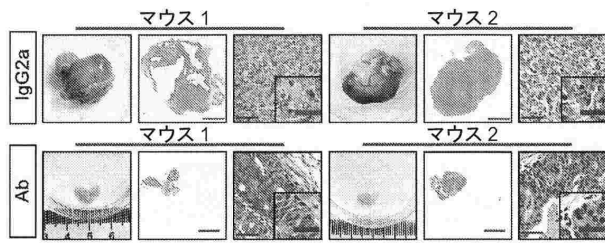


FIG. 10C

【図 10 D】

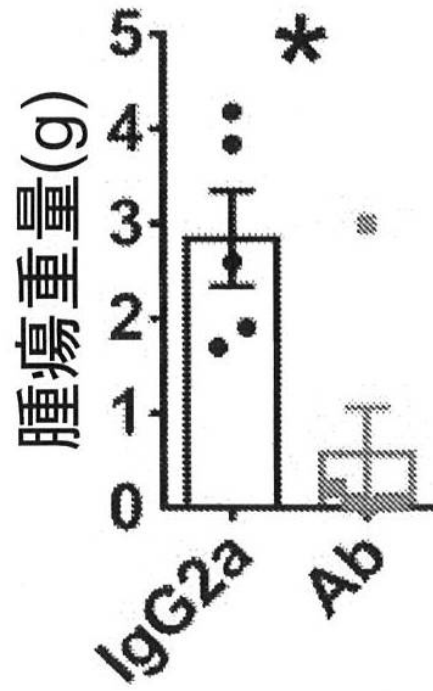


FIG. 10D

【図 10 E】

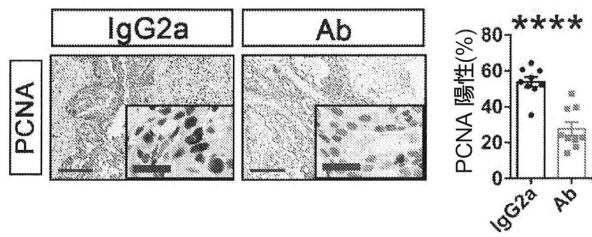


FIG. 10E

【図 10 F】

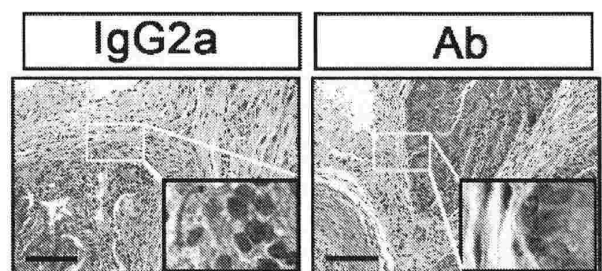


FIG. 10F

【図 10 G】

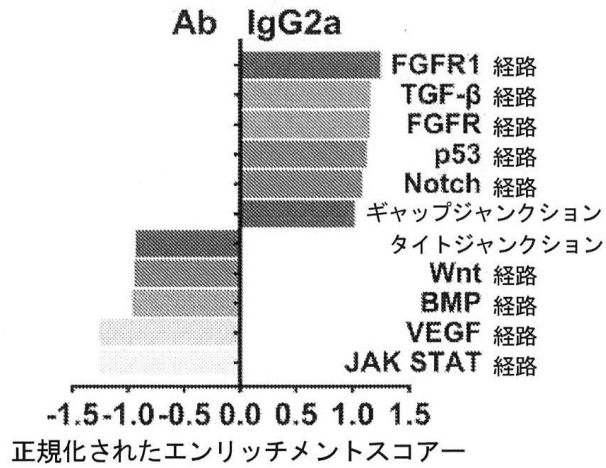


FIG. 10G

【図 10 H】

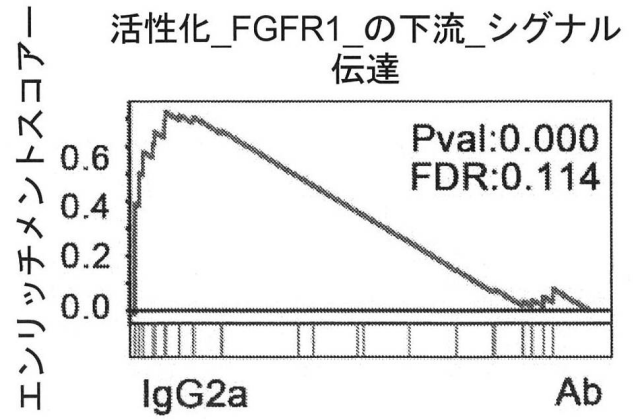


FIG. 10H

【図 10 I】

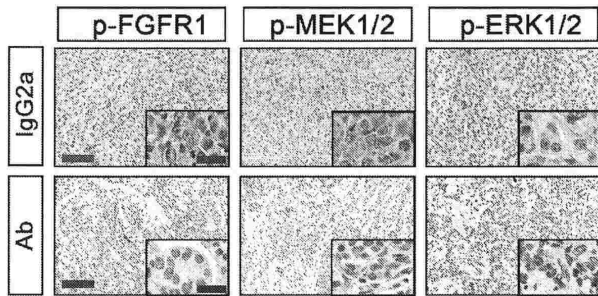


FIG. 10I

【図 10 J】

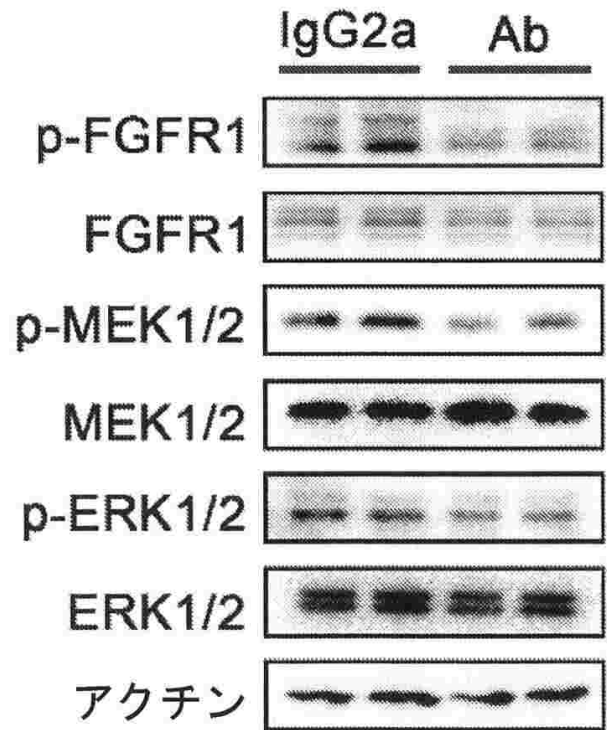


FIG. 10J

10

20

30

40

50

【図 10 K】

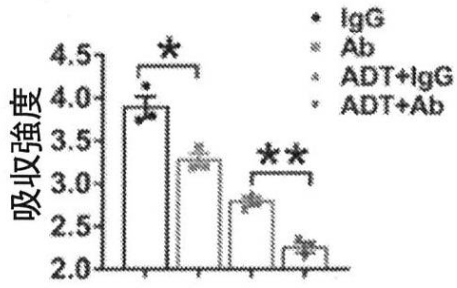


FIG. 10K

【図 10 L】

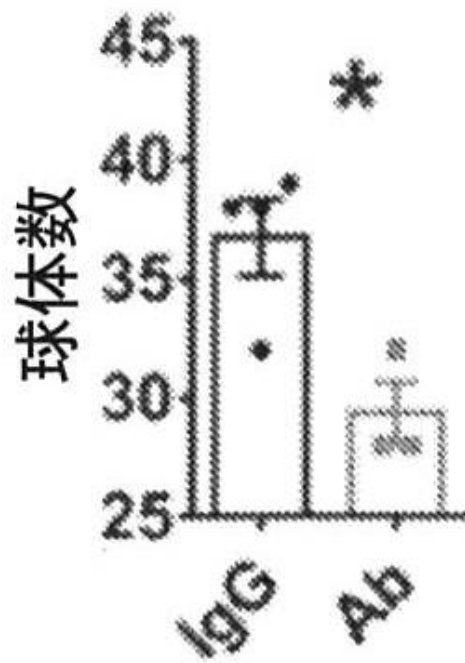


FIG. 10L

【図 10 M】

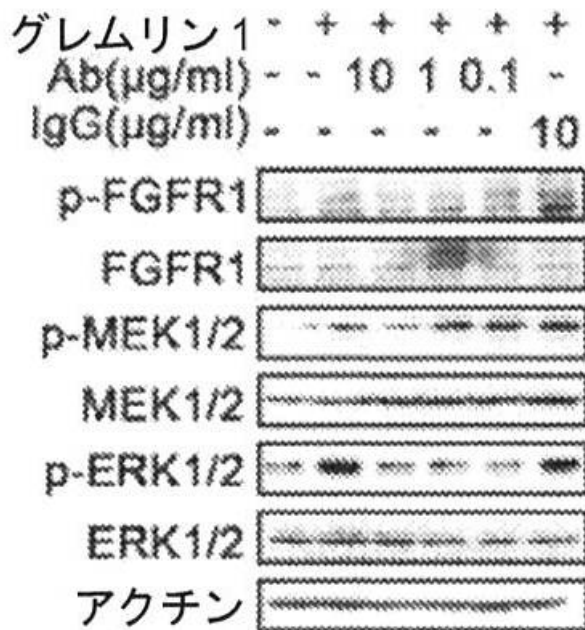


FIG.10M

【図 10 N】

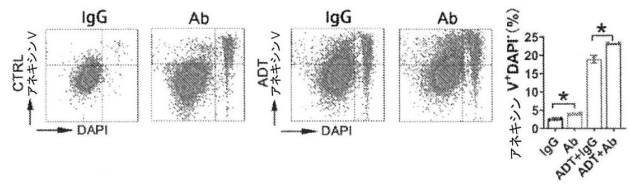


FIG.10N

10

20

30

40

50

【図 1 0 0】

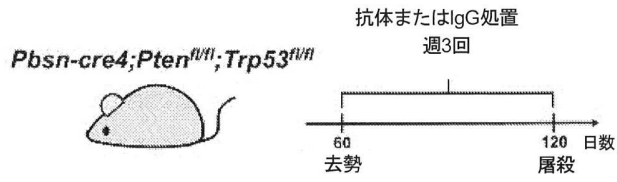


FIG.100

【図 1 1 A】

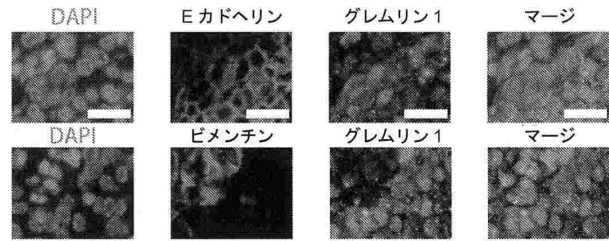


FIG. 11A

10

【図 1 1 B】

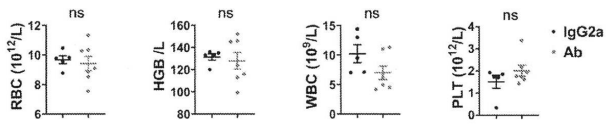


FIG. 11B

【図 1 1 C】

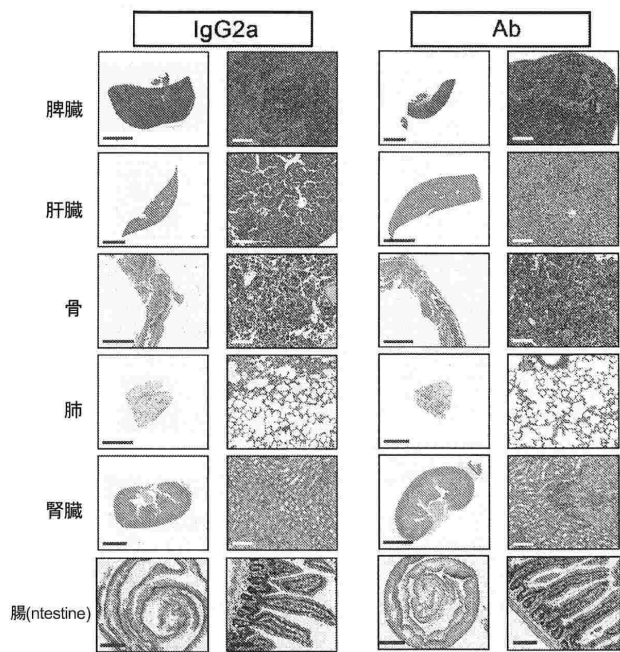


FIG. 11C

20

30

40

50

【図 1 2 A】

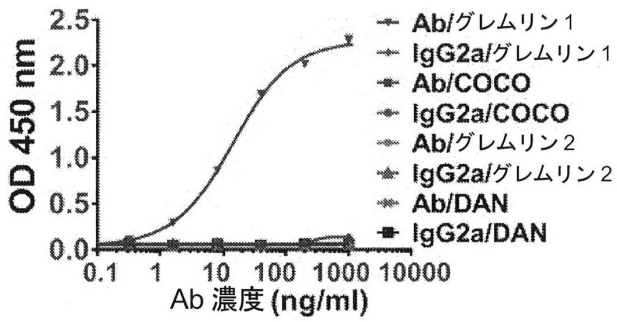


FIG. 12A

【図 1 2 B】

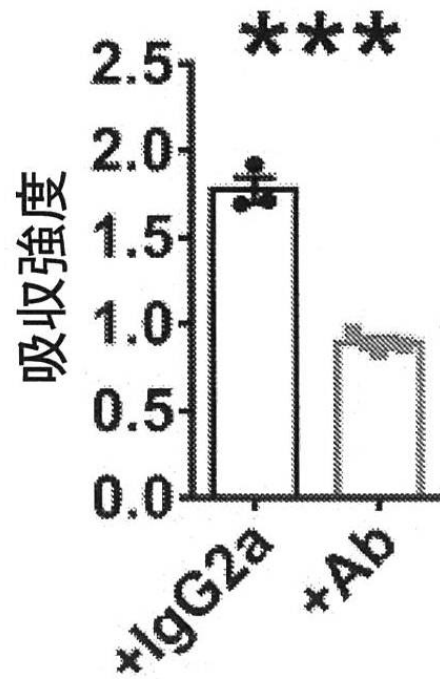


FIG. 12B

【図 1 2 C】

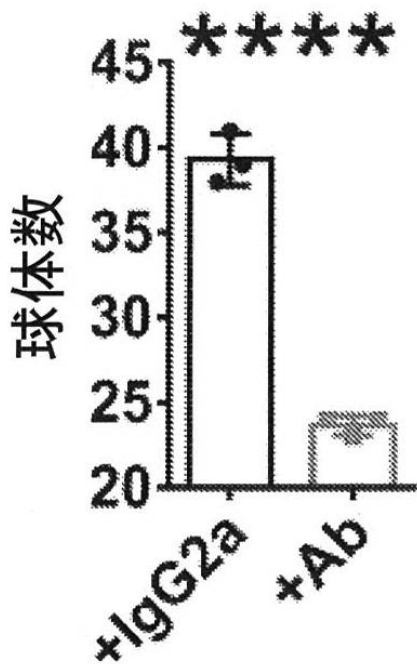


FIG. 12C

【図 1 2 D】

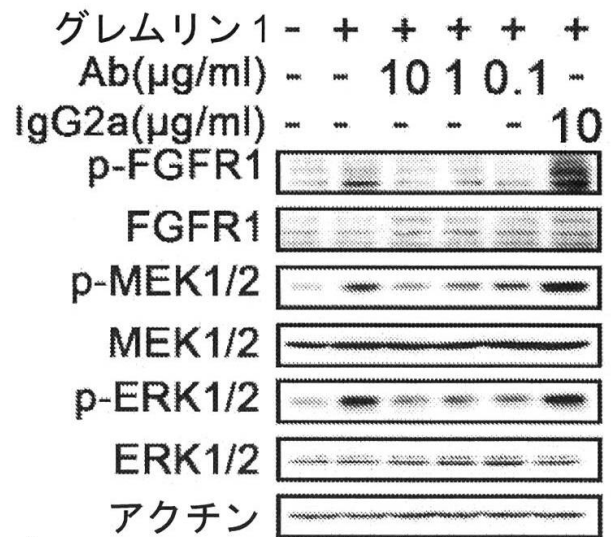


FIG. 12D

10

20

30

40

50

【図 12 E】

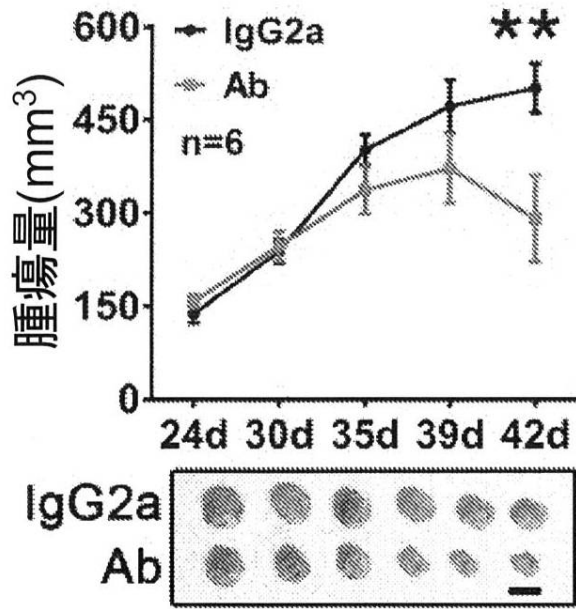


FIG. 12E

【図 12 F】

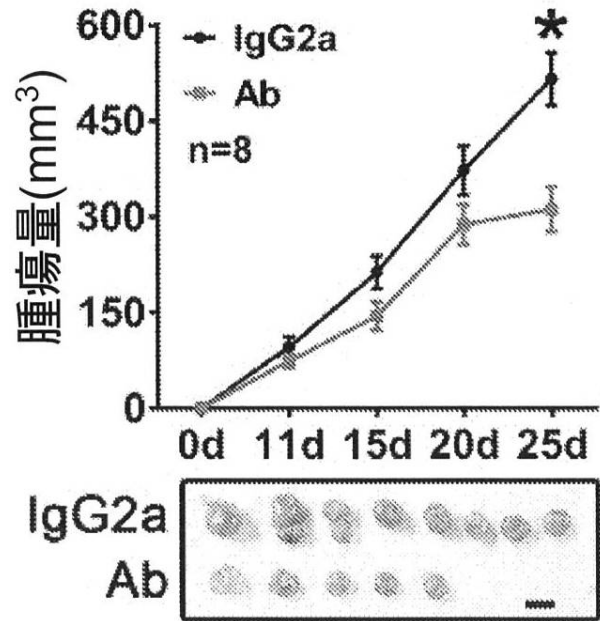


FIG. 12F

【図 13】

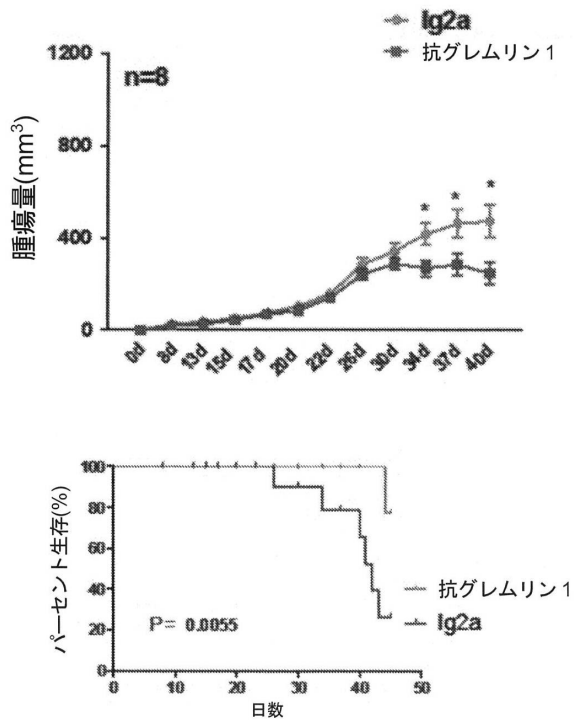


FIG. 13

【図 14 A】

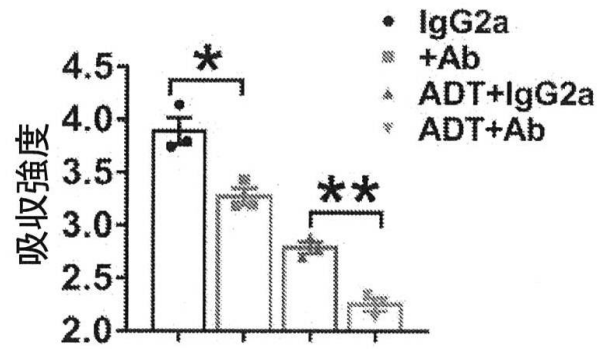


FIG. 14A

10

20

30

40

50

【図 1 4 B】

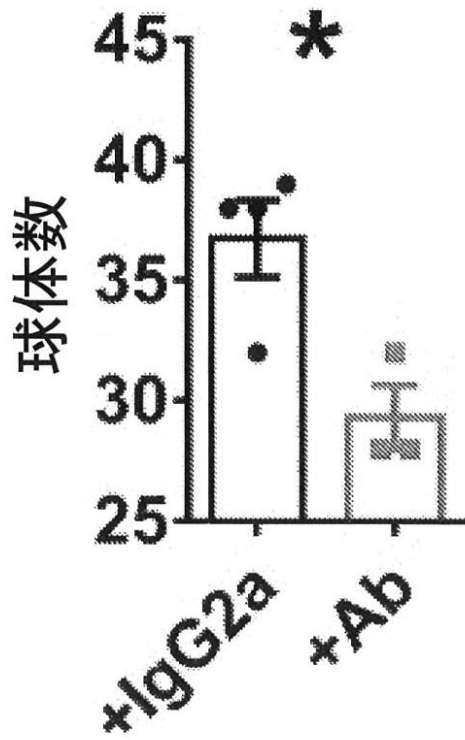


FIG. 14B

【図 1 4 C】

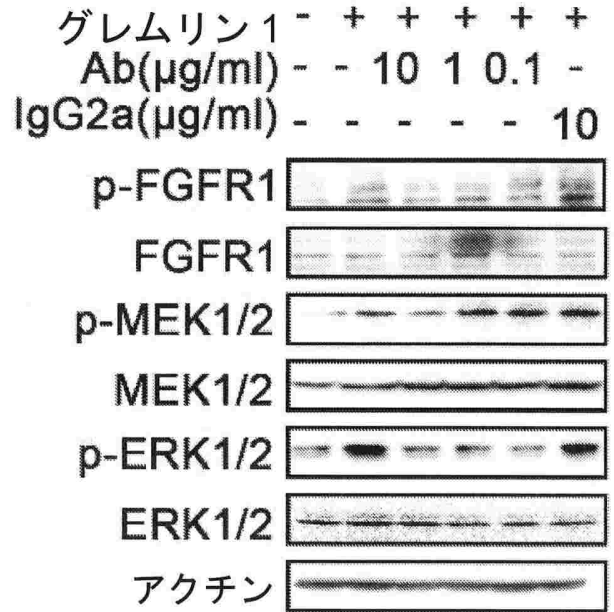


FIG. 14C

【図 1 4 D】

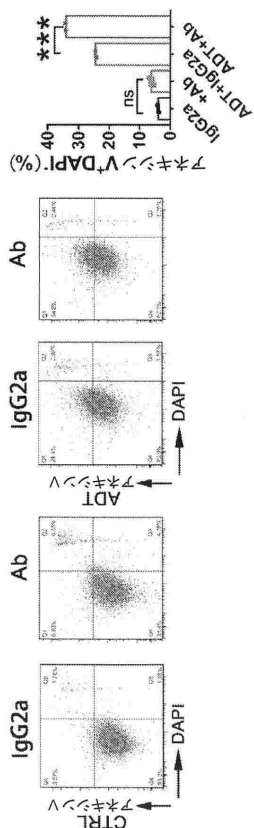


FIG. 14D

【図 1 5】

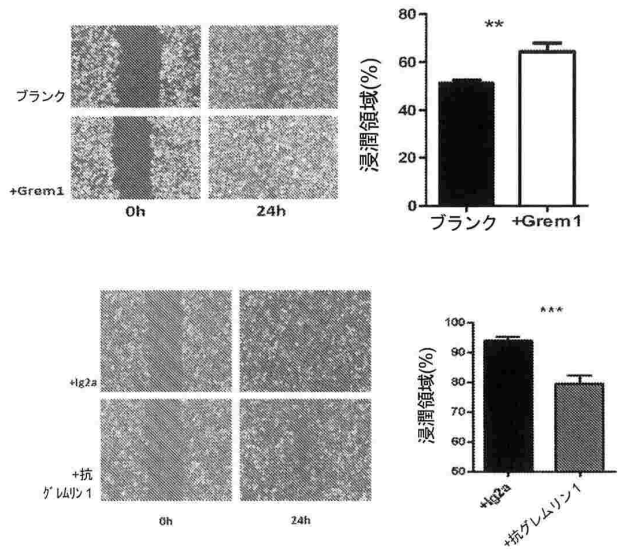


FIG. 15

10

20

30

40

50

【図 16 A】

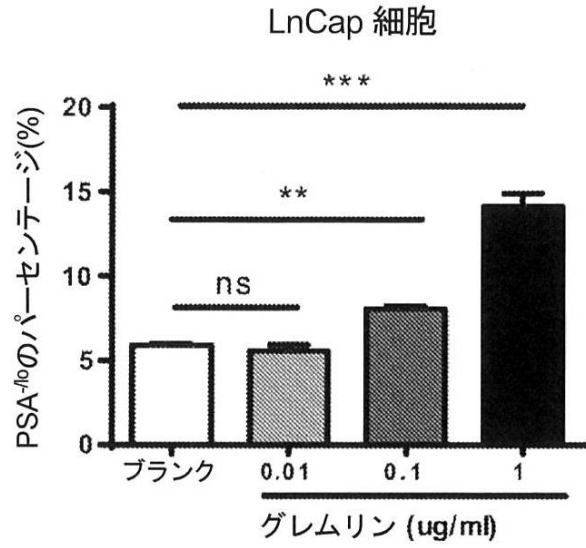


FIG. 16A

【図 16 B】

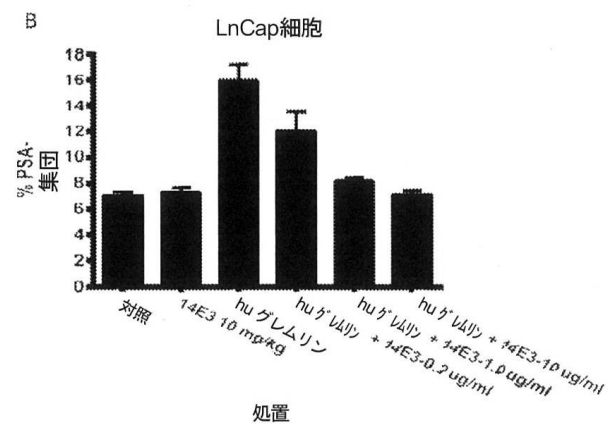


FIG. 16B

【図 16 C】

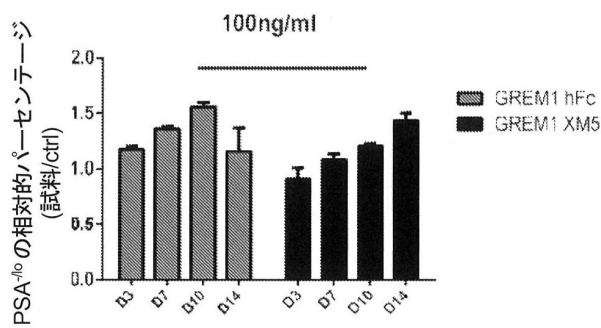


FIG. 16C

【図 17 A】

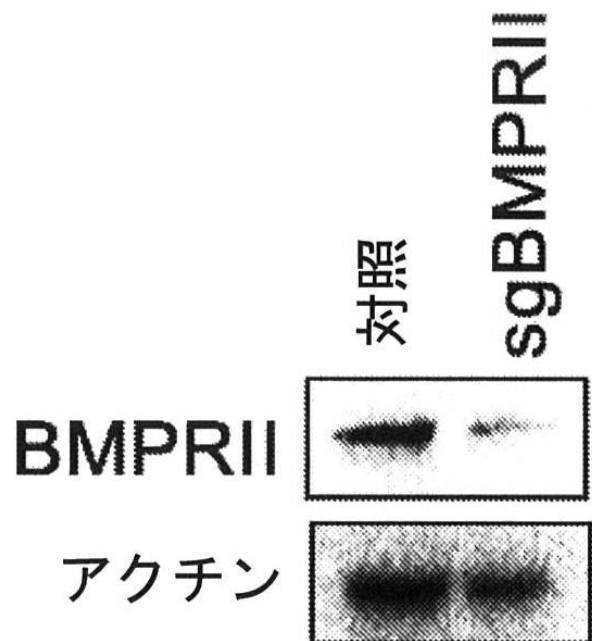


FIG. 17A

10

20

30

40

50

【図 17 B】

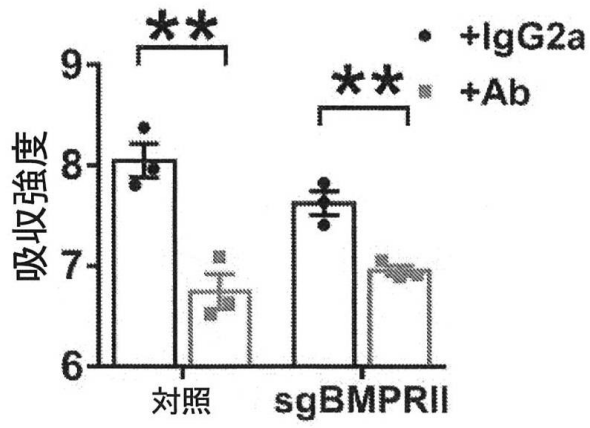


FIG. 17B

【図 17 C】

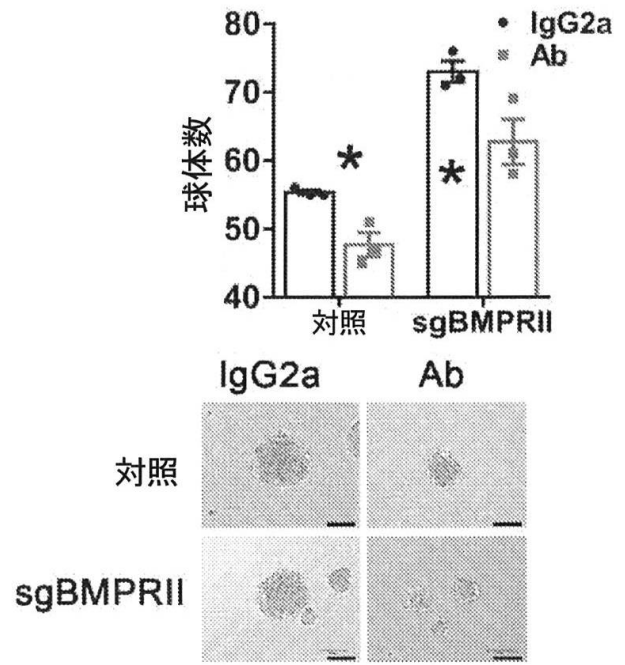


FIG. 17C

【図 18 A】

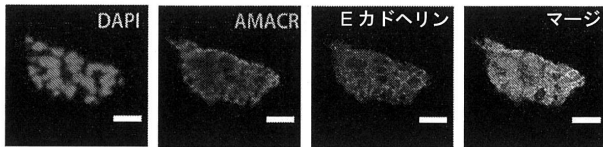


FIG. 18A

【図 18 B】

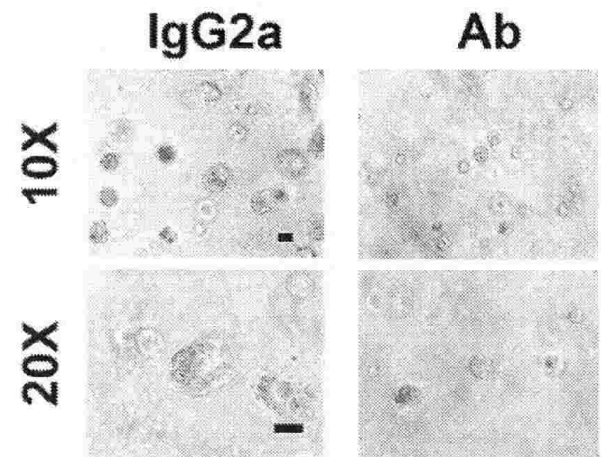


FIG. 18B

【図 18 C】

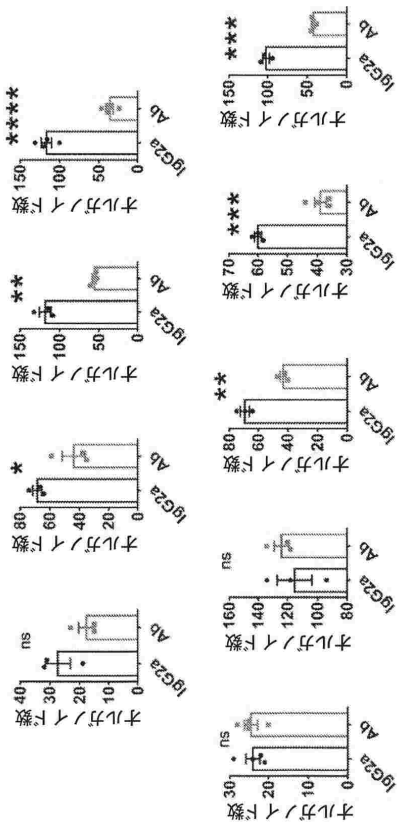


FIG. 18C

【図 18 D】

患者	患者1	患者2	患者3	患者4	患者5	患者6	患者7	患者8	患者9
PSA	13.5	10.13	6	22.284	>154	501.54	36.6	6.2	>154
グリーンソンスコア	4+3	4+3	4+4	4+4	4+3	4+4	4+5	5+4	4+5
病理病期	T3aN0M0	T3aN0M0	T4N1M1b	T3bN1M0	T4N1M1b	T3bN1M0	T3bN0M0	T3bN0M0	T4N1M1b

FIG. 18D

【図 19 A】

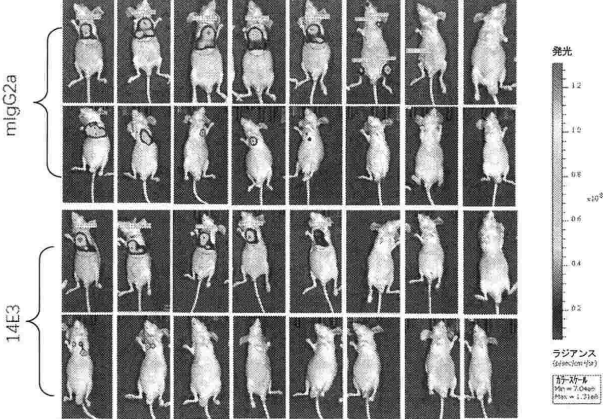


FIG. 19A

【図 19 B】

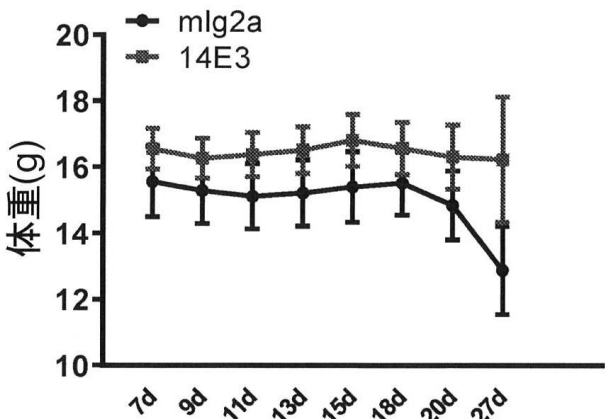


FIG. 19B

10

20

30

40

50

【図 19 C】

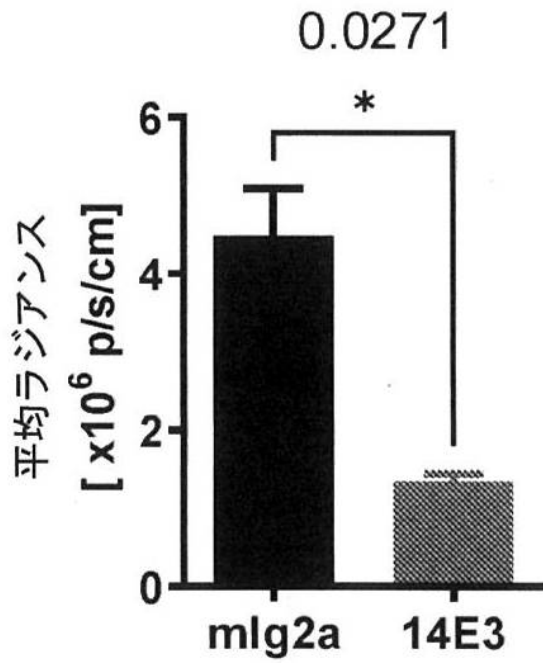


FIG. 19C

【図 19 D】

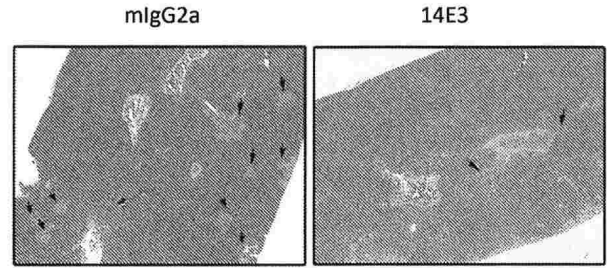


FIG. 19D

【図 19 E】

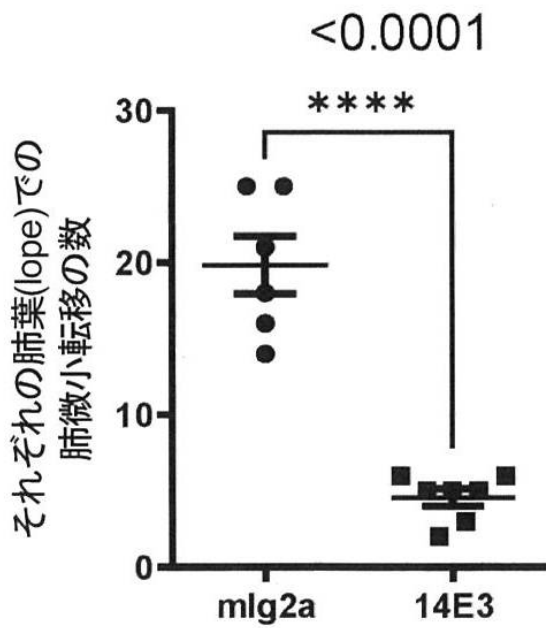


FIG. 19E

10

20

30

40

50

【配列表】

2024513692000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/080297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/395(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K, G01N, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Databases: CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VEN, NCBI, ENSEMBLE, Genbank, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System Keywords: Grem1, Gremlin-1, antagonist, antibody, androgen receptor, AR, negative, cancer, tumor, prostate cancer, enzalutamide, PTEN, p53, FGFR1, sequence search of SEQ ID NOs: 1-6, 11-16, 21-26, 31-36		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019243801 A1 (UCB BIOPHARMA SRL et al.) 26 December 2019 (2019-12-26) see the description, page 1, lines 5-10; page 17, line 22 to page 18, line 29; page 25, lines 7-9; page 54, line 27 to page 55, line 5; page 58, lines 13-15	1-24, 31, 56-62
A	CN 110099924 A (UCB BIOPHARMA SPRL, et al.) 06 August 2019 (2019-08-06) see the whole document	1-76
A	CN 104321342 A (SNU R & DB FOUND, et al.) 28 January 2015 (2015-01-28) see the whole document	1-76
A	US 2018208586 A1 (THE ROYAL INSTITUTION FOR THE ADVANCEMENT OF LEARNING/MCGILL UNIV) 26 July 2018 (2018-07-26) see the whole document	1-76
A	Ulrike Neckmann, et al. "GREM1 is associated with metastasis and predicts poor prognosis in ER-negative breast cancer patients" <i>Cell Commun Signal</i> , Vol. 17, No. 140, 06 November 2019 (2019-11-06), pages 1-17	1-76
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
01 June 2022		16 June 2022
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		YUAN, Shi
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 62411598

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/080297

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/080297

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: **1-62,77**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter of claims 1-62 relate to the method of treating cancer, GREM1-related disease, inhibiting activity or increasing sensitivity of cancer therapy in a subject. The dependent claim 77 relates to a method of determining likelihood of responsiveness or detecting presence or amount of GREM1 in a sample from a subject, and comprises a further step of administering a therapeutically effective amount of a GREM1 antagonist to the subject. Thus the subject matter of claims 1-62 and 77 relates to a treatment method of the human/animal body, and therefore, according to the criteria set out in Rule 39.1(iv), relates to subject matter for which an international search is not required. The subject matter of claims 1-62 might be reasonably expected to be directed to use of a therapeutically effective amount of GREM1 antagonist in the manufacture of a medicament for treating cancer, disease, inhibiting activity or increasing sensitivity of cancer therapy in a subject.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/080297

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019243801	A1	26 December 2019	KR	20210028191	A	11 March 2021
				IL	279347	D0	31 January 2021
				US	2021253688	A1	19 August 2021
				CO	2020015923	A2	10 May 2021
				AU	2019289176	A1	24 December 2020
				JP	2021528400	A	21 October 2021
				CN	112533632	A	19 March 2021
				CL	2020003249	A1	09 July 2021
				SG	11202012312U	A	28 January 2021
				EP	3806898	A1	21 April 2021
				BR	112020025661	A2	23 March 2021
				CA	3102743	A1	26 December 2019
CN	110099924	A	06 August 2019	GB	201621635	D0	01 February 2017
				PE	20191542	A1	23 October 2019
				TN	2019000188	A1	05 October 2020
				TW	201837052	A	16 October 2018
				US	2019330323	A1	31 October 2019
				MX	2019006630	A	21 August 2019
				CA	3045742	A1	28 June 2018
				EA	201991511	A1	29 November 2019
				RU	2019122648	A	19 January 2021
				CO	2019006073	A2	19 June 2019
				EC	SP19051912	A	31 July 2019
				MA	47669	A	08 January 2020
				WO	2018115017	A2	28 June 2018
				AR	110394	A1	27 March 2019
				AU	2017384471	A1	13 June 2019
				EP	3555129	A2	23 October 2019
				CL	2019001715	A1	29 November 2019
				PH	12019501319	A1	02 March 2020
				BR	112019010903	A2	01 October 2019
				IL	267287	D0	29 August 2019
CN	104321342	A	28 January 2015	ZA	201903810	B	23 December 2020
				UY	37528	A	31 July 2018
				JP	2020511946	A	23 April 2020
				US	2021163586	A1	03 June 2021
				KR	20190093658	A	09 August 2019
				KR	20130105541	A	25 September 2013
				US	2015158938	A1	11 June 2015
				JP	2015512894	A	30 April 2015
				AU	2013232855	A1	02 October 2014
CN	104321342	A	28 January 2015	EP	2826790	A1	21 January 2015
				TR	201905395	T4	21 May 2019
				ES	2720617	T3	23 July 2019
				WO	2013137686	A1	19 September 2013
US	2018208586	A1	26 July 2018	CA	3030582	A1	26 January 2017
				EP	3325473	A1	30 May 2018
				WO	2017011920	A1	26 January 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 27/06 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 9/12 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 K 31/167 (2006.01)
 A 6 1 K 31/277 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4166 (2006.01)
 A 6 1 K 31/58 (2006.01)
 A 6 1 K 38/08 (2019.01)
 A 6 1 K 31/4439 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4155 (2006.01)
 C 0 7 K 16/24 (2006.01)
 G 0 1 N 33/68 (2006.01)
 G 0 1 N 33/574 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 0 7 K 16/26 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 27/06
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 9/12
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 K 31/167
 A 6 1 K 31/277
 A 6 1 K 31/4166
 A 6 1 K 31/58
 A 6 1 K 38/08
 A 6 1 K 31/4439
 A 6 1 K 31/4155
 C 0 7 K 16/24
 G 0 1 N 33/68
 G 0 1 N 33/574 A
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/13
 C 0 7 K 16/26

4 H 0 4 5

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

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(74)代理人 100188374

弁理士 一宮 維幸

(72)発明者 チュー, ヘ

中華人民共和国 シャンハイ 2 0 0 0 3 1, シュフイ・ディストリクト, ファシャン・ロード 1
 9 5 4, メドーエックス・アカデミー, スイート 3 2 7

(72)発明者 キアン, シュエミン

中華人民共和国 ジャンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ, シンファー・ストリート 2 1 8, ビー 6
 - 5 0 1

(72)発明者 ガオ, ウェイキアン

中華人民共和国 シャンハイ 2 0 0 0 3 1, シュフイ・ディストリクト, ファシャン・ロード 1
 9 5 4, メドーエックス・アカデミー, スイート 3 2 7

(72)発明者 チェン, チャピン

中華人民共和国 シャンハイ 2 0 0 0 3 1, シュフイ・ディストリクト, ファシャン・ロード 1
 9 5 4, メドーエックス・アカデミー, スイート 3 2 7

(72)発明者 ワン, ジンミン

中華人民共和国 シャンハイ 2 0 0 0 3 1, シュフイ・ディストリクト, ファシャン・ロード 1

9 5 4, メド・エックス・アカデミー, スイート 3 2 7
(72)発明者 サン, ディ
中華人民共和国 ジャンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ, シンファー・ストリート 2 1 8, ビー 6
ー 5 0 1

F ターム (参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 FB02 FB03
4C084 AA13 AA17 AA19 AA20 BA01 BA18 BA23 BA32 CA59 NA05
NA14 ZA331 ZA332 ZA421 ZA422 ZA591 ZA592 ZA811 ZA812 ZA961 ZA962
ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZC411 ZC412 ZC751
4C085 AA13 AA16 BB11 BB31 BB36 BB41 CC21 CC22 DD62 EE01
EE03
4C086 AA01 AA02 BC36 BC38 BC39 DA12 EA16 GA07 GA08 MA01
MA02 MA04 NA05 NA14 ZA33 ZA42 ZA59 ZA81 ZA96 ZB21 ZB26
ZC41 ZC75
4C206 AA01 AA02 GA01 GA31 JA19 KA01 MA02 MA04 NA05 ZA33
ZA42 ZA59 ZA81 ZA96 ZB21 ZB26 ZC41 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74