

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7565219号
(P7565219)

(45)発行日 令和6年10月10日(2024.10.10)

(24)登録日 令和6年10月2日(2024.10.2)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N Z N A
A 6 1 K	31/513(2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	31/282(2006.01)	A 6 1 K	31/282	
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	31/519(2006.01)	A 6 1 K	31/519	
請求項の数 14 (全98頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-570158(P2020-570158)	(73)特許権者	514232085	
(86)(22)出願日	令和1年6月18日(2019.6.18)		ユーシービー バイオファルマ エスアー	
(65)公表番号	特表2021-528400(P2021-528400		ルエル	
	A)		ベルギー国 1 0 7 0 ブリュッセル アレ	
(43)公表日	令和3年10月21日(2021.10.21)		デ ラ レシエルシエ 6 0	
(86)国際出願番号	PCT/GB2019/051699	(73)特許権者	507226592	
(87)国際公開番号	WO2019/243801		オックスフォード ユニヴァーシティ イ	
(87)国際公開日	令和1年12月26日(2019.12.26)		ノヴェーション リミテッド	
審査請求日	令和4年6月2日(2022.6.2)		英国 オーエックス2 0ジェイビー オ	
(31)優先権主張番号	1809946.5		ックスフォード ウェスト ウェイ3 バ	
(32)優先日	平成30年6月18日(2018.6.18)		クストン コート	
(33)優先権主張国・地域又は機関		(73)特許権者	520490554	
	英国(GB)		ザ ユニヴァーシティー オヴ アデレード	
(31)優先権主張番号	1815694.3		オーストラリア国、サウス オーストラ	
(32)優先日	平成30年9月26日(2018.9.26)		リア 5 0 0 5、アデレード	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 がんを予防及び治療するためのGREMLIN-1アンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

間質性GREM1を過剰発現しているがんの治療又は予防剤であって、配列番号4／5／6／7／8／9若しくは配列番号3／5／6／7／8／9の重鎖相補性決定領域(HCDR)1／HCDR2／HCDR3／軽鎖相補性決定領域(LCDR)1／LCDR2／LCDR3の配列組み合わせを含む抗Gremlin-1抗体を含む、剤。

【請求項2】

- (a) 前記がんが、固形がんである、
- (b) 前記がんが、結腸直腸がん、多発性骨髄腫、膵臓がん、膀胱がん、乳がん、肺がん、胃がん、十二指腸がん、食道がん、頭頸部がん、前立腺がん、神経膠腫、子宮内膜がん、肝臓がん、脾臓がん、骨常在がん、及び骨肉腫から選択され、任意で、
- (i) 前記がんは結腸直腸がんであり、さらに任意で、前記結腸直腸がんは間葉系サブタイプ結腸直腸がんである、
- (ii) 前記がんは多発性骨髄腫である、又は
- (iii) 前記がんは乳がんである、
- (c) 前記がんが、上皮GREM1を過剰発現しており、任意で、前記がんはGREM1起始がんである、
- (d) 前記がんが、播種性がんである、並びに／或いは
- (e) 前記がんが、確立されたがんであり、任意で、前記確立されたがんが、確立された結腸直腸がんである、

請求項 1 に記載の剤。

【請求項 3】

前記抗 Gremlin-1 抗体が、配列番号 10 若しくは 12 の重鎖可変領域 (HCV R) 配列、及び／又は配列番号 11 若しくは 13 の軽鎖可変領域 (LCVR) 配列、又はこれらと少なくとも 95 % 同一である配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の剤。

【請求項 4】

(a) 前記抗 Gremlin-1 抗体が、配列番号 10 / 11 若しくは 12 / 13 又はこれらと少なくとも 95 % 同一である配列の HCV R 及び LCVR 配列対を含む、並びに／或いは

(b) 前記抗 Gremlin-1 抗体が、配列番号 14 / 15、16 / 17、18 / 19、22 / 23、28 / 29、若しくは 30 / 31、32 / 33、34 / 35 の重鎖及び軽鎖対、又はこれらと少なくとも 95 % 同一である配列を含む、請求項 3 に記載の剤。

【請求項 5】

(a) 前記抗体が、キメラ抗体、又はヒト抗体である、並びに／或いは

(b) 前記抗体が、Fab、改変 Fab、Fab'、改変 Fab'、F(ab₂)Fv、又は scFv である、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の剤。

【請求項 6】

前記抗体が、薬学的に許容し得るアジュバント及び／又は担体を更に含む医薬組成物に含まれる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の剤。

【請求項 7】

(a) 前記剤が、追加の抗がん剤を別々、逐次、又は同時に投与することと組み合わせて使用され、前記追加の抗がん剤が 5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、フォリン酸、セツキシマブ、ニボルマブ、ペバシズマブ、抗 CD38 抗体、抗 SLAMF7 抗体、抗 IL-6 抗体、及び iMID から選択される、並びに／或いは

(b) 前記剤が、別々、逐次、又は同時に放射線療法を行うことと組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の剤。

【請求項 8】

抗 CD38 抗体がダラツムマブ、抗 SLAMF7 抗体がエロツズマブ、抗 IL-6 抗体がシルツキシマブ、及び／又は iMID がイスレナリドミド／ボマレノミドである、請求項 7 に記載の剤。

【請求項 9】

(a) 前記がんが家族性がんである、及び／又は

(b) 前記抗 Gremlin-1 抗体が、がんに関連するポリポーススを予防するために使用される、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の剤。

【請求項 10】

がん又はがんに関連するポリポーススが、家族性腺腫様ポリポースス (FAP) 又は遺伝性混合ポリポースス症候群 (HMP S) である、請求項 9 に記載の剤。

【請求項 11】

抗がん薬を含有する、間質性 GREM1 を過剰発現しているがんの治療剤であって、請求項 1 及び 3 ~ 5 のいずれか一項に規定される抗 Gremlin-1 抗体を別々、逐次、又は同時に投与することと組み合わせて使用され、前記抗がん薬が、5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、フォリン酸、セツキシマブ、ニボルマブ、ペバシズマブ、抗 CD38 抗体、抗 SLAMF7 抗体、抗 IL-6 抗体、及び iMID から選択され、任意で、前記がんが、請求項 2 に規定されるものである、前記治療剤。

【請求項 12】

抗 CD38 抗体がダラツムマブ、抗 SLAMF7 抗体がエロツズマブ、抗 IL-6 抗体がシルツキシマブ、及び／又は iMID がイスレナリドミド／ボマレノミドである、請求

10

20

30

40

50

項 1 1 に記載の剤。

【請求項 1 3】

請求項 1 及び 3 ～ 5 のいずれか一項に規定される抗 G r e m l i n - 1 抗体及び追加の抗がん薬を含む、組成物又はキットであって、間質性 G R E M 1 を過剰発現しているがんの治療又は予防用であり、前記追加の抗がん剤が 5 - フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、フォリン酸、セツキシマブ、ニボルマブ、ペバシズマブ、抗 C D 3 8 抗体、抗 S L A M F 7 抗体、抗 I L - 6 抗体、及び i M I D から選択される、組成物又はキット。

【請求項 1 4】

抗 C D 3 8 抗体がダラツムマブ、抗 S L A M F 7 抗体がエロツズマブ、抗 I L - 6 抗体がシルツキシマブ、及び／又は i M I D がイスレナリドミド／ボマレノミドである、請求項 1 3 に記載の組成物又はキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、がんの治療方法における使用のための抗 G R E M 1 アンタゴニストに関する。該がんは、典型的には間質を有する固形がんであり、典型的には間質性 G R E M 1 を過剰発現している。該がんでは、上皮 G R E M 1 を過剰発現している場合もある。本発明は、更に、G R E M 1 アンタゴニストと追加の抗がん（例えば、化学療法）剤との併用療法、及び関連する組成物に関する。本発明は、また、間質性 G R E M 1 の過剰発現に基づく、がんの検出、予後判定、及び治療の選択に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

G r e m l i n - 1 (D r m 及び C K T S F 1 B 1 及び G R E M 1 としても知られている) は、(特に C e r b e r u s 及び D a n と共に) シスチンノット分泌タンパク質の D A N ファミリーの一部を形成する 1 8 4 アミノ酸の糖タンパク質である。G R E M 1 は、恐らく V E G F R 2 のアゴニズムを介して血管新生を促進する役割を果たすことが報告されているに加えて、B M P - 2、4、及び 7 に結合し、シグナル伝達能力を阻害する。G R E M 1 は主に発生中に役割を果たし、腎臓形成中及び肢芽形成中に極めて重要である。これら極めて重要な役割を果たしていることから、マウスにおいて G R E M 1 ホモ欠損は胚性致死になる。

【0 0 0 3】

成体期には、G R E M 1 のレベルの上昇は、T G F β レベルの関連する上昇と共に B M P 2、4、及び 7 のシグナル伝達が減少する特発性肺線維症及び肺動脈高血圧症と関連している。糖尿病性腎症と慢性移植腎症の両方において、G R E M 1 の発現は線維症スコアと相関している。

【0 0 0 4】

G R E M 1 のレベルの上昇は、特に強皮症、糖尿病性腎症、神経膠腫、頭頸部がん、前立腺がん、及び結腸直腸がんにも関連している (S n e d d o n e t a l ; G u a n e t a l) 。 G R E M 1 は、インビトロでがん細胞の浸潤及び増殖を活性化することが示されており、子宮がん、子宮頸がん、肺がん、卵巣がん、腎臓がん、乳がん、結腸がん、膵臓がん、及び肉腫において役割を果たしていると考えられる。

【0 0 0 5】

がんの治療及び予防における使用のための有効な治療法を同定することが必要とされている。

【発明の概要】

【0 0 0 6】

本発明者らは、驚くべきことに、G R E M 1 アンタゴニストが、結腸直腸がん及び多発性骨髄腫を含む間質及び／又は上皮において G R E M 1 が過剰発現している新形成に対して有効な治療及び予防剤であることを示した。本発明者らは、これら結果に基づいて、間

10

20

30

40

50

質で G R E M 1 が過剰発現している他のがんを含むがんの治療及び予防において G R E M 1 アンタゴニストが汎用的に有用であると予想する。本明細書で提供されるインビボにおける結果は、G R E M 1 アンタゴニストの投与による様々なマウス腫瘍モデルにおける新形成の誘導の長期的な予防、及び G R E M 1 アンタゴニストの投与による既存の腫瘍に対する顕著な治療的影響を明らかにする。従って、本発明者らの知見は、標準的な化学療法剤に対して抵抗性のあるがんを含むがんの予防及び治療に対する新たなアプローチを提供する。

【0007】

従って、本発明の第1の態様では、がんを治療又は予防する方法において使用するための抗 G R E M 1 アンタゴニストが提供される。

【0008】

本発明の更なる態様では、抗 G R E M 1 アンタゴニストを別々、逐次、又は同時に投与することを含む、がんを治療する方法において使用するための抗がん剤が提供される。

【0009】

本発明の別の態様では、治療上有効な量の抗 G R E M 1 アンタゴニストを、それを必要としている被験体に投与することを含む、がんを治療する方法が提供される。

【0010】

本発明の更に別の態様では、抗 G R E M 1 アンタゴニスト及び追加の抗がん剤を含む組成物又はキットが提供される。

【0011】

本発明の更なる態様では、患者におけるがんを検出する方法であって、該患者における間質での G R E M 1 の発現を測定することを含み、間質での G R E M 1 の過剰発現が、該患者ががんを有していることを示す方法が提供される。

【0012】

本発明の更に別の態様では、患者におけるがんの予後を判定する方法であって、該がんにおいて G R E M 1 が間質で過剰発現しているか否かを判定することを含み、該がんにおける間質での G R E M 1 の過剰発現が、G R E M 1 が間質で正常に発現している状況よりも該患者の予後が悪いことを示す方法が提供される。

【0013】

本発明の別の態様では、がんを有しているか、又はがんを有している若しくはがんを発症するリスクがあると疑われる患者が、化学療法剤による治療に応答する可能性があるか否かを判定する方法であって、該患者における間質での G R E M 1 の発現を測定し、それによって、該患者が該化学療法剤による治療に応答する可能性があるか否かを予測することを含む方法が提供される。

【0014】

本発明の更に別の態様では、がんを有しているか、又はがんを有している若しくはがんを発症するリスクがあると疑われる患者が、G R E M 1 アンタゴニストによる治療に応答する可能性があるか否かを判定する方法であって、該患者における間質での G R E M 1 の発現を測定し、それによって、該患者が該 G R E M 1 アンタゴニストによる治療に応答する可能性があるか否かを予測することを含む方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】 H E K - I D 1 レポーター遺伝子アッセイにおける免疫由来抗体のシグナル回復率。

【図2】 H E K - I D 1 レポーター遺伝子アッセイにおけるライブラリ由来抗体のシグナル回復率。

【図3】 ヒト G r e m l i n (図3A) 及びマウス G r e m l i n (図3B) の滴定を用いた H E K - I D 1 レポーター遺伝子アッセイの結果、並びに B M P のシグナル伝達の回復における抗体 7 3 2 6 (抗体 P B 3 7 6 として示されている) の効果。

【図4】 G r e m l i n - F a b 複合体の構造モデル。可能性のある B M P 結合領域及び

10

20

30

40

50

F a b エピトープがハイライトされている。

【図5】播種後0日目及び7日目におけるマウス腸陰窩由来のオルガノイド培養物。培地は、組換えタンパク質の補給及び／又は試験抗 G r e m 1 抗体を含有する。E = 上皮成長因子、G = G r e m 1、R = R s p o 1。

【図6】V i l l 1 - G r e m 1 マウス上皮から抽出したタンパク質のウェスタンブロット。30mg / k g の抗体を6週間投与すると、上皮の p S M A D 1、5 のシグナル伝達を回復させることができる。

【図7】抗 G r e m 1 抗体で6週間処理した後の、抗体で処理した V i l l 1 - G r e m 1 動物の表現型。抗体処理によって、小腸の表現型が正常化し、重篤なポリポシスの発症が予防される。抗体処理によって、絨毛異所性陰窩形成が予防され、腸陰窩基部への K i 6 7、S o x 9、E p h B 2、及びリゾチームの染色の適切な制限並びに小腸絨毛の分化細胞における正常 C K 2 0 染色の回復を伴う、細胞運命の決定が正常化される。

【図8】長期間抗 G r e m 1 抗体処理した後の G r e m 1 起始ポリポシスマウスシステムの生存率のカプランマイヤープロット。

【図9】A p c 駆動腫瘍形成における間質 G r e m 1。A. 野生型、及び急性上皮 A p c 喪失に应答して間質 G r e m 1 の顕著なアップレギュレーションを示す V i l l i n - C r e E R T 2 ; A p c f l / f l マウスにおける G r e m 1 I S H。B. A p c M i n マウスにおける間質 G r e m 1 のトランスジェニック欠失は、285日目に変異型 A p c 腫瘍負荷を減少させる。C. 抗 G r e m 1 抗体 (30mg / k g / 週) で長期間処理すると、A p c M i n 腫瘍負荷が減少し、動物の寿命が延長される。

【図10】骨髓腫患者由来の初代間質培養物では G r e m 1 の発現が上昇する。年齢と性別を揃えた健常者ドナー及び骨髓腫患者の骨髓トレフィン由来の間質細胞培養物から R N A を抽出し、リアルタイム P C R により G r e m 1 の発現を解析した。骨髓腫患者コホートでは、健常者ドナーと比較して G r e m 1 の発現が有意に高かった。データは、A c t B に対して正規化した m R N A 発現として示す。(平均 ± S D、** P < 0.001、T 検定、正常; n = 17 及び M M ; n = 15)。

【図11】G r e m 1 発現を、(A) 健常 C 5 7 B l 6 / K a L w R i j . H s d マウス及び B L I を介して検出可能な疾患を有する 5 T G M 1 . B m x 1 M M P C を注射したマウスの緻密骨において分析した。(平均 ± S D、P = 0.1120、T 検定、正常; n = 11、担がん; n = 9)。(B) 担がんマウスの後肢から単離した B M の間質における G r e m 1 の発現は、B L I によって検出したとき、それぞれの肢における腫瘍負荷と相関していた (ピアソン相関; p < 0.05、R 2 = 0.414)。

【図12】G r e m 1 の発現を、(A) 上部 3 μ m のトランスウェルで共培養した 5 T G M 1 . B m x 1 細胞、(B) 接着性間質細胞に直接プレーティングした 5 T G M 1 . 親細胞と共に 24 時間、48 時間、及び 72 時間共培養した後、マウス骨髓由来間質 O P 9 細胞株において分析した。接触培養については、リアルタイム P C R を介した G r e m 1 発現の解析のために、5 T G M 1 . 親 M M P C から F A C S によって O P 9 . G F P + 細胞を選別した。72 時間の共培養後に O P 9 間質細胞において G r e m 1 発現の有意な増加が観察された。データは、A c t B に対する m R N A 発現として示され、培地のみの対照に対して正規化されている。(3つの反復実験の平均 ± S E M、* P < 0.05、t 検定)。

【図13】様々なヒト M M 細胞株と共に 72 時間共培養した正常ヒト間質において、G r e m l i n 1 の発現を分析した。G r e m 1 発現を分析するために採取する前に、間質から M M 細胞を洗浄した。K M S - 1 1 (p = 0.0159) 及び U 2 6 6 (p = 0.0343) の共培養条件では、G r e m l i n 1 発現が有意に増加した (分散分析)。データは、3 人の別々の正常間質ドナーとの共培養物からの反復試験として示され、培地のみの対照に対して正規化されている。

【図14】O P 9 間質細胞における G r e m 1 トランスジーンを発現を (A) R T - P C R 及び (B) ウェスタンブロットにより確認した。G r e m 1 を過剰発現するように改変された O P 9 間質細胞との (C) 細胞接触 (D) トランスウェル共培養において 5 T G M

10

20

30

40

50

1 MM PCは、相対ルシフェラーゼ活性によって測定したとき、OP9ベクターのみの対照との共培養と比較して増殖速度の増大を示した。(3回の反復実験の平均±SEM、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、t検定)。

【図15】(A) 5TGM1.Bmx1 MM PCを注射し、その後、Grem1中和抗体で処理したC57BL6/KaLwRijマウスは、BLIによって示したとき、4週間後にIgG対照で処理したマウスと比較して、全身腫瘍負荷の有意な減少を示した。平均±SEM、 $n = 13$ マウス/群*** $P < 0.0001$ 、一元配置分散分析。(B) 腫瘍細胞注射後4週目に採血したマウスに対してSPEPを行った。血清アルブミンに対するMspイク強度を疾病負荷の尺度として用いた。抗Grem1抗体で処理したマウスは、IgG対照処理を受けたマウスと比較してMspイク強度が有意に低かった。平均±SD、** $P < 0.01$ 、t検定。(C) IgG対照及びGrem1中和抗体で処理したマウスの代表的なBLI腹腔内スキャン画像。

10

【図16】5TGM1 MM細胞を、OP9-Grem1過剰発現細胞又はベクターのみの対照の存在下、3µmトランスウェルにおいて72時間共培養した。5TGM1細胞からの溶解物を、Smads1/5/9のリン酸化についてウェスタンブロットで分析した。5TGM1細胞は、Grem1過剰発現BM間質細胞の存在下で培養した場合、ベクターのみの対照と比較して、Smads1/5/9のリン酸化の減少を示す。Hsp90をローディング対照として用いた。2回の反復実験の代表的な画像。

【図17】BM間質細胞株OP9を、20ng/mLの組換えIL6で72時間処理した後、Grem1の発現について評価した。IL6で刺激したOP9細胞では、Grem1発現の有意な増加が観察された。(3回の反復実験の平均±SEM、** $P < 0.01$)。

20

【図18】(A) 5TGM1.Bmx1 MM PCを接種する前にGrem1中和抗体(Ab7326)の処理を受けたC57BL6/KaLwRijマウスは、BLIによって示したとき、IgG対照(Ab101.4)の処理を受けたマウスと比較して、細胞接種後4週目に全身腫瘍負荷の有意な減少を示した。平均±SEM、 $n = 7 \sim 8$ マウス/群*** $P < 0.0001$ 、一元配置分散分析。(B) 腫瘍細胞注射後4週目に採血したマウスに対してSPEPを行った。血清アルブミンに対するMspイク強度を疾病負荷の尺度として用いた。抗Grem1抗体で処理したマウスは、IgG対照処理を受けたマウスと比較してMspイク強度が有意に低かった。平均±SD、** $P < 0.0001$ 、t検定。(C) 腫瘍細胞接種4週間後のIgG対照及びGrem1中和抗体で処理したマウスの代表的なBLI腹腔内スキャン画像。

30

【図19】Grem1 mRNA発現の定量RT-PCR解析。Grem1遺伝子の発現を、正常酸素圧及び低酸素条件下で48時間培養した後の(A)ヒトMDA-MB-231-TXSA乳がん細胞及び(B)ヒトMF9乳腺線維芽細胞において分析した($n = 1$)。発現レベルはRT-PCRによって測定し、β-アクチンに対して正規化した。トリプリケートのウェルの平均±SD、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、スチューデントの独立t検定。

【図20】Grem1による刺激に応答したヒト乳がん細胞の増殖。MDA-MB-231-TXSA細胞を様々な濃度のrhGrem1で刺激し、正常酸素圧条件下(各対の左側のバー)及び低酸素条件下(各対の右側のバー)で(A)24時間及び(B)48時間培養した。データは、トリプリケートで実施した3つの独立した実験の代表である。平均±SD、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.0005$ 、チューキーの多重比較検定を伴う二元配置分散分析。

40

【図21】間質由来のGrem1に応答したマウス4T1乳がん細胞の増殖。4T1細胞を、Grem1発現細胞又はベクター対照OP9間質細胞と共に72時間共培養した。データは、トリプリケートで実施した3つの独立した実験の代表である。平均±SD、*** $p < 0.0005$ 、スチューデントの独立t-検定(両側)。

【図22】新規抗Grem1抗体(Ab7326)は、マウス4T-1乳がん細胞におけるSmad1/5/9リン酸化のGrem1に媒介される阻害を逆転させる。マウス4T1乳がん細胞を、指定の処理の組み合わせで2時間刺激し、phospho-Smad1

50

／ 5 ／ 9 に対して反応性の抗体を用いたウェスタンブロット分析に供した（上のパネル）。 β -アクチン（下のパネル）はローディング対照として機能した。

【図 23】VG／Min マウスにおける単剤療法及び併用療法の効果。

【図 24】様々な固形腫瘍におけるGrem1の発現。

【図 25】膀胱がんにおけるGrem1発現と生存率（survival implications）との関係。上の線-Grem1低、下の線-Grem1高。

【図 26】膵管腺がんにおけるGrem1発現と生存率との関係。上の線-Grem1低、下の線-Grem1高。

【図 27】卵巣腺がんにおけるGrem1発現と生存率との関係。上の線-Grem1低、下の線-Grem1高。

【図 28】基底細胞乳がんにおけるGrem1発現と生存率との関係。上の線-Grem1低、下の線-Grem1高。

【図 29】肺がんにおけるGrem1発現と生存率との関係。上の線-Grem1低、下の線-Grem1高。

【図 30】抗Grem1抗体で6週間処理した後の、抗体で処理したVil1-Grem1腸の表現型。

【図 31】長期間抗Grem1抗体処理した後のGrem1起始ポリポースマウス系統の生存率のカプランマイヤープロット。（A）Vil1-Grem1マウス。（B）Vil1-Grem1；Apc^{Min}マウス。

【図 32】（A）抗Grem1抗体（30mg/kg/週）による長期処理により、Apc^{Min}腫瘍負荷が減少し、動物の寿命が延長されることを示すカプランマイヤープロット。（B）Apc^{Min}及びGrem1のインサイチュハイブリダイゼーション。

【図 33-1】（生物発光イメージング（BLI）によって示したとき）IgG対照と比較して、（A）腫瘍細胞接種後及び（B）腫瘍細胞接種前にマウスをGrem1中和抗体Ab7326で処理した場合、C57BL6/KaLwRijマウスの腫瘍負荷は後肢の骨において有意に減少する。（C）腫瘍細胞接種後又は（D）腫瘍細胞接種前の設定では、処理群間で脾臓腫瘍負荷の減少傾向が観察される。スチューデントのt検定、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図 33-2】（生物発光イメージング（BLI）によって示したとき）IgG対照と比較して、（A）腫瘍細胞接種後及び（B）腫瘍細胞接種前にマウスをGrem1中和抗体Ab7326で処理した場合、C57BL6/KaLwRijマウスの腫瘍負荷は後肢の骨において有意に減少する。（C）腫瘍細胞接種後又は（D）腫瘍細胞接種前の設定では、処理群間で脾臓腫瘍負荷の減少傾向が観察される。スチューデントのt検定、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図 34】（A）Vil1-Grem1マウス及び（B）Apc^{Min}マウスにおける確立されたポリポースの治療についてのカプランマイヤー生存プロット。中央生存期間：Apc^{Min}ビヒクル：192日（ $n=15$ ）；Apc^{Min}抗Grem1：264.5日（ $n=10$ ）；Vil1-Grem1ビヒクル：242日（ $n=13$ ）；及びVil1-Grem1抗Grem1：477日（ $n=8$ ）、いずれの場合もログランク $p < 0.01$ 。矢印は、処理群における処理開始を示す。

【図 35】4つの処理群、すなわち、（i）未処理のVil1-Grem1マウス（VG＋無処理）；（ii）アゾキシメタンのみで処理したVil1-Grem1マウス（VG＋AOM＋無処理）；（iii）抗Grem1抗体のみで処理したVil1-Grem1マウス（VG＋ α -Grem1）；並びに（iv）アゾキシメタン及び抗Grem1抗体の両方で処理したVil1-Grem1マウス（VG＋AOM＋ α -Grem1）における生存率及び結腸ポリープ負荷を示すプロット。（A）マウスの生存率を示すカプランマイヤー曲線。（B）結腸ポリープ負荷を示すプロット。（C）結腸ポリープの大きさを示すプロット。

【図 36】WT、未処理のVil1-Grem1、及び抗Grem1抗体で処理したVil1-Grem1マウス由来の絨毛におけるFoxl1発現の間質レベル（*： $p < 0$

10

20

30

40

50

．05、**： p 値<0.01）。

【図37】*Vil1-Grem1*マウス小腸における*Foxl1*（緑）及び*Wnt5a*（赤）のマルチプレックス蛍光ISH。DAPIを用いて切片を対比染色した。*Foxl1*及び*Wnt5a*の複合発現が観察された（黄色の領域）。

【図38】野生型、*Vil1-Grem1*及び処理モデルにおける*Wnt*リガンド及びテロサイト細胞マーカーの組織発現。野生型及び*Vil1-Grem1*マウスにおけるISHを用いた（A）*Wnt5A*；（B）*Wnt2B*；及び（C）*Foxl1*テロサイトマーカーの発現、抗体処理後に定量した。

【図39】対照ビヒクル（線D、中央生存期間45日、 $n=13$ ）、並びに週15mg/kg（線A、中央生存期間76.5日、 $n=6$ ）、週週30mg/kg（線B、中央生存期間108日、 $n=15$ 、進行中の実験：2頭のマウスが未だ生存している）及び週60mg/kg（線C、中央生存期間111日、 $n=7$ 、進行中の実験：5頭のマウスが未だ生存している）の抗*Grem1*抗体で処理した*Vil1-Grem1*；*Apc^{Min}*マウスモデルのカプランマイヤー生存曲線。

【図40】確立されたポリボースの予防的療法及び治療についてのカプランマイヤー生存曲線。矢印は、処理群における処理開始時点を示す。（A）*Vil1-Grem1*マウス。ビヒクル（実線）：中央生存期間242日（ $n=13$ ）；抗*Grem1*療法後期処理（点線）：519日、 $n=7$ ；抗*Grem1*早期処理（破線）：540日、（ $n=11$ ）いずれの群についてもログランク $p<0.01$ 。（B）*Apc^{Min}*マウス。ビヒクル（実線）：中央生存期間：192日（ $n=15$ ）；抗*Grem1*後期処理（点線）：261日（ $n=11$ ）；抗*Grem1*早期処理（破線）：424.5日、（ $n=10$ ）、いずれの群についてもログランク $p<0.01$ 。

【図41】全身CA注射によりPyMT-B01乳がん細胞を接種し、*Grem1*中和抗体（Ab7326）で処理したC57BL6マウスは、アイソタイプ対照抗体（Ab101.4）で処理したマウスと比較して、腫瘍負荷が有意に減少した。（A）試験終了時（13日目）のマウスのIVIS BLIイメージングは、Ab101.4処理したマウスと比較して、Ab7326処理したマウスの腫瘍負荷が有意に低いことを示した。平均±SEM、スチューデントの t 検定、Ab101.4； $n=12$ 、Ab7326； $n=13$ 、* $p<0.05$ 。（B）13日目の代表的なBLI画像。

【図42】*Grem1*中和抗体（Ab7326）で処理したPyMT-B01担がんC57BL6マウスは、アイソタイプ対照（Ab101.4）で処理したマウスと比較して、肺及び肝臓への転移が減少した。（A）Ab101.4で処理したマウスと比較した、Ab7326で処理したマウスの肺における腫瘍負荷についてのエキスピボBLIイメージングの結果を示すプロット。（B）Ab7326処理群及びAb101.4処理群における肝腫瘍負荷についてのBLIイメージングの結果を示すプロット。平均±SEM、スチューデントの t 検定、Ab101.4； $n=6$ 、Ab7326； $n=7$ 、* $p<0.05$ 。

【図43】アイソタイプ対照抗体（AbA33）及び*Grem1*中和抗体（UCB6114）で処理したMDA-MB-231担がんNSGマウスのIVIS BLIイメージングの結果を示すプロット。平均±SEM、スチューデントの t 検定、 $n=8$ 、 $p>0.05$

【図44】腫瘍細胞接種後22日目にアイソタイプ対照（AbA33）又は*Grem1*中和抗体（UCB6114）で処理したMDA-MB-231担がんマウスの代表的なIVIS BLI画像。

【図45】アイソタイプ対照抗体（AbA33）又は*Grem1*中和抗体（UCB6114）で処理したMDA-MB-231担がんNSGマウスの肺のエキスピボIVIS BLIイメージングの結果を示すプロット。平均±SEM、スチューデントの t 検定、 $n=8$ 、 $p>0.05$ 。

【図46】全身CA注射によりPC-3前立腺がん細胞を接種し、*Grem1*中和抗体（UCB6114）又はアイソタイプ対照抗体（AbA33）で処理したNSGマウスのBLIイメージングの結果を示すプロット。（A）全身、（B）エキスピボ肝臓BLI、（C）エキスピボ後肢、及び（D）エキスピボ肺に対してBLIイメージングを実施した。

平均±SEM、スチューデントのt検定、 $n = 5 \sim 7$ 、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 。

【図47】試験終了時（25日目）に、アイソタイプ対照抗体（AbA33）又はGrem1中和抗体（UCB6114）のいずれかで処理した全身PC-3腫瘍負荷を有するNSGマウスの代表的なBLI画像。最後の全身スキャンの直後に肝臓、後肢、及び肺を解剖し、エクスピボで画像化した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

開示される生成物及び方法の様々な用途は、当技術分野における具体的なニーズに合わせて調整できることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、本発明の特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0017】

更に、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する時、単数形「a」、「an」、及び「the」は、特に明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。従って、例えば、「阻害剤（an inhibitor）」への言及は、2つ以上のこのような阻害剤を含む、又は「オリゴヌクレオチド（an oligonucleotide）」への言及は、2つ以上のこのようなオリゴヌクレオチドを含む等である。

【0018】

上記であろうと下記であろうと、本明細書に引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0019】

がんの治療及び予防

本発明は、がんの予防又は治療方法において使用するための抗GREM1アンタゴニストを提供する。該がんは、典型的には間質（例えば、線維形成性間質）を有し、典型的には間質でGREM1が過剰発現している。該がんは、更に又はあるいは、上皮においてGREM1が過剰発現していてもよく、又はGREM1起始性であってもよい。

【0020】

がん

がんは、間質、典型的には線維形成性間質を有する任意のがん又は腫瘍であってよい。がんは、GREM1起始性の任意のがん又は腫瘍であってよい。がんは、間質及び／又は上皮においてGREM1の過剰発現が観察される任意のがんであってよい。がん又は腫瘍は、間質でGREM1が過剰発現しているが、上皮ではGREM1が過剰発現していなくてもよい。がん又は腫瘍は、上皮においてGREM1が過剰発現しているが、間質ではGREM1が過剰発現していなくてもよい。好ましい実施形態では、がん又は腫瘍は、線維形成性間質でGREM1が過剰発現している。

【0021】

がん又は腫瘍は、固形腫瘍であってよい。固形腫瘍は、線維形成性間質を有してよい。

【0022】

特に好ましい治療可能ながんとしては、結腸直腸がん、多発性骨髄腫、膵臓がん、膀胱がん、乳がん、肺がん、胃がん、十二指腸がん、食道がん、前立腺がん、頭頸部がん、子宮内膜がん、肝臓がん、脾臓がん、骨常在がん、及び骨肉腫が挙げられる。治療可能ながんは、腸がん、結腸がん、又は直腸がんであってよい。治療されるがんは、播種性がん、例えば転移性がんであってよい。播種性がんは、体内の最初の発生部位から広がったがんであると理解すべきである。例えば、播種性がんは、患者の骨髄、結腸、前立腺、又は乳房の組織で発生したが、例えば患者の肝臓又は肺に広がったがんであってよい。

【0023】

また、GREM1アンタゴニストは、がんの播種を予防するために使用することもできる。

【0024】

GREM1アンタゴニストは、がんに関連するポリポージスを予防するために使用することができる。

【0025】

グレード分類システムは、細胞分化の欠如に関してがん細胞を分類するためにがん生物学及び医学において使用されている。これは、がん細胞が、そのがん細胞が発生した組織にみられる健常細胞と形態がどの程度異なるかを反映している。グレード分類システムは、特定のがんがどれくらいの速さで成長すると予想され得るかの指標を提供するために使用することができる。典型的に使用されるがんのグレードは、グレード（G）X及び1～4である。GXは、がんのグレードを評価できないことを示す。G1（低グレード）がん細胞は、正常で健康な細胞と類似の形態を有しており（すなわち、十分に分化している）、ゆっくり成長すると予想され、広がる可能性は低い。G2（中間グレード）のがん細胞は、中等度に分化している、すなわち、より異常に見え、G1細胞よりもわずかに速く成長すると予想される。G3（高グレード）がん細胞は、正常細胞と比較して非常に異なる形態を有しており（すなわち、それほど分化していない）、G1及びG2の細胞よりも速く成長すると予想される。G4（高グレード）がん細胞は、未分化（低分化とも呼ばれる）であり、増殖能力が最も高いと予想される。

10

【0026】

がんのグレード分類は、がんがどのように広がる可能性があるかの指標を与えるがんの病期分類とは異なる。一般的ながん病期分類システムは5つのステージを有する、すなわち、ステージ0：がん細胞がその場にとどまっている（すなわち、正常な組織に位置する）、ステージI：がんが体の一部に限局している、ステージII：がんが局所的に進行している、ステージIII：同様にがんが局所的に進行している（がんがステージIIと指定されるか又はステージIIIと指定されるかは、具体的ながんの種類に依存し得る）、及びステージIV：がんが多くの場合転移しているか、又は他の臓器若しくは全身に広がっている。

20

【0027】

当業者は、がんのグレード及び／又はステージを判定する方法について理解している。一実施形態では、本発明は、確立されたがんを治療及び／又は予防するための抗GREM1アンタゴニストの使用に関する。一実施形態では、がんは、確立されたがんである。確立されたがんは、高グレードのがん、例えば、G3又はG4のがんであってよい。確立されたがんは、ステージII以上のがんであり得る。確立されたがんは、ステージIII又はステージIVのがんであり得る。一実施形態では、確立されたがんは、転移しているステージIVのがんである。

30

【0028】

結腸直腸がん

本発明は、好ましい一態様では、結腸直腸がんの予防又は治療に関する。背景として、腸粘膜は複雑な生態系であり、上皮はその微小環境、特にその下層にある間質と相互に依存した関係を有している。間葉－上皮クロストークは、ホメオスタシスの調節に密接に関与しており、腸再生及びがんにおいてダイナミックに変化する。細胞シグナル伝達ネットワークは、コンパートメント間クロストークのエフェクター経路であり、上皮細胞の運命決定を制御するが、結腸直腸がんでは腫瘍微小環境によって利用され、破壊されることがある。

40

【0029】

結腸直腸がんの現在の化学療法的管理は、過去20年間実質的に変化しておらず、増殖している腫瘍上皮に対する細胞傷害性剤の組み合わせの使用（FOLFOXレジメン及びFOLFIRIレジメン等 <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs>）に主に基づいており、これら上皮を標的とする剤に対する抵抗性が生じる可能性がある。現在、結腸直腸がんで使用するた

50

めの新規治療法を同定することがこれまで以上に重要になっている。

【0030】

従って、治療のための特に好ましいがん又は腫瘍は、結腸直腸がん又は結腸直腸腫瘍である。治療のための結腸直腸がんの特に好ましい形態は、間質細胞においてG R E M 1が過剰発現している、すなわち間質におけるG R E M 1の過剰発現を特徴とする結腸直腸がんである。間質細胞は、がん関連線維芽細胞であってよい。間質でG R E M 1が過剰発現している結腸直腸がんは、上皮におけるG R E M 1の過剰発現を示さなくてもよい。間質でG R E M 1が過剰発現している結腸直腸がんは、間質でF o x l 1が過剰発現していてもよい。治療のための結腸直腸がんの特に好適な形態は、間葉系サブタイプの結腸直腸がんであり、C M S 4とも記載される（G u i n n e y et al, Nat Med 2015）結腸直腸がんである。G u i n n e yら、上記に記載されているように、C M S 1、C M S 2、及びC M S 3のいずれかを含む任意の他のサブタイプの結腸直腸がんも治療することができる。本明細書に記載の結腸直腸がんは、近位結腸直腸がん（又は近位結腸直腸腫瘍）であってよい。近位結腸とは、左結腸曲の上流にある大腸の領域であり、盲腸、上行結腸、及び横行結腸を意味する。この領域のがん及び腫瘍は、右側のがん又は腫瘍とも呼ばれる。本発明は、右側結腸直腸がん又は右側結腸直腸腫瘍の治療に関し得る。

10

【0031】

結腸直腸がんは、遠位結腸直腸がん（又は遠位結腸直腸腫瘍）であってよい。遠位結腸とは、左結腸曲の下流にある大腸の領域であり、下行結腸、S字結腸、及び直腸を意味する。この領域のがん及び腫瘍は、左側のがん又は腫瘍とも呼ばれる。本発明は、左側結腸直腸がん又は左側結腸直腸腫瘍の治療に関し得る。G R E M 1が間質で過剰発現しているがんは、好ましくは、散発性がんであってよい。散発性がんは、体細胞突然変異によって引き起こされ得る。散発性がんは、発がん物質によって引き起こされる場合もある。散発性がんは、遺伝性の遺伝子突然変異に起因するものではない。散発性がんは、間質においてG R E M 1を過剰発現させ得る。散発性がんの増殖は、がんにおける間質でのG R E M 1の過剰発現に依存し得る。

20

【0032】

G R E M 1に近接する少なくとも3つの一塩基多型（S N P）は、独立して、白人の北欧人、そして恐らく他の民族においても、結腸直腸がん（C R C）のリスクと関連している（T o m l i n s o n et al, P L o s Genet, 2011）。G R E M 1発現と直接的な関連があり、他のS N Pも同様の効果を有する可能性がある。更に、B M P 2付近の2つの共通のS N P、B M P 4付近の2つのS N P、及びB M P 7付近の1つのS N Pは、B M Pリガンドの発現に影響を与え、C R Cリスクに影響を与える。従って、がんは、上記のS N Pのうちの1つ以上のS N Pを含んでいる可能性がある。

30

【0033】

本発明に係る治療のためのがん又は腫瘍の更なる種類は、上皮細胞においてG R E M 1の過剰発現を示すものである。上皮細胞におけるG R E M 1の過剰発現は、がんを引き起こし得る。がんの増殖は、G R E M 1の上皮における過剰発現に依存し得る。従って、がんは上皮で発生したものであってもよい。がんは、典型的には、結腸直腸がん又は十二指腸がんである。好ましくは、がんは、結腸直腸がんである。がんは、G R E M 1起始性であり得る。G R E M 1起始性とは、G R E M 1の活性又は発現を増強する変異原性事象ががんの原因となることを意味する。このようながんは、遺伝性の遺伝子突然変異に起因するものである場合がある。従って、がんは、家族性がん（下記参照）であってよい。

40

【0034】

治療のための結腸直腸がんの好ましい種類は、以下に更に記載される通り、1つ以上の公知の抗がん剤（例えば、化学療法剤）に対して抵抗性であり得る。

【0035】

結腸直腸がんは、播種性結腸直腸がんであってよい。結腸直腸がんは、転移性結腸直腸がんであってよい。結腸直腸がんは、肺の転移性結腸直腸がんであってよい。結腸直腸がんは、肝臓の転移性結腸直腸がんであってよい。結腸直腸がんは、骨の転移性結腸

50

直腸がんであってもよい。

【0036】

結腸直腸がんは、間質におけるFoxl1の過剰発現を特徴とし得る。結腸直腸がんは、間質における1つ以上のWntリガンドの過剰発現を特徴とし得る。例えば、結腸直腸がんは、間質におけるWnt5A及び／又はWnt2Bの過剰発現を特徴とし得る。結腸直腸がんは、該結腸直腸がんにおいてFoxl1及び／又はWntリガンド、例えば、Wnt5A又はWnt2Bが間質で過剰発現している場合、GREM1アンタゴニストを用いる予防又は治療に特に好適であり得る。

【0037】

家族性がん

家族性がんは、GREM1をコードしている遺伝子における突然変異（複数可）又はGREM1遺伝子の発現に影響を及ぼす任意の他の突然変異に起因するがんを含む。常染色体優性疾患である遺伝性混合ポリポーシス症候群（HMP S）は、GREM1の上流にある40kbの重複によって引き起こされ、その結果、限局している間葉系の勾配から上皮全体にわたる異所性のGREM1遺伝子発現へと病理学的コンパートメント発現が切り替わる。

【0038】

抗GREM1アンタゴニストで治療される被験体は、家族性がんを発症するリスクがあると以前判定されたことがあってもよい。例えば、被験体は、家族歴に基づいて、及び／又は家族性がんを発症させるか若しくは発症するリスクを増大させることが知られている遺伝子の突然変異を該被験体が有していることから、リスクがあると判断されたことがあってもよい。

【0039】

家族性がんは、遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん（HNPCC）とも呼ばれるリンチ症候群であってよい。家族性がんは、家族性腺腫様ポリポーシス（FAP）であってよい。

【0040】

本発明者らは、抗GREM1抗体を使用すると、Apc^{Min}モデルマウスの生存率が実質的に増加することを実証した（例えば、以下の実施例11、19、及び23を参照）。Apc^{Min}マウスは、家族性腺腫様ポリポーシス（FAP）の十分に確立されたモデルである。従って、FAPに罹患している患者又は被験体は、抗GREM1アンタゴニストによる治療に特に好適であり得る。抗GREM1アンタゴニスト（例えば、抗GREM1抗体）で治療又は予防される家族性がんは、FAPであってよい。以前FAPに罹患したことがある被験体に、例えば、再発を予防するために抗GREM1アンタゴニストを予防的に投与してもよい。これまでFAPに罹患したことはないが、FAPを発症するリスクがあると以前判定されたことのある被験体に、抗GREM1アンタゴニストを予防的に投与してもよい。被験体は、Apc遺伝子に有害な突然変異を有していることが判明したことから、FAPを発症するリスクがあると判定された可能性がある。

【0041】

多発性骨髄腫

本発明は、別の好ましい態様では、多発性骨髄腫の治療又は予防に関する。多発性骨髄腫（MM）は、骨髄（BM）内での形質細胞（PC）のクローン増殖を特徴とする血液学的悪性腫瘍である。MMではBMが腫瘍の成長を支援していることが周知であり、腫瘍細胞とBMの間の双方向のシグナル伝達が、MM PCの成長、拡散、及び生存の継続にとって非常に重要である。細胞性及び非細胞性のBM構成要素は、MM PCの成長及び拡散に対して異なる影響を及ぼす。疾患の進行において役割を果たすBMの構成要素が最近の研究で同定され、これらを標的とした治療法が開発されたが、MMの標準治療は、未だ腫瘍細胞自体を標的とするものに主に頼っている。このような療法は患者の生存期間を延長するのに有効であるが、MM細胞の成長、拡散、生存、及び薬剤抵抗性においてBMが果たす役割は大きいと、この重要な疾患の局面を標的とするより有効な療法が必要とさ

10

20

30

40

50

れている。実際、MMはほとんどが不治の病であり、この疾患の有効な治療において直面している重要な課題は疾患の再発である。

【0042】

従って、本発明は、好ましくは、多発性骨髄腫の治療又は予防も目的とする。多発性骨髄腫は、典型的には、骨髄内に1つ超の形質細胞の塊が存在する。従って、多発性骨髄腫は、典型的には、骨髄における形質細胞の異常な増殖に関連している。治療のための多発性骨髄腫の特に好ましい形態は、骨髄においてGREM1が過剰発現していることを特徴とする。従って、多発性骨髄腫は、間質においてGREM1が過剰発現してよい。間質におけるGREM1の過剰発現は、骨の緻密骨コンパートメントに存在し得る。間質におけるGREM1の過剰発現は、間質細胞の数の増加又は既存のGREM1発現間質細胞内でのGREM1の発現レベルの増加を反映している可能性がある。骨髄は、骨軟骨網様（osteochondroreticular、OCR）幹細胞を含み得る。GREM1を過剰発現している間質細胞は、OCR幹細胞を含み得る。治療のための多発性骨髄腫の好ましい種類は、以下に更に記載される通り、1つ以上の公知の抗がん剤（例えば、化学療法剤）に対して抵抗性であり得る。

10

【0043】

乳がん

本発明は、別の好ましい態様では、乳がんの治療又は予防に関する。実施例に更に詳細に記載する通り、本発明者らは、GREM1が乳がん細胞の増殖を誘導すること、更に、GREM1を発現している間質細胞と乳がん細胞との共培養もこのような増殖を誘導することを観察した。更に、GREM1アンタゴニストは、乳がん細胞に対するGREM1の活性化作用を中和することができる。

20

【0044】

従って、乳がんで得られた結果は、間質細胞におけるGREM1の発現を含む、乳がん細胞の増殖におけるGREM1の役割を裏付けるものである。

【0045】

また、本発明者らは、前臨床マウスモデルにおいて、乳がんの予防及び治療におけるGREM1アンタゴニストのインビボにおける有効性を実証した（下記実施例24参照）。特に、GREM1アンタゴニストで処理した乳がん担がんマウスが、全身腫瘍負荷、肺腫瘍負荷、肝臓腫瘍負荷の減少を示すことが観察された。

30

【0046】

従って、本発明は、抗GREM1アンタゴニストを投与することによる乳がんの治療及び予防を提供する。乳がんは、間質においてGREM1が過剰発現してよい。GREM1を過剰発現している間質性乳腺細胞は、本明細書ではがん関連線維芽細胞とも記載される間質線維芽細胞を含み得る。治療のための乳がんの好ましい種類は、以下に更に記載される通り、1つ以上の公知の抗がん剤（例えば、化学療法剤）に対して抵抗性であってよい。乳がんは、播種性乳がんであってもよい。乳がんは、転移性乳がんであってもよい。乳がんは、肺の転移性乳がんであってもよい。乳がんは、肝臓の転移性乳がんであり得る。乳がんは、骨の転移性乳がんであってもよい。

【0047】

前立腺がん

更なる態様では、本発明は、前立腺がんの治療又は予防に関する。

【0048】

実施例25に更に詳細に記載されている通り、本発明者らは、前臨床マウスモデルにおいて、前立腺がんの予防及び治療におけるGREM1アンタゴニストの有効性を実証した。特に、GREM1アンタゴニストで処理した前立腺がん担がんマウスが、全身腫瘍負荷、肝臓腫瘍負荷、骨格腫瘍負荷、及び肺腫瘍負荷の減少を示すことが観察された。

【0049】

従って、本発明は、更に、抗GREM1アンタゴニストを投与することによる前立腺がんの治療及び予防を提供する。前立腺がんは、播種性前立腺がんであってもよい。前立腺が

40

50

んは、転移性前立腺がんであってもよい。前立腺がんは、肺の転移性前立腺がんであってもよい。前立腺がんは、肝臓の転移性前立腺がんであってもよい。前立腺がんは、骨の転移性前立腺がんであってもよい。

【0050】

他のがん

結腸直腸がん、多発性骨髄腫、乳がん、及び前立腺がんの治療及び予防における具体的に例示された用途に加えて、本発明者らは、これらがんで示されたG R E M 1アンタゴニストの治療有効性が、対応する特徴を有する他のがんの治療にも適用可能であると予想している。特に、間質及び／又は上皮においてG R E M 1が過剰発現しており、この過剰発現が悪性細胞の成長に寄与しているがんの予防又は治療において、G R E M 1アンタゴニストが有用であることが予想される。このようながんとしては、膵臓がん、膀胱がん、肺がん、胃がん、十二指腸がん、食道がん、頭頸部がん、神経膠腫、子宮内膜がん、肝臓がん、脾臓がん、骨常在がん、及び骨肉腫が挙げられる。公的に入手可能なデータ（R 2サーバーから。<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>）を用いて判定した、様々な固形腫瘍におけるG r e m 1発現と生存率との関係を図24～図29に示す。

【0051】

間質及び上皮

本明細書において予防又は治療について記載されたがんは、間質及び／又は上皮においてG R E M 1が過剰発現している。

【0052】

本明細書で使用するとき、用語「間質細胞（複数可）」又は「間質」は、組織又は器官の構造及び／又は結合部分を指す。

【0053】

間質組織は、結合組織細胞を含む細胞外マトリックスで主に構成されている。細胞外マトリックスは、主にプロテオグリカン凝集体で構成される多孔質の水和ゲルである基質と、結合組織線維とで主に構成されている。間質内で一般的にみられる繊維には、I型コラーゲン線維、弾性線維、細網線維（III型コラーゲン線維）の3種類がある。線維芽細胞及び周皮細胞が、間質細胞の中で最も一般的な種類である。

【0054】

がん又は腫瘍（例えば、組織又は器官の上皮を起始とする）に関連して、組織又は器官の間質は、がんの成長及び進行を支援し得る。がん又は腫瘍に関連する間質は、がん又は腫瘍の周囲の線維組織又は結合組織の成長によって引き起こされる線維形成性間質であり得る。

【0055】

G R E M 1の過剰発現は、間質／任意の間質細胞のいずれの部分でも観察され得る。間質細胞は、線維芽細胞であってもよく、線維芽細胞様支持細胞であってもよい。間質細胞は、上記任意のがん又は腫瘍の線維形成性間質から、例えば、結腸直腸がんでは結腸若しくは直腸から又は多発性骨髄腫では骨髄から単離された線維芽細胞又は線維芽細胞様支持細胞であってもよい。間質細胞は、がん関連線維芽細胞であってもよい。

【0056】

用語「上皮」は、本明細書で使用するとき、組織又は器官の外膜に由来する細胞を指す。結腸に関しては、腸管上皮は、消化管の小腸及び大腸の両方の管腔表層又は裏層を形成する細胞の層である。それは、単純な円柱上皮で構成されている。「上部閥門」は、吸収腸細胞、杯細胞、パネート細胞、及び腸内分泌細胞の4種類の腸上皮細胞からなる円柱細胞の腸上皮単層である。上部閥門の特徴は、小腸及び大腸で類似している。主な違いは、吸収面を増加させることができる、十二指腸、空腸、及び回腸における隆起及び突起（輪状ひだ、絨毛、及び微絨毛）の存在で構成される。これは結腸では観察されず、結腸は代わりに平坦な表面を示す。絨毛と呼ばれる粘膜の突出の中には、リーベルキューン陰窩と呼ばれる屈曲があり、これは明確な腺陥入である。上皮においてG R E M 1の過剰発現が

観察される細胞は、任意の上皮細胞、例えば、任意の腸管上皮細胞であり得る。

【0057】

理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、上皮及び／又は間質におけるGREM1の過剰発現が、上皮幹細胞の挙動を促進し、がんの進行及び／又は化学療法剤に対する抵抗性を駆動する、幹／前駆細胞の表現型（幹／前駆細胞の数を増加させる）を促進し得ると推測する。従って、本発明に従って使用されるGREM1アンタゴニストは、がんを予防又は治療する被験体の組織又は器官の上皮、例えば腸上皮において、異常ながん幹／前駆細胞の表現型の誘導を阻止し、上皮幹細胞の挙動を減少させ、及び／又は幹／前駆細胞の数を減少させることができる。幹細胞の挙動に影響を与えるGREM1アンタゴニストの能力は、公知の上皮及びがん幹細胞マーカーの評価によって臨床的にアッセイすることができる。

10

【0058】

GREM1

タンパク質に関連して本発明で使用する時、GREM1又はGremlin-1という用語は、典型的にはUniProtエントリO60565（配列番号1）に記載されているアミノ酸配列を有するタンパク質、ヒトGREM1を指す。また、GREM1及びGremlin-1という用語は、以下のGremlin-1ポリペプチドを指す場合もある：

（a）N末端シグナルペプチドを有する若しくは有しない配列番号1のアミノ酸配列を含むか若しくはからなる、すなわち、配列番号21に示す成熟ペプチド配列を含み得る若しくははからなり得る；又は

20

（b）配列番号20のアミノ酸配列等、Gremlin-1の活性を保持している、N末端シグナルペプチドを有する若しくは有しない（配列番号21に示す）配列番号1のアミノ酸配列に対して1つ以上のアミノ酸の置換、修飾、欠失、若しくは挿入を有する誘導体である；

（c）これらの変異体であって、典型的には、配列番号1（又は配列番号20若しくは21）に対して少なくとも約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、若しくは約95%の同一性（又は更には約96%、約97%、約98%、若しくは99%の同一性）を保持している変異体。言い換えれば、このような変異体は、配列番号1に対して約60%～約99%の同一性、好適には配列番号1に対して約80%～約99%の同一性、より好適には配列番号1に対して約90%～約99%の同一性、最も好適には配列番号1に対して約95%～約99%の同一性を保持し得る。変異体については、以下に更に説明する。

30

【0059】

以下で更に論じる通り、残基番号は、典型的には配列番号1の配列に基づいて引用される。しかしながら、当業者であれば、上で論じた誘導体又は変異体の配列の残基の付番を容易に推定することができる。残基番号を引用する場合、本発明は、変異体又は誘導体の配列におけるこれら残基も包含する。

【0060】

GREM1又はGremlin-1の核酸配列は、配列番号36若しくは配列番号37の配列又はこれらの変異体を含み得るか又ははからなり得る。変異体の核酸配列については、以下に更に記載する。GREM1又はGremlin-1の核酸配列は、任意のGREM1転写物変異体を含み得るか又ははからなり得る。GREM1転写物変異体の例は、転写物1（NCBI：NM_013372.6；ENSEMBL：ENST00000560677.5）；転写物2（NCBI：NM_001191323.1；ENSEMBL：ENST00000560830.1）；転写物3：NCBI：NM_001191322.1；ENSEMBL：ENST00000622074.1である。2018年6月18日現在、上記アクセッション番号で入手可能な配列は、参照により本明細書に援用される。

40

【0061】

50

過剰発現

間質及び／又は上皮におけるG R E M 1の過剰発現は、任意の手段によって測定することができる。G R E M 1の過剰発現は、典型的には、同じ組織型の正常細胞におけるマーカーのレベル、すなわち、基底発現レベルとの比較によって判定される。典型的には、好ましくは1つ以上のハウスキーピング遺伝子を含む他の遺伝子の発現レベルに対して発現を正規化する。また、G R E M 1は、がん患者の集団の閾値割合において過剰発現又は過小発現を示すものとして分類されてもよい。集団の各患者における過剰発現は、幾何学的平均から2超高くてもよい。集団の患者の少なくとも10%、より好ましくは少なくとも15%、又はそれ以上が、このような過剰発現を示し得る。

【0062】

間質におけるG R E M 1の過剰発現とは、間質におけるG R E M 1のレベルが、対応する正常組織のレベルよりも高いことを指す。例えば、間質におけるG R E M 1レベルは、対応する正常組織のレベルよりも少なくとも2倍高くてもよい。

【0063】

G R E M 1が過剰発現している場合、その量は基底値に対して任意の量だけ増加し得る。例えば、H M P S等のG R E M 1起始がんでは、上皮でG R E M 1が数千倍アップレギュレーションされ得るが、一方、正常上皮ではG R E M 1の発現が観察されない。間質でG R E M 1が過剰発現している散発性がんでは、器官の正常間質における生理学的G R E M 1発現レベルを超える任意のレベルの間質における過剰発現を含み得る。当業者は、同じ種類の正常細胞におけるG R E M 1のレベルと比較して、間質又は上皮における過剰発現の存在を評価することができる。

【0064】

測定される量は、m R N Aの量であってもよい。従って、がんでは、G R E M 1 m R N Aが過剰発現し得る。がんでは、同じ組織型の正常細胞と比較して、G R E M 1 m R N Aの量が増加し得る。m R N Aは、任意の量だけ増加し得る。m R N Aの量は、リアルタイムq R T - P C R等の定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(q R T - P C R)、q u a n t i g e n eアッセイ(A f f y m e t r i x / T h e r m o F i s h e r)を用いて、ノーザンブロットングによって、又はマイクロアレイ、RNAシーケンシングを用いて測定することができる。m R N A発現は、好ましくは、サンプルの遺伝子発現を、その遺伝子について二倍体である腫瘍で構成される参照サンプル全体の特定の遺伝子の発現レベルの分布と比較することによって決定される。期待値最大化(R S E M)アルゴリズムによりR N A s e qを用いてzスコアを導き出すことができる(c B i o p o r t a l f o r C a n c e r G e n o m i c s, w w w. c b i o p o r t a l. o r g ; G a o e t a l, 2013 and S e r a m i e t a l 2012)。好ましくは、参照セットの平均よりも2 S Dだけ高い又は低いzスコアを、それぞれ過剰発現又は過小発現とみなす。

【0065】

測定される量は、タンパク質の量であってもよい。がんでは、例えば、同じ組織型の正常細胞と比較して、G R E M 1タンパク質が過剰発現し得る。タンパク質は、任意の量だけ増加し得る。タンパク質の量は、本発明の抗G R E M 1抗体の使用を含む、免疫組織化学的検査、ウェスタンブロットング、質量分析、又は蛍光活性化セルソーティング(F A C S)を用いて測定することができる。発現を判定するための閾値は、使用される技術によって変動し得、免疫組織化学的スコアに対して検証され得る。

【0066】

従って、本明細書に記載の患者におけるがんを治療又は予防するためのG R E M 1アンタゴニストの使用は、(a)がんにおけるG R E M 1の量を測定すること、及び(b)がんでG R E M 1が過剰発現している場合、患者にG R E M 1アンタゴニストを投与し、それによって、がんを治療又は予防することを含む。G R E M 1の量は、m R N A量又はタンパク質量であってもよく、過剰発現は、上述したいずれの過剰発現であってもよい。

【0067】

10

20

30

40

50

サンプル

上記の測定は、患者由来の任意の好適なサンプルにおいて行ってよい。測定は、患者から得られたがん又は腫瘍の生検において行ってもよい。生検から、間質及び／又は上皮（間質及び／又は上皮の細胞）を単離してもよい。生検組織は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織であってもよく、新鮮組織であってもよい。組織は、膵臓組織、膀胱組織、肺組織、子宮内膜組織、乳房組織、胃組織、十二指腸組織、食道組織、骨髄、又は結腸直腸組織であってもよい。がん生検に対して上で論じた方法のいずれを実施してもよい。患者の血液中を循環しているがん細胞に対して、このような方法を実施してもよい。RNA法は、尿又は血液のエキソソームに対して行うことができる。

【0068】

アンタゴニスト

抗GREM1アンタゴニストは、GREM1の機能又は活性を低下させる任意の分子である。抗GREM1アンタゴニストは、GREM1の機能又は活性を任意の量だけ低下させることができる。抗GREM1アンタゴニストは、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%、若しくは少なくとも95%だけGREM1の機能若しくは活性を低下させることができるか、又は任意のGREM1の機能若しくは活性を阻止することができる。抗GREM1アンタゴニストがGREM1の機能又は活性を低下させる程度は、抗GREM1アンタゴニストの存在下及び非存在下で細胞におけるGREM1の機能又は活性を測定することによって決定することができる。細胞は、正常細胞であっても、がん細胞であってもよい。細胞は、上記のがん細胞であってもよい。細胞は、結腸直腸がん細胞であってもよい。結腸直腸がん細胞は、実施例に記載のVil1-Grem1及び／又はAPC(Min)マウスモデルに存在し得る。このように、結腸直腸がんにおけるGREM1アンタゴニストの活性のインビボアッセイは、GREM1起始がん又は間質においてGREM1が過剰発現する散発性がんのマウスモデルにおいて実施することができる。あるいは、がん細胞は、骨髄に存在する骨髄腫から単離された形質細胞等の多発性骨髄腫がん細胞であってもよい。より一般的には、任意の手段によってGREM1の機能又は活性を低下させることが示されたGREM1アンタゴニストを、次に、結腸直腸がん細胞若しくは多発性骨髄腫がん細胞若しくは乳がん細胞等のがん細胞の増殖を阻止若しくは減少させる能力、又はがん若しくは腫瘍を予防、低減、又は排除する能力について、インビトロ又はインビボでアッセイしてよい。

【0069】

アンタゴニストは、任意の手段によってGREM1の機能を低下させ得る。アンタゴニストは、GREM1の機能に直接又は間接的に影響を与える任意の分子の活性又は量を増加又は減少させてもよい。アンタゴニストは、mRNA又はタンパク質のレベルでGREM1の量を減少させてもよい。アンタゴニストは、GREM1の分解を増加させてもよい。アンタゴニストは、阻害的修飾によりGREM1の機能を低下させてもよい。アンタゴニストは、GREM1の機能を増強する分子の転写を低下させてもよい。アンタゴニストは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ等の剤を用いて、GREM1をコードしているDNA又はGREM1の機能を増強する分子を破壊してもよい。

【0070】

アンタゴニストは、Gremlin-1と相互作用する剤であってもよい。Gremlin-1と相互作用する剤は、典型的には、Gremlin-1に結合する剤である。Gremlin-1と相互作用する剤は、Gremlin-1を調節し得る。阻害性調節剤は、Gremlin-1の機能のいずれに対する効果を有していてもよいが、典型的には、Gremlin-1のBMP(BMP2/4/7)への結合を減少させる。アンタゴニストは、BMP-7模倣分子であってもよく、Gremlin-1はBMPの負の調節因子であるため、結合が減少すると、BMPを介したシグナル伝達が増加する。活性化調節剤は、Gremlin-1のBMPへの結合を増加させ得る。

【0071】

10

20

30

40

50

BMPの結合及びシグナル伝達は、当技術分野において公知の任意の方法によって検出することができる。例えば、本願の実施例は、SMADリン酸化アッセイについて説明している。SMAD1、5、及び8は、BMPシグナル伝達の際にリン酸化される。従って、SMADリン酸化の増加を使用して、Gremlin-1に対する結合の減少を反映し得るBMPシグナル伝達の増加を判定することができる。また、実施例は、Id1レポーター遺伝子アッセイについても説明しており、ここでは、Id1遺伝子がBMPシグナル伝達の標的遺伝子である。従って、このアッセイにおけるシグナルの回復の増加を、剤がGremlin-1のBMPへの結合を阻害するか否かを判定するために使用することもできる。

【0072】

アンタゴニストは、GREM1の活性部位に結合することにより作用する場合もあり、又は異なる部位に結合することによりアロステリックに作用する場合もある。アンタゴニストは、GREM1の調節因子又はリガンドに結合することにより作用し、それによってGREM1の活性化を低下させる場合もある。アンタゴニストは、可逆的であっても不可逆的であってもよい。

【0073】

GREM1アンタゴニストは、低分子阻害剤、ペプチド、タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、低分子干渉RNA (siRNA)、又は低分子ヘアピンRNA (shRNA) であってよい。

【0074】

GREM1のアンタゴニストは、GREM1をコードしているmRNA又はGREM1活性を増強する分子をコードしているmRNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであってもよい。GREM1のアンタゴニストは、GREM1の機能を低下させる任意の分子をコードしているポリヌクレオチドであってもよい。例えば、GREM1アンタゴニストは、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているポリヌクレオチドであってもよい。

【0075】

GREM1のアンタゴニストは、GREM1の機能を直接又は間接的に低下させるように、任意の標的分子（典型的にはタンパク質）に特異的に結合する抗体であってもよい。アンタゴニストは、GREM1に特異的に結合する抗体であってもよい。この態様では、抗体は、アロステリック不活性化により又は活性に必要なその標的とリガンドとの相互作用をブロックすることにより、GREM1の機能を低下させることができる。

【0076】

アンタゴニストとタンパク質残基との相互作用は、X線結晶構造解析によって求められる残基と剤との間の距離（典型的には、6 Å未満又は4 Å未満）等、当技術分野で公知の任意の適切な方法によって決定することができる。以下の実施例で論じる通り、治療薬が標的とし得るGremlin-1の領域は、アミノ酸Asp92～Leu99、Arg116～His130、Ser137～Ser142、Cys176～Cys178を含み得る。これらは、Gremlin-1の表面における変異したもの6 Å以内にある。

【0077】

抗体アンタゴニスト

用語「抗体」は、本明細書で言及するとき、抗体全体及びその任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）又は単鎖を含む。抗体とは、ジスルフィド結合によって互いに結合している少なくとも2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖を含む糖タンパク質、又はその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではHCVR又はV_Hと略される）及び重鎖定常領域で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVR又はV_Lと略される）及び軽鎖定常領域で構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。V_H及びV_L領域は、更に、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が散在している、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域に細分化することができる。

10

20

30

40

50

【0078】

抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第1成分（C1q）を含む、宿主の組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0079】

本発明に従って使用される抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、典型的にはモノクローナル抗体である。本発明に従って使用される抗体は、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ナノボディ、ヒト若しくはヒト化抗体、又はこれらのいずれかの抗原結合部分であってよい。モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方を生成する場合、実験動物は、典型的には、ヤギ、ウサギ、ラット、又はマウス等の非ヒト哺乳動物であるが、他の種で抗体を産生させることもできる。

10

【0080】

ポリクローナル抗体は、関心対象の抗原で好適な動物を免疫する等のルーチンな方法で生成することができる。その後、動物から血液を採取し、IgG画分を精製してよい。

【0081】

Grem1in-1に対する抗体は、動物の免疫が必要な場合には、周知かつルーチンなプロトコルを使用して、動物、例えば非ヒト動物にポリペプチドを投与することによって得ることができ、例えば、Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986を参照）。ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ラクダ、又はブタ等の多くの温血動物を免疫することができる。しかし、一般的には、マウス、ウサギ、ブタ、及びラットが最も好適である。

20

【0082】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術（Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4: 72）、及びEBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985）等、当技術分野において公知の任意の方法によって調製することができる。

30

【0083】

また、本発明に従って使用される抗体は、例えば、Babcock, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15): 7843-7848; 国際公開第92/02551号; 同第2004/051268号、及び同第2004/106377号に記載の方法によって、特異的抗体の生成について選択された単一リンパ球から生成された免疫グロブリン可変領域cDNAをクローニングし、発現させることによって、単一リンパ球抗体法を使用して生成することもできる。

【0084】

抗体はまた、当技術分野において公知の様々なファージディスプレイ法を用いて生成することもでき、例えば、Brinkman et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50)、Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184: 177-186)、Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24: 952-958)、Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18)、Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57: 191-280)、並びに国際公開第90/02809号; 同第91/10737号; 同第92/01047号; 同第92/18619号; 同第93/11236号; 同第95/15982号; 同第95/20401号; 並びに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,9

40

50

08号；同第5,750,753号；同第5,821,047号；同第5,571,698号；同第5,427,908号；同第5,516,637号；同第5,780,225号；同第5,658,727号；同第5,733,743号、及び同第5,969,108に開示されているものが挙げられる。

【0085】

完全ヒト抗体は、重鎖及び軽鎖の両方の可変領域及び定常領域（存在する場合）が全てヒト起源であるか又はヒト起源の配列と実質的に同一であるが、必ずしも同一の抗体由来であるとは限らない抗体である。完全ヒト抗体の例は、例えば、欧州特許第0546073号、米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、同第5,770,429号、欧州特許第0438474号、及び同第0463151号において一般用語に記載されているように、例えば、上記のファージディスプレイ法によって生成される抗体、及びマウス免疫グロブリン可変領域、そして、任意で定常領域の遺伝子がヒトの対応する遺伝子に置換されているマウスによって産生される抗体を含み得る。

【0086】

あるいは、本発明に従って使用される抗体は、非ヒト哺乳動物をGremlin-1免疫原で免疫し、該哺乳動物から抗体調製物を得、Gremlin-1を認識するモノクローナル抗体をそれから得ることを含む方法によって生成することもできる。

【0087】

本発明に従って使用される抗体分子は、完全長の重鎖及び軽鎖を有する完全な抗体分子、又はその断片若しくは抗原結合部分を含み得る。抗体の「抗原結合部分」という用語は、抗原に選択的に結合する能力を保持している抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって発揮され得ることが示されている。抗体並びにその断片及び抗原結合部分は、Fab、改変Fab、Fab'、改変Fab'、F(ab)₂、Fv、単ドメイン抗体（例えば、VH又はVL又はVHH）、scFv、二価、三価又は四価の抗体、Bis-scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及び上記のいずれかのエピトープ結合断片であってよいが、これらに限定されない（例えば、Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217を参照）。これら抗体断片を作製及び製造する方法は、当技術分野において周知である（例えば、Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181を参照）。本発明で使用するための他の抗体断片としては、国際特許出願公開第2005/003169号、同第2005/003170号、及び同第2005/003171号に記載されているFab及びFab'断片、並びに国際特許出願公開第2009/040562号に記載されているFab-dAb断片が挙げられる。多価抗体は、多重特異性を有していてもよく、又は単一特異的であってもよい（例えば、国際公開第92/22853号及び同第05/113605号を参照）。これら抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を用いて得ることができ、断片は、インタクトな抗体と同様の方法で有用性についてスクリーニングすることができる。

【0088】

抗体分子の定常領域ドメインは、存在する場合、抗体分子の提案された機能、特に、必要とされ得るエフェクター機能を考慮して選択してよい。例えば、定常領域ドメインは、ヒトのIgA、IgD、IgE、IgG、又はIgMドメインであってよい。特に、抗体分子が治療に使用することを意図するものであり、抗体のエフェクター機能が必要とされる場合、ヒトIgG、特にIgG1及びIgG3のアイソタイプの定常領域ドメインを使用してよい。あるいは、抗体分子が治療目的を意図するものであり、抗体のエフェクター機能を必要としない場合、IgG2及びIgG4のアイソタイプを使用してもよい。

【0089】

例えば、(a) 関心対象の免疫グロブリン遺伝子について遺伝子組み換え若しくは染色

10

20

30

40

50

体組み換えである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、又はそれから調製されたハイブリドーマ、（b）関心対象の抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（c）組み換えコンビナトリアル抗体ライブラリから単離された抗体、及び（d）免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、又は単離された抗体等、本発明に従って使用される抗体は、組み換え手段によって調製、発現、作製、又は単離することができる。

【0090】

本発明に従って使用される抗体は、ヒト抗体であってもよく、ヒト化抗体であってもよい。用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用するときに、フレームワーク領域及びCDR領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことを意図する。更に、抗体が定常領域を含む場合、定常領域も、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本明細書に記載のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダム又は部位特異的突然変異誘発によって又はインビボで体細胞突然変異によって導入された変異）を含んでいてもよい。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用するときに、マウス等の別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を含むことは意図していない。

【0091】

このようなヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体であってもよい。このようなヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合しているヒトの重鎖トランスジーン及び軽鎖トランスジーンを含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって生成され得る。

【0092】

ヒト抗体は、ヒトリンパ球のインビトロ免疫に続いて、リンパ球をエプスタインバーウィルスで形質転換することにより調製することができる。

【0093】

用語「ヒト抗体誘導體」は、ヒト抗体の任意の改変形態、例えば、抗体と別の剤又は抗体とのコンジュゲートを指す。

【0094】

用語「ヒト化抗体」は、マウス等の別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされているCDRグラフト抗体分子を指すことを意図する。ヒトフレームワーク配列内において、追加のフレームワーク領域の改変を行ってもよい。

【0095】

本明細書で使用するときに、用語「CDRグラフト抗体分子」は、重鎖及び／又は軽鎖が、アクセプター抗体（例えば、ヒト抗体）の重鎖及び／又は軽鎖の可変領域フレームワークにグラフトされたドナー抗体（例えば、マウス又はラットのモノクローナル抗体）由来の1つ以上のCDR（必要に応じて、1つ以上の改変CDRを含む）を含有する抗体分子を指す。概説については、Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998を参照。一実施形態では、CDR全体が導入されるのではなく、本明細書に上記したCDRのいずれか1つ由来の特異性決定残基のうちの1つ以上のみが、ヒト抗体フレームワークに導入される（例えば、Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34を参照）。一実施形態では、本明細書に上記したCDRのうちの1つ以上由来の特異性決定残基のみが、ヒト抗体フレームワークに導入される。別の実施形態では、本明細書に上記したCDRの各々由来の特異性決定残基のみが、ヒト抗体フレームワークに導入される。

【0096】

CDR又は特異性決定残基がグラフトされる場合、CDRが由来するドナー抗体のクラス／タイプを考慮して、マウス、霊長類、及びヒトのフレームワーク領域を含む任意の適

10

20

30

40

50

切なアクセプター可変領域のフレームワーク配列を使用してよい。好適には、本発明に係るCDRグラフト化抗体は、ヒトアクセプターフレームワーク領域に加えて上記CDR又は特異性決定残基のうちの1つ以上を含む可変ドメインを有する。従って、一実施形態では、可変ドメインがヒトアクセプターフレームワーク領域及び非ヒトドナーCDRを含む中和CDRグラフト抗体が提供される。

【0097】

本発明において使用することができるヒトフレームワークの例は、KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、及びPOMである（Kabattら、上記）。例えば、KOL及びNEWMは重鎖に用いることができ、REIは軽鎖に用いることができ、EU、LAY、及びPOMは、重鎖と軽鎖の両方に用いることができる。あるいは、ヒトの生殖細胞配列を使用してもよい；これらは、例えば、<http://www.vbase2.org/>で入手可能である（Retter et al, Nucl. Acids Res. (2005) 33 (supplement 1), D671-D674を参照）。

【0098】

本明細書に記載のCDRグラフト抗体では、アクセプターの重鎖及び軽鎖は、必ずしも同一の抗体に由来している必要はなく、必要に応じて、異なる鎖に由来するフレームワーク領域を有する複合鎖を含んでいてもよい。

【0099】

また、本明細書に記載のCDRグラフト抗体では、フレームワーク領域は、アクセプター抗体の配列と全く同じ配列を有している必要はない。例えば、稀な残基を、そのアクセプター鎖のクラス又はタイプにおいてより高頻度で存在する残基に変更してもよい。あるいは、アクセプターフレームワーク領域における選択された残基を、ドナー抗体の同じ位置にみられる残基に対応するように変更してもよい（Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324を参照）。このような変更は、ドナー抗体の親和性を回復させるために必要最小限にとどめるべきである。変更する必要がある可能性のあるアクセプターフレームワーク領域の残基を選択するためのプロトコルは、国際公開第91/09967号に記載されている。

【0100】

また、抗体が様々な翻訳後修飾を受け得ることを、当業者であれば理解するであろう。これら修飾の種類及び程度は、抗体を発現させるために使用される宿主細胞株及び培養条件に依存することが多い。このような修飾は、グリコシル化、メチオニン酸化、ジケトピペラジン形成、アスパラギン酸異性化、及びアスパラギン脱アミド化にばらつきを含み得る。高頻度の修飾は、（Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995に記載の通り）カルボキシペプチダーゼの作用によるカルボキシ末端塩基性残基（リジン又はアルギニン等）の欠失である。

【0101】

一実施形態では、抗体重鎖はCH1ドメインを含み、抗体軽鎖はカップ又はラムダのいずれかのCLドメインを含む。

【0102】

抗体又は断片等の生体分子は、酸性及び／又は塩基性の官能基を含有し、それによって分子に正味の正又は負の電荷を与える。全体的な「観察される」電荷の量は、実体の絶対的なアミノ酸配列、三次元構造における荷電基の局所環境、及び分子の環境条件に依存する。等電点（pI）とは、特定の分子又は表面が正味の電荷を持たないpHである。一実施形態では、本開示に係る抗体又は断片は、少なくとも7の等電点（pI）を有する。一実施形態では、抗体又は断片は、少なくとも8、例えば、8.5、8.6、8.7、8.8、又は9の等電点を有する。一実施形態では、抗体のpIは8である。*ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html（Walker, The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), 571-607を参照）等のプログラムを使用して、抗体又は断片の等電点を予測することができる。

【0103】

好ましいGremlin-1エピトープの特性評価を行うために、本発明者らは、ヒトGremlin-1を単独で、そしてAb7326と呼ばれる抗体（Fab断片）との複合体で結晶化した。Gremlin-1の結晶化により、BMP結合部位における推定残基を決定することができた。更に、アロステリック阻害性抗体であるAb7326と共に結晶化することにより、抗体エピトープにおける残基を決定することができた。このエピトープに結合する抗体は、Gremlin-1に関連する疾患の治療において治療薬として特に有望である。

【0104】

本明細書に記載の好ましいAb7326抗体は、Gremlin-1の以下の残基：Ile110（131）、Lys126（147）、Lys127（148）、Phe128（149）、Thr129（150）、Thr130（151）、Arg148（169）、Lys153（174）、及びGln154（175）に結合すると同定され、Lys126（147）、Lys127（148）、Phe128（149）、Thr129（150）、Thr130（151）、Arg148（169）、Lys153（174）、及びGln154（175）が、あるGremlin-1モノマーに存在する場合、Ile110（131）は第2のGremlin-1モノマーに存在する。括弧内ではない付番は、構造ファイルに基づいている（構造アライメントに基づくマウスGremlin-2の付番と一致する）。括弧内の数字は、配列番号1のUniProtエントリO60565に基づく残基を表す。実施例の章で論じる通り、これらエピトープ残基は、Gremlin-1-Ab7326 Fab複合体から4 ÅにおけるNCONT分析で同定された。

【0105】

従って、本明細書に記載の抗体は、Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174、及びGln175から選択される少なくとも1つの残基を含むエピトープに結合することができる（配列番号1に基づいて残基を付番）。本明細書に記載の抗体は、これらの残基のうちの2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、又は9個全て（好ましくは、少なくとも5個の残基）を含むエピトープに結合し得る。

【0106】

本明細書に記載の抗体はまた、Ile131が他の残基とは異なるGremlin-1モノマーに存在するエピトープを認識することもできる。

【0107】

これら残基は、ヒトGremlin-1の特定の配列について提供されるが、当業者は、ルーチンな技術を用いて、これら残基の位置から他の対応するGremlin配列（例えば、マウス）を容易に推定することができる。従って、これら他のGremlin配列内の対応する残基を含むエピトープに結合する抗体も、本発明によって提供される。

【0108】

特定のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) に記載されているもの等のルーチンなクロスブロッキングアッセイを実施することができる。他の方法としては、アラニンスキャニング変異体、ペプチドプロット (Reeke (2004) Methods Mol Biol 248: 443-63)、又はペプチド切断分析が挙げられる。また、抗原のエピトープ切除、エピトープ抽出、及び化学修飾等の方法を用いてもよい (Tomer (2000) Protein Science 9: 487-496)。このような方法は、当技術分野において周知である。

【0109】

また、抗体エピトープは、X線結晶構造解析により決定することもできる。従って、本開示の抗体は、Gremlin-1に結合している抗体のX線結晶構造解析によって評価

10

20

30

40

50

することができる。エピトープは、特に、抗体パラトープ残基の4 Å以内にあるGremlin-1における残基を決定することによって、この方法で同定され得る。

【0110】

従って、本明細書に記載の抗体は、Trp93、Phe117、Tyr119、Phe125、Tyr126、及びPhe138から選択される少なくとも1つの残基を含むGremlin-1におけるエピトープに結合することができる（残基の付番は配列番号1に従う）。Trp93、Phe117、Tyr119、Phe125、Tyr126、及びPhe138の全てを含むエピトープに結合する抗体について本明細書に更に記載する。更に、以下の残基を含むエピトープに結合する抗体についても記載する：Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174、及びGln175。好ましくは、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174、及びGln175は、Gremlin-1の一方のモノマーに位置し、Ile131は、Gremlin-1の他方のモノマーに位置する（Gremlin-1の二量体はBMP二量体に結合する）。

10

【0111】

X線結晶構造解析によって決定したときに抗体パラトープがGremlin-1残基の4 Å以内にある場合、抗体は、上記Gremlin-1残基に結合することができる。

【0112】

本明細書に開示されるエピトープに結合する抗体は、配列番号4～6の重鎖CDR配列（それぞれHCDR1/HCDR2/HCDR3）の少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てを含み得る。これらは、Kabatt法を用いて決定した実施例のAb7326抗体のHCDR1/HCDR2/HCDR3配列である。

20

【0113】

CDR配列を決定するためのKabatt法及びChothia法は、当技術分野において周知である（他の技術と同様に）。CDR配列は、任意の適切な方法を用いて決定することができる。本発明では、典型的にはKabattを使用するが、他の技術も同様に使用することができる。本例では、配列番号3は、Chothia及びKabattの複合定義を用いて決定したAb7326のHCDR1配列を表す。

【0114】

本発明に従って使用される抗体は、配列番号7～9の軽鎖CDR配列（それぞれLCDR1/LCDR2/LCDR3）の少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てを含んでよい。これらは、Kabatt法を用いたAb7326のLCDR1/LCDR2/LCDR3配列である。

30

【0115】

好ましくは、抗体は、配列番号6の少なくともHCDR3配列を含む。

【0116】

典型的には、抗体は、配列番号4～6から選択される少なくとも1つの重鎖CDR配列及び配列番号7～9から選択される少なくとも1つの軽鎖CDR配列を含む。抗体は、配列番号4～6から選択される少なくとも2つの重鎖CDR配列及び配列番号7～9から選択される少なくとも2つの軽鎖CDR配列を含んでいてもよい。抗体は、典型的には、配列番号4～6の3つの重鎖CDR配列全て（それぞれHCDR1/HCDR2/HCDR3）及び配列番号7～9の3つの軽鎖CDR配列全て（それぞれLCDR1/LCDR2/LCDR3）を含む。抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体であってよい。

40

【0117】

抗体は、配列番号10又は12の重鎖可変領域（HCVR）配列（Ab7326のHCVRの変異体1及び2）を含み得る。抗体は、配列番号11又は13の軽鎖可変領域（LCVR）配列（Ab7326のLCVRの変異体1及び2）を含み得る。抗体は、好ましくは、配列番号10又は12の重鎖可変領域配列及び配列番号11又は13の軽鎖可変領域配列を含む（特に、配列番号10/11又は12/13のHCVR/LCVR対）。

50

【0118】

抗体は、

配列番号14のマウス完全長IgG1重鎖変異体1、又は
配列番号28のマウス完全長IgG1重鎖変異体2、又は
配列番号30のヒト完全長IgG1重鎖変異体1、又は
配列番号16のヒト完全長IgG1重鎖変異体2、又は
配列番号22のヒト完全長IgG4P重鎖変異体1、又は
配列番号34のヒト完全長IgG4P重鎖変異体2、又は
配列番号18のFab重鎖変異体1、又は
配列番号32のFab重鎖変異体2

10

の重鎖（H鎖）配列を含み得る。

【0119】

抗体は、

配列番号15のマウス完全長IgG1軽鎖変異体1、又は
配列番号29のマウス完全長IgG1軽鎖変異体2、又は
配列番号31のヒト完全長IgG1軽鎖変異体1、又は
配列番号17のヒト完全長IgG1軽鎖変異体2、又は
配列番号23のヒト完全長IgG4P軽鎖変異体1、又は
配列番号35のヒト完全長IgG4P軽鎖変異体2、又は
配列番号19のFab軽鎖変異体1、又は
配列番号33のFab軽鎖変異体2

20

の軽鎖（L鎖）配列を含み得る。

【0120】

一例では、抗体は、

配列番号14／15のマウス完全長IgG1変異体1、又は
配列番号28／29のマウス完全長IgG1変異体2、又は
配列番号30／31のヒト完全長IgG1変異体1、又は
配列番号16／17のヒト完全長IgG1変異体2、又は
配列番号22／23のヒト完全長IgG4P変異体1、又は
配列番号34／35のヒト完全長IgG4P変異体2、又は
配列番号18／19のFab軽鎖変異体1、又は
配列番号32／33のFab軽鎖変異体2

30

の重鎖／軽鎖配列対を含む。

【0121】

対応する配列の変異体形態は、相互に交換可能である。例えば、抗体は、

配列番号14／29のマウス完全長IgG1重鎖変異体1／軽鎖変異体2、又は
配列番号28／15のマウス完全長IgG1重鎖変異体2／軽鎖変異体1、又は
配列番号30／17のヒト完全長IgG1重鎖変異体1／軽鎖変異体2、又は
配列番号16／31のヒト完全長IgG1重鎖変異体2／軽鎖変異体1、又は
配列番号22／35のヒト完全長IgG4P重鎖変異体1／軽鎖変異体2、又は
配列番号34／23のヒト完全長IgG4P重鎖変異体2／軽鎖変異体1、又は
配列番号18／33のFab重鎖変異体1／軽鎖変異体2、又は
配列番号32／19のFab重鎖変異体2／軽鎖変異体1。

40

の重鎖／軽鎖配列対を含み得る。

【0122】

抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体であってよい。

【0123】

あるいは、抗体は、上に列挙した特定の配列のうちの1つの変異体であってもよく、該変異体を含んでもよい。抗体変異体についての以下の説明は、上記のGREM1ポリペプチド変異体の選択にも適用可能である。

50

【0124】

例えば、変異体は、上記アミノ酸配列のいずれかの置換、欠失、又は付加変異体であってよい。

【0125】

変異体抗体は、上述の特定の配列のうちの1、2、3、4、5、10以下、20以下、又はそれ以上（典型的には最大50以下）のアミノ酸の置換及び／又は欠失を含み得る。「欠失」変異体は、個々のアミノ酸の欠失、2、3、4若しくは5アミノ酸等の小さなアミノ酸群の欠失、又は特定のアミノ酸ドメイン若しくは他の機構の欠失等のより大きなアミノ酸領域の欠失を含み得る。「置換」変異体は、典型的には、1つ以上のアミノ酸を同じ数のアミノ酸で置換すること、及び保存的アミノ酸置換を行うことを含む。例えば、アミノ酸を、類似の性質を有する別のアミノ酸、例えば、別の塩基性アミノ酸、別の酸性アミノ酸、別の中性アミノ酸、別の荷電アミノ酸、別の親水性アミノ酸、別の疎水性アミノ酸、別の極性アミノ酸、別の芳香族アミノ酸、又は別の脂肪族アミノ酸で置換してよい。好適な置換基を選択するために使用することができる20種の主なアミノ酸の幾つかの性質は、以下の通りである：

【0126】

【表1】

Ala	脂肪族、疎水性、中性	Met	疎水性、中性
Cys	極性、疎水性、中性	Asn	極性、親水性、中性
Asp	極性、親水性、荷電(-)	Pro	疎水性、中性
Glu	極性、親水性、荷電(-)	Gln	極性、親水性、中性
Phe	芳香族、疎水性、中性	Arg	極性、親水性、荷電(+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	極性、親水性、中性
His	芳香族、極性、親水性、荷電(+)	Thr	極性、親水性、中性
Ile	脂肪族、疎水性、中性	Val	脂肪族、疎水性、中性
Lys	極性、親水性、荷電(+)	Trp	芳香族、疎水性、中性
Leu	脂肪族、疎水性、中性	Tyr	芳香族、極性、疎水性

【0127】

「誘導体」又は「変異体」は、一般に、天然に存在するアミノ酸の代わりに、配列中に存在するアミノ酸がその構造類似体であるものを含む。また、配列において使用されるアミノ酸は、抗体の機能が著しく悪影響を受けることのない限り、誘導体化又は修飾、例えば、標識されていてもよい。

【0128】

上記の誘導体及び変異体は、抗体の合成中に、又は生成後の修飾によって、又は抗体が組換え体の形態である場合、核酸の部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は酵素的切断及び／若しくはライゲーションの公知の技術を用いて調製することができる。

【0129】

変異体抗体は、本明細書に開示されるアミノ酸配列（特に、HCV R／LCV R配列、並びにH鎖及びL鎖の配列）に対して約60%超、又は約70%超、例えば75%又は80%、典型的には約85%超、例えば約90%超又は約95%超のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。更に、抗体は、これら配列について開示される正確なCDRを保持しながら、本明細書に開示されるHCV R／LCV R配列並びにH鎖及びL鎖の配列に対して約60%超、又は約70%超、例えば75%又は80%、典型的には約85%超、例えば約90%超又は約95%超のアミノ酸同一性を有する変異体であってもよい。

変異体は、本明細書に開示されるH C V R / L C V R配列並びにH鎖及びL鎖の配列に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を保持し得る（幾つかの状況では、正確なC D Rを保持しながら）。

【0130】

変異体は、典型的には、約60%～約99%の同一性、約80%～約99%の同一性、約90%～約99%の同一性、又は約95%～約99%の同一性を保持する。このアミノ酸同一性のレベルは、関連する配列番号の配列の全長にわたって、又は配列の一部にわたって、例えば、完全長ポリペプチドのサイズに応じて、約20、30、50、75、100、150、200、又はそれ以上のアミノ酸にわたってみられ得る。

10

【0131】

アミノ酸配列に関連して、「配列同一性」とは、以下のパラメータでC l u s t a l W (Thompson et al., 1994、上記)を用いて評価したときに指定の値を有する配列を指す：

ペアワイズアラインメントパラメーター方法：正確、マトリクス：P A M、ギャップオープンペナルティ：10.00、ギャップエクステンションペナルティ：0.10；

マルチプルアライメントパラメーターマトリクス：P A M、ギャップオープンペナルティ：10.00、遅延についての同一性%：30、エンドギャップのペナルティ：オン、ギャップの分離距離：0、ネガティブマトリクス：なし、ギャップエクステンションペナルティ：0.20、残基特異的ギャップペナルティ：オン、親水性ギャップペナルティ：オン、親水性残渣：G P S N D Q E K R。特定の残基における配列同一性は、単に誘導体化されている同一の残基を含むことを意図する。

20

【0132】

従って、これら鎖の機能又は活性を維持する特定の配列及び変異体を有する抗体が提供される。

【0133】

抗体は、H鎖／L鎖、H C V R / L C V R、又はC D Rの配列の観点で上に定義されたものと、G r e m l i n - 1への結合について競合してもよく、又は同じエピトープに結合してもよい。特に、抗体は、配列番号4 / 5 / 6 / 7 / 8 / 9のH C D R 1 / H C D R 2 / H C D R 3 / L C D R 1 / L C D R 2 / L C D R 3配列の組み合わせを含む抗体と、G r e m l i n - 1への結合について競合してもよく、又は同じエピトープに結合してもよい。抗体は、配列番号10 / 11若しくは12 / 13のH C V R及びL C V R配列対、又は配列番号14 / 15若しくは16 / 17の完全長鎖を含む抗体と、G r e m l i n - 1への結合について競合してもよく、又は同じエピトープに結合してもよい。

30

【0134】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原の領域である。エピトープは、構造的又は機能的と定義することができる。機能的エピトープは、一般に、構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与する残基を有する。エピトープはまた、高次構造を有していてもよい、すなわち、非線状アミノ酸で構成されていてもよい。特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基等の分子の化学的に活性な表面基である決定基を含んでいてよく、特定の実施形態では、特定の三次元構造特性、及び／又は特定の電荷特性を有していてもよい。

40

【0135】

当技術分野において公知のルーチンな方法を使用することによって、抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するかどうか又は参照抗体と結合について競合するかどうかを容易に判定することができる。例えば、試験抗体が本発明の参照抗体と同じエピトープに結合するかどうかを判定するには、飽和条件下で参照抗体をタンパク質又はペプチドに結合させる。次に、試験抗体の該タンパク質又はペプチドに結合する能力を評価する。参照抗体との飽和結合後、試験抗体が該タンパク質又はペプチドに結合できる場合、試験抗体は参照抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。他方、参照抗体との

50

飽和結合後、試験抗体が該タンパク質又はペプチドに結合できない場合、試験抗体は、本発明の参照抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合することができる。

【0136】

抗体が参照抗体と結合について競合するかどうかを判定するには、上記の結合方法を2つの向きで実施する。第1の向きでは、飽和条件下で参照抗体をタンパク質／ペプチドに結合させ、続いて、試験抗体の該タンパク質／ペプチド分子への結合を評価する。第2の向きでは、飽和条件下で試験抗体をタンパク質／ペプチドに結合させ、続いて、参照抗体の該タンパク質／ペプチドへの結合を評価する。両方の向きにおいて、第1の（飽和）抗体のみが該タンパク質／ペプチドに結合できる場合、試験抗体及び参照抗体が該タンパク質／ペプチドに対する結合について競合すると結論付けられる。当業者には理解される通り、参照抗体と結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープに結合するとは限らず、重複するエピトープ又は隣接するエピトープに結合することによって参照抗体の結合を立体的にブロックする場合もある。

10

【0137】

それぞれが他方の抗原への結合を競合的に阻害（ブロック）する場合、2つの抗体は、同じ又は重複するエピトープに結合する。すなわち、一方の抗体が1倍、5倍、10倍、20倍、又は100倍過剰であると、競合結合アッセイで測定したとき、他方の結合を少なくとも50%、75%、90%、又は更には99%阻害する（例えば、Jung et al., Cancer Res, 1990: 50: 1495-1502を参照）。あるいは、一方の抗体の結合を低減又は排除する抗原における本質的に全てのアミノ酸突然変異が他方の抗体の結合を低減又は排除する場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を低減又は排除する幾つかのアミノ酸突然変異が他方の抗体の結合を低減又は排除する場合、2つの抗体は、重複するエピトープを有する。

20

【0138】

次いで、追加のルーチンな実験（例えば、ペプチドの突然変異及び結合分析）を実施して、観察された試験抗体の結合の欠如が、実際に参照抗体と同じエピトープへの結合によるものであるかどうか、又は観察された結合の欠如の原因が立体的なブロッキング（又は別の現象）であるかどうかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、又は当技術分野で利用可能な任意の他の定量的若しくは定性的な抗体結合アッセイを用いて実施することができる。

30

【0139】

抗体は、例えば、標準的なELISA又はウェスタンブロッティングにより、Gremli-1への結合について試験することができる。ELISAアッセイは、標的タンパク質に陽性反応性を示すハイブリドーマのスクリーニングにも使用することができる。また、抗体の結合選択性は、例えばフローサイトメトリーによって、標的タンパク質を発現している細胞に対する抗体の結合をモニタリングすることによって判定することもできる。従って、スクリーニング方法は、ELISA若しくはウェスタンブロットを実施することにより又はフローサイトメトリーにより、Gremli-1に結合することができる抗体を同定する工程を含んでよい。

【0140】

抗体は、Gremli-1を選択的に（又は特異的に）認識することができる。選択的であるタンパク質には優先的に又は高親和性で結合するが、他のタンパク質には実質的に結合しないか又は低親和性でしか結合しない場合、抗体又は他の化合物は該タンパク質「に選択的に結合する」又は「を選択的に認識する」。上述したように、抗体が他の関連するタンパク質と結合するかどうか、又は抗体が他の関連するタンパク質同士を識別するかどうかを判定することによって、抗体の選択性について更に研究することができる。本発明に従って使用される抗体は、典型的には、ヒトGremli-1を認識する。

40

【0141】

抗体はまた、関連するタンパク質、又はヒトGremli-1及び他の種由来のGremli-1に対して交差反応性を有する場合がある。

50

【0142】

特異的（又は選択的）であることにより、抗体は、任意の他の分子に対して顕著な交差反応性を示さずに、関心対象のタンパク質に結合することが理解されるであろう。交差反応性は、本明細書に記載の任意の好適な方法によって評価することができる。抗体が関心対象のタンパク質に結合する強度の少なくとも約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、又は100%の強度で他の分子に結合する場合、抗体の交差反応性が顕著であるとみなしてよい。特異的（又は選択的）な抗体は、関心対象のタンパク質に結合する強度の約90%、約85%、約80%、約75%、約70%、約65%、約60%、約55%、約50%、約45%、約40%、約35%、約30%、約25%、又は約20%未満の強度で別の分子に結合し得る。抗体は、関心対象のタンパク質に結合する強度の約20%未満、約15%未満、約10%未満、又は約5%未満、約2%未満、又は約1%未満の強度で他の分子に結合し得る。

10

【0143】

抗gremlin抗体については既に記載されており、例えば、国際公開第2014/159010A1号（Regeneron）には、25℃で625pM～270nMの範囲の結合親和性 K_D 値を有する、Gremlin-1活性を阻害する抗gremlin抗体が記載されている。Ciuculanら（2013）は、結合親和性 K_D が 5.6×10^{-10} Mである抗Gremlin-1モノクローナル抗体について記載している。

【0144】

本明細書に新たに記載される抗Gremlin-1抗体（全体が参照により本明細書に援用される、2017年12月19日に出願された国際出願第PCT/GB2017/083650号にも記載）は、Gremlin-1活性のアロステリック阻害剤であり、BMP結合部位から遠位の上記新規エピトープに結合する。該抗体は、 K_D 値<100pMの極めて高い親和性でGremlin-1に結合する。従って、該抗体は、現在利用可能な抗体を超える顕著な改善を示し、Gremlin-1媒介疾患の治療に特に有用であると予測される。

20

【0145】

従って、本発明の使用に好適な抗体は、（ヒト）Gremlin-1に対して高い結合親和性を有し得る。抗体は、<1nM未満、好ましくは<500pMの解離定数（ K_D ）を有し得る。一例では、抗体は、200pM未満の解離定数（ K_D ）を有する。一例では、抗体は、100pM未満の解離定数（ K_D ）を有する。当業者には周知である通り、抗体の標的抗原に対する結合親和性を求めるために、表面プラズモン共鳴アッセイ、飽和アッセイ、又はELISA若しくはRIA等のイムノアッセイ等の様々な方法を使用することができる。結合親和性を求めるための例示的な方法は、Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. February; 44 (5): 916-25. (Epub 2006 May 11) に記載の通り、CM5センサーチップを用いてBIAcore（商標）2000機器（Biacore AB, Freiburg, Germany）において表面プラズモン共鳴分析を行うことによる。

30

【0146】

本発明に従って使用される抗体は、典型的には、阻害抗体である。Gremlin-1は、BMP-2、4、及び7を負に制御するので、Gremlin-1を阻害すると、BMPを介したシグナル伝達が増加する。

【0147】

上述したように、本願の実施例は、抗体がGremlin-1を阻害することができるかどうかをスクリーニングするための2つの機能アッセイ、すなわち、SMADリン酸化アッセイ及びHek Id1レポーター遺伝子アッセイについて説明する。典型的には、阻害抗体は、SMADのリン酸化を回復させる及び／又はHek Id1レポーター遺伝子アッセイにおいてBMPのシグナル伝達を回復させる。SMADのリン酸化は、BMP対照と比較して、少なくとも80%、90%、又は100%まで回復させることができる

40

50

。H e k I d 1レポーター遺伝子アッセイでは、阻害抗体は、1 0 n M未満、好ましくは5 n M未満のI C 5 0を有し得る。

【0 1 4 8】

好適な抗体を同定し、選択したら、当該技術分野において公知の方法により、抗体のアミノ酸配列を同定してよい。抗体をコードしている遺伝子は、縮重プライマーを用いてクローニングすることができる。抗体は、ルーチンな方法で組換え的に生成され得る。

【0 1 4 9】

本開示はまた、本明細書に新たに記載される抗体分子の重鎖及び／又は軽鎖可変領域（複数可）（又は完全長H鎖及びL鎖）をコードしている単離されたDNA配列を提供する。

【0 1 5 0】

変異体ポリヌクレオチドは、配列表に与えられる核酸配列（G R E M 1及び抗G R E M 1抗体の核酸配列を含む）のいずれかのうちの1個、2個、3個、4個、5個、10個以下、20個以下、30個以下、40個以下、50個以下、75個以下、又はそれ以上の核酸の置換及び／又は欠失を含んでいてもよい。一般に、変異体は、1～20個、1～50個、1～75個、又は1～100個の置換及び／又は欠失を有する。

【0 1 5 1】

好適な変異体は、本明細書に開示される核酸配列のいずれか1つのポリヌクレオチドに対して少なくとも約70%、典型的には少なくとも約80%又は約90%、より好適には少なくとも約95%、約97%、又は約99%相同性であってよい。変異体は、少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を保持し得る。変異体は、典型的には、約60%～約99%の同一性、約80%～約99%の同一性、約90%～約99%の同一性、又は約95%～約99%の同一性を保持する。これらレベルの相同性及び同一性は、少なくともポリヌクレオチドのコーディング領域に関して一般的に存在する。相同性を測定する方法は当技術分野において周知であり、現在の状況では、相同性は核酸の同一性に基づいて計算されることが当業者には理解されるであろう。このような相同性は、（長さに応じて）少なくとも約15、少なくとも約30、例えば、少なくとも約40、約60、約100、約200、又はそれ以上のヌクレオチドの連続する領域にわたって存在し得る。このような相同性は、修飾されていないポリヌクレオチド配列の全長にわたって存在し得る。

【0 1 5 2】

ポリヌクレオチドの相同性又は同一性を測定する方法は、当技術分野において公知である。例えば、U W G C Gパッケージは、相同性を計算するために使用することができる（例えば、そのデフォルト設定で使用される）B E S T F I Tプログラムを提供する（D e v e r e u x e t a l（1984）N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 12, p 387-395）。

【0 1 5 3】

例えば、A l t s c h u l S . F .（1993）J M o l E v o l 36:290-300; A l t s c h u l , S , F e t a l（1990）J M o l B i o l 215:403-10に記載の通り、P I L E U P及びB L A S Tのアルゴリズムを使用し、（典型的には、そのデフォルト設定で）相同性を計算するか又は配列を並べることができる。

【0 1 5 4】

B L A S T解析を実施するためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）を通して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列における同じ長さのワードとアラインメントしたときに幾つかの正の値の閾値スコアTに一致するか又は満たす、クエリー配列における長さWの短いワードを同定することによって、高スコア配列対（H S P）を同定することを含む。Tは、近傍ワードスコア閾値（n e i g h b o u r h o o d w o r d s c o r e t h r e s h o l d）と称される（A l t s c h u l e t a l、上記）。これら初期近傍ワード

10

20

30

40

50

ヒットは、それを含有するHSPを見つけるために検索を始めるためのシードとして作用する。累積アラインメントスコアが増加し得る限り、ワードヒットを各配列に沿って両方向に拡張する。1つ以上の負のスコアの残基アラインメントの累積に起因して累積スコアがゼロ以下になったとき；又はいずれかの配列の末端に達したときに、各方向におけるワードヒットの拡張を停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、及びXが、アラインメントの感度及び速度を決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、ワード長(W)11、BLOSUM62スコアリングマトリクス(Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919を参照されたい)アラインメント(B)50、期待値(E)10、M=5、N=4、及び両鎖の比較を使用する。

【0155】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計的解析を実施する；例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照されたい。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は最小和確率(the smallest sum probability) (P(N))であり、これは、2つのヌクレオチド又はアミノ酸の配列間の一致が偶然生じる確率の指標を提供する。例えば、第1の配列の第2の配列に対する比較における最小和確率が約1未満、典型的には約0.1未満、好適には約0.01未満、最も好適には約0.001未満である場合、ある配列が別の配列と類似しているとみなされる。例えば、最小和確率は、約1～約0.001、多くの場合、約0.01～約0.001の範囲であり得る。

【0156】

ホモログは、約3未満、約5未満、約10未満、約15未満、約20未満、又はそれ以上の突然変異(それぞれ置換、欠失又は挿入であってよい)だけ、関連するポリヌクレオチドにおける配列と異なってもよい。例えば、ホモログは、3～50個の突然変異、多くの場合3～20個の突然変異だけ異なってもよい。これら突然変異は、ホモログの少なくとも30個、例えば、少なくとも約40個、約60個、若しくは約100個、又はそれ以上の連続するヌクレオチドの領域にわたって測定され得る。

【0157】

一実施形態では、変異体配列は、遺伝子コードの重複性のために、配列表に与えられた特定の配列とは異なっている場合がある。DNAコードは、4つの主要な核酸残基(A、T、C、G)を有し、これらを使用して、生物の遺伝子にコードされているタンパク質のアミノ酸を表す3文字のコードンを「綴る」。DNA分子に沿ったコードンの線状配列は、その遺伝子によってコードされているタンパク質(複数可)のアミノ酸の線状配列に翻訳される。このコードは高度に縮重しており、61種のコードンが20種の天然アミノ酸をコードし、3種のコードンが「終止」シグナルを表している。従って、ほとんどのアミノ酸は1超のコードンによってコードされており、実際、幾つかのアミノ酸は4種以上の異なるコードンによってコードされている。従って、本発明の変異体ポリヌクレオチドは、本発明の別のポリヌクレオチドと同じポリペプチド配列をコードしている場合もあるが、同じアミノ酸をコードするために異なるコードンが使用されていることから、異なる核酸配列を有している場合もある。

【0158】

DNA配列は、例えば化学処理によって生成された合成DNA、cDNA、ゲノムDNA、又はこれらの任意の組み合わせを含み得る。

【0159】

本明細書に記載の抗体分子をコードしているDNA配列は、当業者に周知の方法により得ることができる。例えば、抗体の重鎖及び軽鎖の一部又は全てをコードしているDNA配列は、必要に応じて、決定されたDNA配列から又は対応するアミノ酸配列に基づいて合成することができる。

【0160】

10

20

30

40

50

ベクターを構築することができる一般的な方法であるトランスフェクション法及び培養法は、当業者に周知である。これに関しては、“Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York及びCold Spring Harbor Publishingによって作成されたthe Maniatis Manualを参照されたい。

【0161】

核酸アンタゴニスト

核酸等のポリヌクレオチドは、2つ以上のヌクレオチドを含むポリマーである。ヌクレオチドは、天然に存在するものであってもよく、人工的なものであってもよい。ヌクレオチドは、典型的には、核酸塩基、糖、及び少なくとも1つの連結基、例えば、リン酸基、2'-O-メチル基、2'-メトキシーエチル基、ホスホロアミデート基、メチルホスホネート基、又はホスホロチオエート基を含む。核酸塩基は、典型的には、複素環式である。核酸塩基としては、プリン及びピリミジン、より具体的には、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、ウラシル(U)、及びシトシン(C)が挙げられるが、これらに限定されない。糖は、典型的には、五炭糖である。ヌクレオチドの糖としては、リボース及びデオキシリボースが挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、典型的には、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは、典型的には、一リン酸、二リン酸、又は三リン酸を含む。リン酸は、ヌクレオチドの5'側又は3'側に結合し得る。

【0162】

ヌクレオチドとしては、アデノシン一リン酸(AMP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン一リン酸(GMP)、グアノシン二リン酸(GDP)、グアノシン三リン酸(GTP)、チミジン一リン酸(TMP)、チミジン二リン酸(TDP)、チミジン三リン酸(TTP)、ウリジン一リン酸(UMP)、ウリジン二リン酸(UDP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シチジン一リン酸(CMP)、シチジン二リン酸(CDP)、シチジン三リン酸(CTP)、5-メチルシチジン一リン酸、5-メチルシチジン二リン酸、5-メチルシチジン三リン酸、5-ヒドロキシメチルシチジン一リン酸、5-ヒドロキシメチルシチジン二リン酸、5-ヒドロキシメチルシチジン三リン酸、環状アデノシン一リン酸(cAMP)、環状グアノシン一リン酸(cGMP)、デオキサアデノシン一リン酸(dAMP)、デオキシアデノシン二リン酸(dADP)、デオキシアデノシン三リン酸(dATP)、デオキシグアノシン一リン酸(dGMP)、デオキシグアノシン二リン酸(dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、デオキシチミジン一リン酸(dTMP)、デオキシチミジン二リン酸(dTDP)、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)、デオキシウリジン一リン酸(dUMP)、デオキシウリジン二リン酸(dUDP)、デオキシウリジン三リン酸(dUTP)、デオキシシチジン一リン酸(dCMP)、デオキシシチジン二リン酸(dCDP)、及びデオキシシチジン三リン酸(dCTP)、5-メチル-2'-デオキシシチジン一リン酸、5-メチル-2'-デオキシシチジン二リン酸、5-メチル-2'-デオキシシチジン三リン酸、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン一リン酸、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン二リン酸、及び5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン三リン酸が挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP、又はdCMPから選択される。

【0163】

ヌクレオチドは、更なる修飾を含んでもよい。特に、好適な修飾ヌクレオチドとしては、2'-アミノピリミジン(例えば、2'-アミノシチジン及び2'-アミノウリジン)、2'-ヒドロキシルプリン(例えば、2'-フルオロピリミジン(例えば、2'-フルオロシチジン及び2'-フルオロウリジン)、ヒドロキシルピリミジン(例えば、5'-α-P-ボラノウリジン)、2'-O-メチルヌクレオチド(例えば、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルシチジン、及び2'-O-メチルウリジン)

、4'-チオピリミジン（例えば、4'-チオウリジン及び4'-チオシチジン）が挙げられるが、これらに限定されず、ヌクレオチドは、核酸塩基の修飾を有する（例えば、5-ペンチニル-2'-デオキシウリジン、5-（3-アミノプロピル）ウリジン、及び1,6-ジアミノヘキシル-N-5-カルバモイルメチルウリジン）。

【0164】

ポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドは、任意の方法で互いに結合してよい。ヌクレオチドは、リン酸結合、2'-O-メチル結合、2'-メトキシエチル結合、ホスホロアミデート結合、メチルホスホネート結合、又はホスホロチオエート結合によって結合し得る。ヌクレオチドは、典型的には、核酸のように、その糖及びリン酸基によって結合している。ヌクレオチドは、ピリミジン二量体のように、その核酸塩基を介して結合していてもよい。

10

【0165】

GREM1アンタゴニストは、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているポリヌクレオチドであってもよい。

【0166】

ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）等の核酸であってよい。ポリヌクレオチドは、ペプチド核酸（PNA）、グリセロール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、ロックド核酸（LNA）、モルホリノ核酸、又はヌクレオチド側鎖を有する他の合成ポリマー等、当技術分野において公知の任意の合成核酸であってもよい。ポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

20

【0167】

ポリヌクレオチド配列を、任意の好適な発現ベクターにクローニングしてもよい。発現ベクターにおいて、コンストラクトをコードしているポリヌクレオチド配列は、典型的には、宿主細胞によってコード配列を発現させることができる制御配列に機能可能に連結される。このような表現ベクターを使用して、コンストラクトを発現させることができる。

【0168】

一実施形態では、抗GREM1アンタゴニストは、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、遺伝子治療において使用するために提供され得る。ポリヌクレオチドは、インビボにおいて抗GREM1抗体を発現させることができる任意の好適なベクターで提供され得る。

30

【0169】

抗GREM1抗体をコードしているポリヌクレオチドは、DNA配列であってよい。DNA配列は、それを必要としている被験体に投与するための任意の好適なベクター、例えば、発現ベクターで提供され得る。例えば、インビボにおいて抗GREM1抗体を発現させることができる発現ベクターで、DNA配列を被験体に投与してよい。発現ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター等のウイルス発現ベクターであってよい。一実施形態では、抗GREM1アンタゴニストは、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているDNA配列である。一実施形態では、抗GREM1アンタゴニストは、遺伝子治療において使用するためのDNA配列であって、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているDNA配列である。一実施形態では、抗GREM1アンタゴニストは、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているDNA配列を含むAAVである。一実施形態では、抗GREM1アンタゴニストは、遺伝子治療において使用するためのAAVであって、本明細書に記載の抗GREM1抗体をコードしているDNA配列を含むAAVである。

40

【0170】

抗GREM1抗体をコードしているポリヌクレオチドは、RNA配列であってもよい。RNA配列は、任意の好適なベクターで、それを必要としている被験体に投与され得る。RNA配列は、メッセンジャーRNA（mRNA）配列であってもよい。mRNA配列は、安定化された形態で、それを必要としている被験体に投与することができる。例えば、mRNA配列は、脂質ナノ粒子（LNP）組成物で提供され得る。LNP組成物は、mR

50

N A 配列の安定性を高めるために該 m R N A 配列を封入することができる任意の好適な L N P を含んでいてよい。従って、一実施形態では、抗 G R E M 1 アンタゴニストは、本明細書に記載の抗 G R E M 1 抗体をコードしている安定化された m R N A 配列である。一実施形態では、抗 G R E M 1 アンタゴニストは、遺伝子治療において使用するための安定化された m R N A 配列であって、本明細書に記載の抗 G R E M 1 抗体をコードしている m R N A 配列である。一実施形態では、抗 G R E M 1 アンタゴニストは、本明細書に記載の抗 G R E M 1 抗体をコードしている m R N A を含む L N P 組成物である。一実施形態では、抗 G R E M 1 アンタゴニストは、遺伝子治療において使用するための L N P 組成物であって、本明細書に記載の抗 G R E M 1 抗体をコードしている m R N A を含む L N P 組成物である。

10

【0171】

用語「機能可能に連結される」とは、記載されている構成要素が、その意図される通りに機能することができる関係で並置されていることを指す。コード配列に「機能可能に連結された」制御配列は、該制御配列に適合する条件下でコード配列が発現するようにライゲーションされている。複数コピーの同じ又は異なるポリヌクレオチドをベクターに導入してもよい。

【0172】

次いで、発現ベクターを好適な宿主細胞に導入してよい。従って、コンストラクトをコードしているポリヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、適合する細菌宿主細胞に該ベクターを導入し、ポリヌクレオチド配列を発現させる条件下で該宿主細胞を増殖させることにより、コンストラクトを生成することができる。

20

【0173】

核酸ベースの G R E M 1 アンタゴニストは、G R E M 1 の発現を減少させることができる。タンパク質発現をノックダウンするためのアンチセンス及び R N A 干渉 (R N A i) の技術は、当技術分野において周知であり、標準的な方法を使用して、関心対象の分子の発現をノックダウンすることができる。アンチセンス及び s i R N A の技術はいずれも m R N A に干渉する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、m R N A の一部に結合 (ハイブリダイズ) することによって m R N A に干渉する。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、m R N A に対して相補的であるように設計される (ただし、後述するように、オリゴヌクレオチドは 100 % 相補的である必要はない)。すなわち、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、c D N A の一部であってもよい。ここでも、オリゴヌクレオチド配列は、c D N A 配列と 100 % 同一ではなくてもよい。これについては後述する。R N A i は、m R N A に結合し、タンパク質の発現を阻害することができる二本鎖 R N A 、例えば低分子干渉 R N A (s i R N A) 又は低分子ヘアピン R N A (s h R N A) を使用することを含む。

30

【0174】

従って、アンタゴニストは、G R E M 1 をコードしている m R N A に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、配列番号 36 若しくは配列番号 37 又はその変異体のコード配列であってよい。標的配列には優先的又は高親和性でハイブリダイズするが、他の配列に対しては実質的にハイブリダイズしない、ハイブリダイズしない、又は低親和性でしかハイブリダイズしない場合、オリゴヌクレオチドは、標的配列に対して「特異的にハイブリダイズする」。より好ましくは、オリゴヌクレオチドは、他の核酸についての T_m よりも少なくとも 5 °C、少なくとも少なくとも 10 °C、少なくとも 20 °C、少なくとも 30 °C、又は少なくとも 40 °C 高い T_m で、標的配列にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションを可能にする条件は、当技術分野において周知である (例えば、S a m b r o o k e t a l . , 2001, M o l e c u l a r C l o n i n g : a l a b o r a t o r y m a n u a l , 3 r d e d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o u r L a b o r a t o r y P r e s s ; 及び C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , C h a p t e r 2 , A u s u b e l e t a l . , E d s . , G r e e n e P u b l i s h i n g a n d W i l e y - L

40

50

nterscience, New York (1995))。ハイブリダイゼーション条件は、当技術分野において記載の通りのストリンジントな条件であってよい。

【0175】

オリゴヌクレオチドは、典型的には、50以下のヌクレオチド、例えば40以下、30以下、22以下、21以下、20以下、10以下、又は5以下のヌクレオチドを有する短いヌクレオチドポリマーである。使用されるオリゴヌクレオチドは、20～25ヌクレオチド長、より好ましくは21又は22ヌクレオチド長であってよい。ヌクレオチドは、天然に存在するものであってもよく、人工的なものであってもよい。ヌクレオチドは、上記のもののうちのいずれであってよい。

【0176】

GREM1アンタゴニストは、GREM1に結合する、典型的にはGREM1に特異的に結合する抗体であってよい。あるタンパク質には優先的又は高親和性で結合するが、他のタンパク質には実質的には結合しない、結合しない、又は低親和性でしか結合しない場合、抗体は、そのタンパク質に「特異的に結合する」。例えば、標的には優先的又は高親和性で結合するが、他のヒトタンパク質には実質的には結合しない、結合しない、又は低親和性でしか結合しない場合、抗体は、その標的分子に「特異的に結合する」。

【0177】

1×10⁻⁷M以下、より好ましくは5×10⁻⁸M以下、より好ましくは1×10⁻⁸M以下、より好ましくは5×10⁻⁹M以下のK_dで結合する場合、抗体は、優先的に又は高親和性で結合する。1×10⁻⁶M以上、より好ましくは1×10⁻⁵M以上、より好ましくは1×10⁻⁴M以上、より好ましくは1×10⁻³M以上、更に好ましくは1×10⁻²M以上のK_dで結合する場合、抗体は、低親和性で結合する。抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、CDRグラフト抗体、又はヒト化抗体であってよい。抗体は、インタクトな免疫グロブリン分子、又はその断片、例えば、Fab、F(ab')₂、若しくはFvの断片であってよい。

【0178】

患者

任意の患者を本発明に従って治療することができる。患者は、典型的にはヒトである。ただし、患者は、別の哺乳動物、例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、魚、ニワトリ、若しくはブタ等の商業的に飼育されている動物、マウス若しくはラット等の実験動物、又はモルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、若しくはイヌ等のペットであってよい。

【0179】

医薬品組成物、投与量、及び投与レジメン

本発明のGREM1アンタゴニストは、医薬組成物で提供されてもよい。医薬組成物は、通常無菌であり、典型的には、薬学的に許容し得る担体及び／又はアジュバントを含む。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容し得るアジュバント及び／又は担体を更に含んでいてもよい。

【0180】

本明細書で使用する時、「薬学的に許容し得る担体」は、生理学的に適合する任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。担体は、非経口的、例えば、静脈内、筋肉内、皮内、眼内、腹腔内、皮下、脊髄、又は他の非経口的な投与経路、例えば、注射又は注入に好適であり得る。あるいは、担体は、局所、上皮、又は粘膜の投与経路等の非非経口的な投与(non-parenteral administration)に好適であり得る。担体は、経口投与に好適であってよい。投与経路に応じて、化合物を不活化する可能性のある酸及び他の自然条件の作用から該化合物を保護するための材料で調節因子をコーティングしてもよい。

【0181】

本発明の医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容し得る塩を含んでいてもよい。「薬学的に許容し得る塩」とは、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、任意の不所望の毒性

10

20

30

40

50

作用を与えることのない塩を指す。このような塩の例としては、酸付加塩及び塩基付加塩が挙げられる。

【0182】

薬学的に許容し得る担体は、水性の担体又は希釈剤を含む。本発明の医薬組成物において使用することができる好適な水性担体の例としては、水、緩衝水、及び生理食塩水が挙げられる。他の担体の例としては、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、及びこれらの好適な混合物、オリーブオイル等の植物油、並びにオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール等のポリアルコール、又は塩化ナトリウムを含むことが望ましい。

10

【0183】

治療組成物は、典型的には、無菌でなければならず、製造及び保管の条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リボソーム、又は高薬物濃度に好適な他の秩序構造として製剤化することができる。

【0184】

本発明の医薬組成物は、追加の活性成分を含んでいてもよい。

【0185】

また、本明細書に記載のアンタゴニストと使用説明書とを含むキットも本開示の範囲内である。キットは、本明細書で論じる通りの追加の治療剤又は予防剤等の1つ以上の追加の試薬を更に含有していてもよい。

20

【0186】

本明細書に記載のアンタゴニスト又はその製剤若しくは組成物は、予防的及び／又は治療的処置のために投与してよい。

【0187】

治療用途では、既に上記の障害又は病態に罹患している被験体に、病態又はその症状のうちの1つ以上を治癒、緩和、又は部分的に停止させるのに十分な量の化合物を投与する。このような治療的処置の結果、疾患の症状の重症度が低下し得る又は無症状期間の頻度若しくは期間が増加し得る。これを達成するのに適切な量を「治療上有効な量」と定義する。

【0188】

予防用途では、上記の障害又は病態のリスクを有する被験体に、病態又はその症状のうちの1つ以上のその後の作用を予防又は低減するのに十分な量の製剤を投与する。これを達成するのに適切な量を「予防上有効な量」と定義する。それぞれの目的のための有効量は、疾患又は傷害の重症度、並びに被験体の体重及び全身状態に依存する。

30

【0189】

投与する被験体は、ヒトであっても非ヒト動物であってもよい。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等を含む。ヒトへの投与が典型的である。

【0190】

本発明のアンタゴニスト又は医薬組成物は、当該技術分野において公知の様々な方法のうちの1つ以上の方法を用い、1つ以上の投与経路を介して投与してよい。当業者には理解される通り、投与経路及び／又は投与モードは、所望の結果に応じて変化する。本発明の化合物又は医薬組成物の投与経路の例としては、静脈内、筋肉内、皮内、眼内、腹腔内、皮下、脊髄、又は他の非経口的な投与経路、例えば、注射又は注入が挙げられる。「非経口投与」という表現は、本明細書で使用する時、経腸投与及び局所投与以外の投与モードを意味し、通常は注射による。あるいは、本発明の抗体／調節剤又は医薬組成物は、非非経口的な経路(non-parenteral route)、例えば、局所、上皮、又は粘膜の投与経路を介して投与してもよい。本発明の抗体／調節剤又は医薬組成物は、経口投与用であってもよい。

40

50

【0191】

本発明の抗体／調節剤又は医薬組成物の好適な投与量は、熟練の医師によって決定される。本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与レベルは、患者にとって毒性であることなく、特定の患者、組成物、及び投与モードについて所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分の量が得られるように変化させてもよい。選択される投与量レベルは、使用される本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排泄速度、治療の持続時間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、及び／又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康、及び前病歴、並びに医学分野で周知である同様の要因を含む様々な薬物動態学的要因に依存する。

10

【0192】

好適な用量は、例えば、治療される患者の約0.01 µg/kg（体重）～約1000 mg/kg（体重）、典型的には約0.1 µg/kg（体重）～約100 mg/kg（体重）の範囲であってよい。例えば、好適な投与量は、1日あたり約1 µg/kg（体重）～約10 mg/kg（体重）、又は1日あたり約10 µg/kg（体重）～約5 mg/kg（体重）であってよい。

【0193】

投与レジメンは、最適な所望の応答（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く、経時的に何回か分割用量を投与してもよく、治療状況の要件によって示唆される通り用量を比例的に減少させたり、増加させたりしてもよい。本明細書で使用するとき、単位剤形とは、治療される被験体にとって投与単位として適している物理的に分離している単位を指し、各単位は、必要な医薬担体と共同して所望の処置効果を生じさせるように計算された所定の量の活性化合物を含有する。

20

【0194】

投与は、1回であってもよく、複数回であってもよい。同じ又は異なる経路を介して、同じ又は異なる箇所に複数回投与してよい。あるいは、徐放性製剤を介して投与してもよく、この場合には、必要な投与頻度がより少なくなる。投与量及び頻度は、患者におけるアンタゴニストの半減期及び所望の治療期間に応じて変化させてよい。

【0195】

上述した通り、本発明の調節因子／抗体又は医薬組成物は、1つ又は他のより多くの他の治療剤と共投与されてもよい。

30

【0196】

2つ以上の剤の併用投与は、多数の異なる方法で達成することができる。両者を単一の組成物と一緒に投与してもよく、又は併用療法の一部として別々の組成物で投与してもよい。例えば、一方を他方の前に、すなわち別々に投与してもよく、他方の後に、すなわち逐次投与してもよく、一斉に、すなわち同時に投与してもよい。

【0197】

医薬組成物及び投与モード

本明細書に記載の治療方法において使用するためのアンタゴニストは、医薬組成物に配合してもよい。これら組成物は、治療上活性のある成分（複数可）に加えて、薬学的に許容し得る賦形剤、担体、希釈剤、緩衝剤、安定化剤、又は当業者に周知の他の材料を含んでいてよい。このような材料は、非毒性でなければならず、そして、活性成分の有効性に干渉してはならない。医薬担体又は希釈剤は、例えば、等張溶液であってよい。

40

【0198】

担体又は他の材料の正確な性質は、投与経路、例えば、経口、静脈内、皮膚若しくは皮下、鼻腔内、筋肉内、及び腹腔内の経路に依存し得る。例えば、固体経口形態は、活性物質と共に、希釈剤、例えば、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、セルロース、コーンスターチ、又はバレイショデンプン；滑沢剤、例えば、シリカ、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、若しくはステアリン酸カルシウム、及び／又はポリエチレングリコール；結合剤；例えば、デンプン、アラビアガム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメ

50

セルロース、又はポリビニルピロリドン；脱凝集剤、例えば、デンプン、アルギン酸、アルギン酸塩、又はデンプングリコール酸ナトリウム；飽和剤；染料；甘味料；湿潤剤、例えば、レシチン、ポリソルベート、ラウリル硫酸塩；並びに一般に、医薬製剤で利用される非毒性かつ薬理的に不活性な物質を含有してよい。このような医薬調製品は、公知の方法で製造することができ、例えば、混合、造粒、打錠、糖衣、フィルムコーティングのプロセス等を用いて製造することができる。

【0199】

経口製剤は、例えば、医薬グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常使用される賦形剤を含む。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤、又は散剤の形態をとり、活性成分を10%～95%、好ましくは25%～70%含有する。医薬組成物を凍結乾燥させる場合、凍結乾燥した材料を、投与前に、例えば懸濁液等に再構成してもよい。再構成は、好ましくは緩衝液中で行われる。

10

【0200】

例えば、Eudragit「S」、Eudragit「L」、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、又はヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む腸溶性コーティングを有する、個体に経口投与するためのカプセル剤、錠剤、及び錠剤を提供することができる。

【0201】

経口投与用の液体分散剤は、シロップ剤、乳剤、又は懸濁剤であってよい。シロップ剤は、担体として、例えば、ショ糖、又はグリセリン及び／若しくはマニトール及び／若しくはソルビトールと共にショ糖を含有してよい。

20

【0202】

懸濁剤及び乳剤は、担体として、例えば、天然ガム、アガー、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、又はポリビニルアルコールを含有してよい。筋肉内注射用の懸濁剤又は液剤は、活性物質と共に、薬学的に許容し得る担体、例えば、滅菌水、オリーブ油、オレイン酸エチル、グリコール、例えばプロピレングリコール、及び必要に応じて好適な量の塩酸リドカインを含有してよい。

【0203】

静脈内投与又は注入用の液剤は、担体として、例えば、滅菌水を含有してよく、又は好ましくは、滅菌、水性、等張生理食塩水の形態であってよい。

30

【0204】

坐剤の場合、従来の結合剤及び担体は、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドを含んでよく、このような坐剤は、0.5%～10%、好ましくは1%～2%の範囲の活性成分を含有する混合物から形成され得る。

【0205】

ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド阻害剤は、ネイキッドヌクレオチド配列であってもよく、カチオン性脂質、ポリマー、又はターゲティング系と組み合わせられてもよい。これらは、任意の利用可能な技術によって送達することができる。例えば、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、針注射により、好ましくは皮内、皮下、又は筋肉内に導入してよい。あるいは、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、粒子媒介遺伝子送達等の送達デバイスを使用して、皮膚を超えて直接送達してもよい。ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、皮膚に局所的に投与してもよく、例えば、鼻腔内、経口、又は直腸内の投与により粘膜表面に投与してもよい。

40

【0206】

ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドのコンストラクトの取り込みは、幾つかの既知のトランスフェクション技術、例えば、トランスフェクション剤の使用を含むものによって増強され得る。これら剤の例としては、カチオン性剤、例えば、リン酸カルシウム及びDEAE-デキストラン、並びにリポフェクション剤、例えば、リポフェクタム及びトランスフェクタムが挙げられる。投与されるポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの

50

投与量は、変更することができる。

【0207】

投与は、典型的には、「予防上有効な量」又は「治療上有効な量」（場合によっては、予防が治療とみなされる場合もあるが）で行われ、これは、個体に対して効果を示すのに十分な量であり、例えば、疾患若しくは病態の発病を予防若しくは遅延させる、1つ以上の症状を改善する、寛解を誘導若しくは延長する、又は再発を遅延させるのに有効な量である。

【0208】

用量は、様々なパラメータ、特に使用される物質；治療される個体の年齢、体重、及び状態；投与経路；並びに必要なレジメンに応じて決定され得る。医師は、任意の特定の個体に必要な投与経路及び投与量を決定することができる。典型的な日用量は、上記の条件に応じて体重1kgあたり約0.1～50mgである。用量は、単回投与されてもよく、複数回投与されてもよく、例えば、1時間ごとに2回、3回、又は4回投与する等、一定間隔で服用されてもよい。典型的には、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド阻害剤は、1pg～1mg、好ましくは、粒子媒介送達の場合は1pg～10µgの核酸、他の経路の場合は10µg～1mgの範囲で投与される。

【0209】

上述の技術及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkinsに見出すことができる。

【0210】

治療的組み合わせ

上記の本発明の組成物は、単独で、又は例えば補助療法として、他の治療用組成物若しくは治療と組み合わせて使用／投与することができる。他の治療用組成物又は治療は、例えば、本明細書で論じるもののうちの1つ以上であってよく、本発明の組成物と同時に又は逐次投与してよい。

【0211】

上述した通り、GREM1アンタゴニストは、化学療法剤等の別の抗がん剤又は放射線療法若しくは外科手術等の別のがん治療法に対してがん又は腫瘍を感作するために使用され得るので、併用治療において特に有用である。がんは、GREM1アンタゴニストの非存在下では他の抗がん剤又はがん治療法に対して抵抗性である場合がある。

【0212】

従って、抗GREM1アンタゴニストは、任意の他のがん治療法又はがんのための任意の他の治療剤、例えば化学療法剤と併用してもよい。他のがん治療法は、関連するがんのための任意の公知の治療法、例えば、結腸直腸がんのための任意の公知の治療法から選択することができる。他のがん治療法は、放射線療法であってよい。好適な放射線療法による治療は、例えば、Van Cutsem (and others) Annals of Oncology, 2014. Vol 25, Issue 3に記載されている。放射線療法は、がんの外科手術前に行ってもよく、がんの外科手術後に行ってもよい。放射線療法は、アジュバント放射線療法であってよい。放射線療法は、化学療法、例えば、後述する化学療法剤の投与と組み合わせて行ってもよい。

【0213】

がんのための他の治療剤、例えば化学療法剤は、関連するがんのための任意の公知の化学療法剤又は化学療法剤の組み合わせを含む、関連するがんのための任意の公知の治療剤から選択してよい。例えば、GREM1アンタゴニストは、特に結腸直腸がんの治療において、5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、及びフォリン酸のうちの1つ以上と併用することができる。結腸直腸がん及び多発性骨髄腫を治療するための他の抗がん剤とGREM1アンタゴニストとを組み合わせた併用療法の更なる例については、治療のための組成物及びキットに関連して以下に記載する。GREM1アンタゴニストと併用して投与しない場合、がんが、1つ以上の化学療法剤（例えば、上記の化学療法剤

10

20

30

40

50

のうちの1つ) に対して抵抗性になる可能性がある。G R E M 1 アンタゴニストは、セツキシマブ、ニボルマブ、又はペバシズマブと併用してよい。抗G R E M 1 特異性とニボルマブ又はペバシズマブ特異性とを組み合わせた二重特異性抗体を投与してもよい。

【0214】

上記の態様の一部として、本発明は、本発明に係るがんの治療及び／又は予防方法において使用するための抗G R E M 1 アンタゴニストであって、該方法が化学療法剤を別々、逐次、又は同時に投与することを含むアンタゴニストを提供する。本発明はまた、本発明に係るがんの治療及び／又は予防方法において使用するための抗G R E M 1 アンタゴニストであって、該方法が、別々、逐次、又は同時に放射線療法を行うことを含むアンタゴニストを提供する。本発明は更に、間質においてG R E M 1 が過剰発現しているがんを治療する方法において使用するための化学療法剤であって、該方法が、抗G R E M 1 アンタゴニストを別々、逐次、又は同時に投与することを含む化学療法剤を提供する。本発明はまた、上皮においてG R E M 1 が過剰発現しているがんを予防又は治療する方法において使用するための化学療法剤であって、該方法が、抗G R E M 1 アンタゴニストを別々、逐次、又は同時に投与することを含む化学療法剤を提供する。

【0215】

更に、抗G R E M 1 アンタゴニスト及び追加の抗がん剤を含む組成物又はキットが提供される。追加の抗がん剤は、標的治療剤であってもよく、化学療法剤であってもよい。追加の抗がん剤は、上記のいずれの抗がん剤であってもよい。このような1つを超える追加の抗がん剤を、組成物又はキットに組み込んでもよい。組成物又はキットは、特に結腸直腸がんの治療のための組成物又はキットの一部として、抗G R E M 1 アンタゴニストと、5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、及びフォリン酸、セツキシマブ、ニボルマブ、及びペバシズマブから選択される1つ以上の抗がん剤とを含み得る。多発性骨髄腫を治療するための組成物又はキットは、抗G R E M 1 アンタゴニストと、抗C D 3 8 抗体（例えば、ダラツムマブ）、抗S L A M F 7 抗体（例えば、エロツズマブ）、及び／又は抗I L - 6 抗体（例えば、シルツキシマブ）のうちの1つ以上とを含み得る。抗G R E M 1 特異性と他の上記の特異性のうちの1つとを組み合わせた二重特異性抗体が、組成物又はキットで提供されてもよい。好ましい組み合わせは、抗G R E M 1 アンタゴニスト及び抗I L - 6 抗体（好ましくは、シルツキシマブ）を含む。多発性骨髄腫を治療するための組成物又はキットは、抗G R E M 1 アンタゴニストと、ボルテズミブ及び／若しくはi M I D（レナリドミド／ポマレノミド）又はこれらのいずれかの類似体とを含み得る。上記組成物及びキットのいずれかにおける抗G R E M 1 アンタゴニストは、好ましくは、抗G R E M 1 抗体であってもよい。

【0216】

治療適応症

本発明のアンタゴニストは、がんの治療又は予防において使用される。

【0217】

がんの予防は、被験体のがんと診断されるのを防ぐこと又はがんの発症を遅らせることを含み得る。また、がんの予防は、以前がんと診断されたことのある被験体のがんの再発防止も含み得る。がんの予防は、更に、がんと診断されていない被験体又は以前がんと診断されたことのある被験体の生存期間を延長することも含み得る。

【0218】

がんの治療は、がんの1つ以上の症状を回復させる、がんの寛解を誘導若しくは延長する、又はがんの再発を遅らせることを含み得る。治療は、がんを治癒、緩和、又は部分的に停止することができる。その結果、疾患症状の重症度が低下し得る又は無症状期間の頻度若しくは期間が増加し得る。がんの治療はまた、がん（例えば、確立されたがん）が、患者の体内の起始部位から患者の体内の1つ以上の続発部位に広がるのを防ぐことも含み得る。従って、がんの治療は、既存のがんの播種又は転移の防止を含み得る。結腸直腸がんの治療の結果、例えば内視鏡検査によってアッセイしたときのポリープ負荷（ポリープ数）を減少させることができる。多発性骨髄腫の治療の結果、例えばM R I / C T スキャン

によってアッセイしたときの骨髄腫瘍負荷を減少させることができる、並びに／又は骨髄生検後に求めることができる形質細胞負荷を減少させることができる、並びに／又はモノクローナル抗体産生（パラプロテイン）及び無血清軽鎖（FLC）比等の1つ以上の血清マーカーを減少させることができる、並びに／又はX線検査によって検出することができる骨格の関連する溶骨性病変を減少させることができる。

【0219】

検出及び診断

間質GREM1とがんとの相関関係に基づいて、本発明は、がんの検出及び診断、並びにがんの予後判定及び治療に対するがんの応答性の予測のための追加の手段も提供する。

【0220】

従って、本発明は、患者におけるがんを検出する方法であって、該患者における間質でのGREM1の発現を測定することを含み、間質でのGREM1の過剰発現が、該患者ががんを有していることを示す方法を提供する。本発明はまた、患者におけるがんの予後を判定する方法であって、該がんにおいてGREM1が間質で過剰発現しているか否かを判定することを含み、該がんにおける間質でのGREM1の過剰発現が、GREM1が間質で正常に発現している状況よりも該患者の予後が悪いことを示す方法を提供する。がんは、本明細書に記載される任意のがんであってよい。がんは、好ましくは、結腸直腸がんであり、典型的には、線維形成性間質、多発性骨髄腫、又は乳がんを含む。

【0221】

診断は、個体がん若しくは腫瘍を有しているか否かを判定すること、及び／又はがん若しくは腫瘍の重症度を決定することを含む。

【0222】

予後判定は、個体がん又は腫瘍を発症するか否か、治療が必要か否か、個体が必要とする治療の種類、治療に応答するか否か、がんのエピソードを患う又は再発するか否か及び／又はその時期、症状又はがんのエピソード又は再発の重症度又は期間を予測することを含む。予後判定の方法は、がんが寛解した個体が再発するか否かを予測することができる。個体が再発するかどうかを予測することは、個体が再発する可能性を求めること及び／又は個体がいつ再発するかを予測することを含む。本発明は、更に、がんを有しているか、又はがんを有している若しくはがんを発症するリスクがあると疑われる患者が、化学療法剤による治療に応答する可能性があるか否かを判定する方法であって、該患者における間質でのGREM1の発現を測定し、それによって、該患者が該化学療法剤による治療に応答する可能性があるか否かを予測することを含む方法を提供する。

【0223】

本発明は、更に、がんを有しているか、又はがんを有している若しくはがんを発症するリスクがあると疑われる患者がGREM1アンタゴニストによる治療に応答する可能性が高いか否かを判定する方法であって、該患者におけるGREM1の間質発現を測定し、それによって、該患者がGREM1アンタゴニストによる治療に応答する可能性があるか否かを予測することを含む方法を提供する。上記の方法は、更に、GREM1アンタゴニストと化学療法剤との併用治療、又はGREM1アンタゴニストの投与と放射線治療とを含む併用治療に対する応答性を予測することができる。

【0224】

所与の治療法に対して個体の応答性が予測されるとは、個体はその治療法を受けることで利益又は十分な程度の利益を得ると予想されることを意味する。治療法に対して個体の非応答性が予測されるとは、個体はその治療法を受けることで利益又は十分な程度の利益を得るとは予想されないことを意味する。応答を予測する方法は、GREM1アンタゴニスト又は化学療法剤の投与前に実施してよい。個体に適した治療を選択又は推奨する際に、予測を考慮することができる。あるいは、該方法は、治療法による治療の後に実施されてもよく、該方法を用いて治療に対する個体の応答をモニタリングし、予測することができる。典型的には、方法は、個体が治療法による治療に対する一次応答を有するか否か、すなわち、個体が最初に治療を受けたときに応答するか否かを予測するためのものである。

。幾つかの場合、方法は、二次非応答性、すなわち、最初に治療に応答した個体が、後に治療に応答しなくなるか否か、又は治療に対してそれほど応答しなくなるか否かを予測するためのものである。

【0225】

本発明によれば、参照サンプル又は参照レベルと比較して個体における間質及び／又は上皮でのGREM1のレベルが上昇することは、がんの存在に関連する陽性の診断、例えば、個体がん若しくはがんの特定の形態を有する又はより重症度の高いがんを有することを示す。また、間質及び／又は上皮でのGREM1のレベルの上昇は、負の予後、すなわち、個体が特定の治療法に応答しない、がんが寛解した患者が再発する、又は個体がんを発症するリスクが高くなる等、個体の予測される転帰が悪いことを示す。

10

【0226】

逆に、GREM1のレベルの低下は又は正常レベルは、陰性の診断、例えば、個体がんを有していない又はより重症度の低いがんを有することを示す。GREM1のレベルの低下は、正の予後、すなわち、患者が特定の治療法に応答する、又はがんが寛解した個体が再発しない、又は疾患若しくは状態を発症するリスクが高くない等、患者の転帰が良好であることを示し得る。個体がんを有しているか否かの診断については、参照サンプル又はレベルは、典型的には、関連するがんを有していないか、又はがんを有すると疑われるが、その後がんを有していないことが確認された個体におけるGREM1のベースラインレベルを表す。

【0227】

診断又は予後判定の方法は、すなわち、診断又は予後判定に基づいて個体に適した治療を選択又は推奨することを含み得る。次いで、選択又は推奨された治療を、個体に施してよい。従って、上記の検出、診断、予後判定、及び応答性の予測の方法は、1つ以上の予防的又は治療的な抗がん剤を個体に投与する工程、又は放射線療法等のがん治療法を施す工程を更に含んでいてよい。1つ以上の剤は、典型的には、GREM1アンタゴニストを含み、任意のものは、上記の追加の抗がん剤を更に含んでいてもよい。

20

【0228】

幾つかの場合では、参照サンプル又は参照レベルと比較したGREM1の過剰発現は、個体がGREM1アンタゴニストによる治療法に応答することを示す。その場合、GREM1アンタゴニストの使用を含む治療法を選択又は推奨してよく、次いで、更に個体に施してよい。同様に、GREM1の過剰発現に基づいて、GREM1アンタゴニスト及び追加の抗がん剤の使用を含む治療法を選択してもよい。

30

【0229】

他の場合では、参照サンプル又は参照レベルと比較して、GREM1レベルの低下又は正常レベルは、個体がGREM1アンタゴニストによる治療法に応答しないことを示す。その場合、個体にGREM1アンタゴニストを投与しない。更に、個体を治療するためにGREM1アンタゴニスト以外の治療的処置を選択又は推奨してよく、更に個体に施してもよい。

【0230】

本発明の全ての態様では、がん（例えば、結腸直腸がん又は多発性骨髄腫又は乳がん）を有する個体、又は疾患若しくは状態を有する疑いのある個体、及び／又は疾患若しくは状態を発症するリスクのある個体が、治療のために選択され又は同定され得る。例えば、個体は、正式に診断されていなくてもよいが、1つ以上の症状の存在から疾患又は状態を有していると疑われる場合がある。がんに関連する1つ以上のリスク因子及び／又はがんに対する感受性を高める1つ以上の素因を有する場合、個体がんを発症するリスクがあるとみなしてよい。結腸直腸がんに関連するリスク因子としては、上記の、例えば、上で論じたTomlinson et al, PLoS Genet, 2011に記載のSNP、及びGREM1をコードしている遺伝子の突然変異（複数可）又はHMP5の原因となる突然変異を含むGREM1遺伝子の発現に影響を与える任意の他の突然変異等の遺伝性遺伝子突然変異が挙げられる。

40

50

【0231】

以下の実施例は、本発明を説明する。

【実施例】

【0232】

実施例1—タンパク質の発現、精製、リフォールディング、及び構造決定タンパク質の発現及び封入体の調製

大腸菌での発現に最適化された、切断型ヒトGremlin-1コード配列（配列番号20）を、BamHI/XhoIを用いて改変pET32aベクター（Merck Millipore）にクローニングし、N末端に6His-TEVタグを有するGremlin配列をコードしているベクター（pET-hGremlin1）を生成した。

10

【0233】

【化1】

発現した配列：

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEENVLESSQEALHVTE
RKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGGCNSF
YIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLQPPT
KKKRVTRVKQCRCISIDLD；配列番号2（6His-TEVタグの非Gremlin残基をイタリック体で示す）。配列の付番は、UniProt O60565
及び配列番号1に基づく。

20

【0234】

pET-hGremlin1プラスミドDNAを用いて、BL21（DE3）細胞を形質転換した。アンピシリン耐性シングルコロニーをLB/Amp寒天プレートからピックし、LB/Ampのスターター培養物100mLに接種するために使用した。37℃で16時間振盪（200rpm）した後、スターター培養物25mLを使用して、2×TY/Amp培地500mLに接種した。OD₆₀₀が3になるまで、培養物を37℃で振盪（250rpm）した。その後、培養物に、MOPS+グリセロールフィードミックス（1M MOPS pH7.4、40%グリセロール、0.5%MgSO₄、0.42%MgCl₂）20mLを補給し、300μM IPTGで誘導し、更に17℃で16時間、180rpmでインキュベートした。遠心分離（4,000g、4℃で20分間）で細胞を収集した。

30

【0235】

細胞ペレットを4℃の溶解バッファ（PBS pH7.4、0.35mg/mL リゾチーム、10μg/mL DNase、及び3mM MgCl₂）に再懸濁し、4℃で30分間、3,500gで遠心分離することにより不溶性画分を収集した。ペレット化した封入体を、洗浄バッファ（50mM Tris、500mM NaCl、0.5% Triton X-100、pH8.0）に再懸濁することによって3回洗浄し、続いて、21,000gで15分間遠心分離した。Triton X-100を含まない洗浄バッファを用いて、更に2回の洗浄を行った。

40

【0236】

可溶化

封入体を変性バッファ（8M尿素、100mM Tris、1mM EDTA、10mM Na₂S₄O₆、及び100mM Na₂SO₃、pH8.5）に再懸濁し、室温で16時間攪拌し、21,000gで15分間遠心分離することにより清澄化した。

【0237】

リフォールディング前精製

可溶化された封入体を、8M尿素、50mM MES、200mM NaCl、1mM EDTA、pH6.0で平衡化されたSephacryl S-200 26/60カラム（120mL）にロードした。Gremlin-1タンパク質を含有する画分を、6M尿

50

素、20mM MES、pH6.0で希釈し、HiTrap SP HP陽イオン交換カラムにロードし、10カラム容量(10CV)にわたって1M NaCl勾配で溶出した。精製され、変性したhGremlin-1タンパク質を含有する画分をプールした。

【0238】

リフォールディング

変性し、精製されたGremlin-1タンパク質を、0.1mg/mLの最終濃度になるようにリフォールディングバッファ(50mM Tris、pH8.5、150mM NaCl、5mM GSH、及び5mM GSSG、0.5mMシス테인、5mM EDTA、0.5Mアルギニン)に滴下し、5日間常に攪拌しながら4℃でインキュベートした。5日後、20mM HEPES、100mM NaCl、pH7.5に対してGremlin-1タンパク質を透析した。

10

【0239】

透析後、タンパク質をヘパリンHiTrapカラムに適用し、20CVにわたって0→100%ヘパリン溶出バッファ(20mM HEPES、1M NaCl、pH7.5)の勾配で溶出した。正しく折り畳まれたタンパク質は1M NaClで溶出されたが、任意の誤って折り畳まれたタンパク質はより低い塩濃度で溶出された。

【0240】

1M NaClで溶出されたタンパク質を濃縮し、20mM Hepes、pH7.5、1M NaClで平衡化したS75 26/60カラムで更に精製した。

【0241】

タンパク質をSDS PAGE(ゲルにおけるシフト)によって特性評価したところ、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)を用いて、予測された分子量及び正確な配置のジスルフィド結合を有すること、そして、細胞アッセイ(ID1レポーターアッセイ)において活性であることが立証された。

20

【0242】

Gremlin-1の構造決定

6.6mg/mL Gremlin-1溶液と、pH4の0.1Mクエン酸、1M塩化リチウム、及び27%ポリエチレングリコール(PEG)6000とを1:1の比で混合することによって、懸滴法を用いてGremlin-1のタンパク質の結晶を成長させた。データを収集する前に、結晶化バッファに20%グリセロールを添加することによって結晶を凍結保護した。ダイヤモンド光源で回折データを収集し、XDSを用いて処理した(Kabsch, Wolfgang (2010) Acta Crystallographica Section D 66, 125-132)。回折データの統計を下の表にまとめる。

30

【0243】

40

50

【表 2】

表 2：回折データの統計

回折の統計	
波長 (Å)	0.97949
空間群	C2
セル寸法	a=84.55 Å、b=107.22 Å、c=77.09 Å； $\alpha=90.00^\circ$ 、 $\beta=120.43^\circ$ 、 $\gamma=90.00^\circ$ 。
分解能範囲* (Å)	26.19–2.72 (2.79–2.72)
完全性 (%)	98.5 (99.0)
多重性	3.4 (3.4)
I/シグマ	9.6 (2.0)
Rmerge	0.095 (0.622)
精密化の統計	
分解能範囲 (Å)	26.19–2.72
R _{cryst}	0.24
R _{free}	0.29
R. m. s. d. 結合 (Å) **	0.013
R. m. s. d. 角度 (°)	1.782

* 括弧内の値は、最高解像度のシェルの対応。

** r. m. s. d 根平均二乗偏差

【0244】

Phaser (McCoy et al, J Appl Cryst (2007), 40, 658–674) 及び独自の Gremlin-1/Fab 複合体座標から利用可能な Gremlin-1 モデルを用いて、分子置換により Gremlin-1 の構造を解析した。得られた Gremlin-1 モデルは、2つの二量体として組織化された Gremlin-1 モノマーを4コピー含んでいた。Coot (Emsley et al Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66 (4), 486–501) を用いてモデル補正を行い、Refmac (Murshudov et al REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2011; 67 (Pt 4): 355–367) を用いて座標を精密化した。Molprobity (Chen et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66: 12–21) を用いて最終座標を確認した。モデル精密化の統計の概要を上表2に示す。Gremlin-1 の結晶構造解析についての完全な構造データは、参照により本明細書に援用される2017年12月19日に出願された国際出願第 PCT/EP2017/083650 号の表1 (図1) に提供されている。

【0245】

実施例2 – Gremlin-1 における BMP 結合残基

上述した通り、Gremlin-1は、DANファミリーとして知られているサブグループ内の骨形態形成タンパク質（BMP）アンタゴニストタンパク質ファミリーに属する。DANファミリー内で、Gremlin-1は、Gremlin-2（PRDC）と最大の相同性を共有している。

【0246】

実施例1で解析された2.7 ÅのヒトGremlin-1の構造は、公開されているマウスGremlin-2の構造（Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417-1429）と共通する多くの特徴を共有している。全体的な折り畳みが非常に類似しており、2コピーのGremlin-1が、アーチ状に配置された逆平行の非共有結合二量体を形成している。各モノマーは、フィンガーの反対側のリストの末端に向かってシスチンノットモチーフを有する特徴的なフィンガー-リスト-フィンガー配置を採用している。タンパク質間の配列同一性は52%であり、2つの構造における目に見える配列内では67%まで上昇する。最も高度に保存されている領域は、全ての主要な接触残基が100%保存されている広大な二量体界面に存在する。

【0247】

BMP2、4、及び7のマウスGremlin-2（PRDC）及びDAN（NBL1）への結合に関与する残基は、突然変異誘発を用いて同定されている（Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417-1429及びNolan et al (2014) J. Biol. Chem. 290, 4759-4771）。予測されたBMP結合エピトープは、二量体の凸面上にある両モノマーにまたがる疎水性パッチを包含している。突然変異誘発によって6つの残基：Trp72、Phe96、Tyr98、Phe104、Tyr105、及びPhe117が同定され、ヒトGremlin-1では100%保存されている（付番は、マウスGremlin-2配列に基づく）。相同性の程度は、両タンパク質において同一の立体構造を採用している側鎖の位置にまで及ぶ。

【0248】

GremlinのPDBファイルで使用されるアミノ酸の付番は、構造アラインメントに基づく、公開されているマウスGremlin-2における付番と一致する。これにより、構造を記述する際にアミノ酸の相似比較が可能になる。しかし、明確にするために、BMPの結合において役割を果たしていると同定された主要な残基を以下に示し、括弧内は配列番号1のPDBファイル及びUniProtファイルに基づく付番である。

Trp72 (93)、Phe96 (117)、Tyr98 (119)、Phe104 (125)、Tyr105 (126)、及びPhe117 (138)。

【0249】

マウスGremlin-2及びヒトGremlin-1の両方において、疎水性BMP結合エピトープは、各タンパク質のN末端残基によって形成されるアルファヘリックスに部分的に埋没している。BMP結合のモデルが提案されており、それによると、N末端が屈曲してBMP結合界面が完全に露出している（Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417-1429）。本解析では、ヒトGremlin-1及びマウスGremlin-2の構造からN末端残基を除去した後、表面をレンダリングして、各タンパク質におけるBMP結合面の類似性を明らかにした。

【0250】

文献には、BMPの結合に影響を及ぼす6つの残基の突然変異誘発についてしか記載されていない。実際のBMPエピトープは、隣接するアミノ酸を包含するより大きな表面積をカバーしている可能性がある。Gremlin-1の表面上において突然変異したもの6 Å以内にある全ての残基を浮き彫りにすることにより、治療薬の標的になる可能性のあるGremlin-1のより大きな領域が明らかになる。このより広範な領域は、ヒトGremlin-1の以下のアミノ酸を包含する：

Asp92-Leu99

Arg116-His130

Ser137-Ser142

C y s 1 7 6 - C y s 1 7 8
(配列番号 1 に基づいて付番)

【 0 2 5 1 】

公開されている情報をヒト G r e m l i n - 1 の結晶構造情報と組み合わせることにより、BMP との相互作用をブロックする治療的介入の有望な経路となるヒト G r e m l i n - 1 の領域が同定された。

【 0 2 5 2 】

実施例 3 - H e k I d 1 レポーター遺伝子アッセイ

背景

H e k I d 1 レポーター遺伝子アッセイは、C l o n e 1 2 H e k 2 9 3 - I d 1 レポーター細胞を使用する。この細胞株に I d 1 転写因子を安定的にトランスフェクトした。I d 1 は、BMP シグナル伝達経路の転写因子である。G r e m l i n は、BMP に結合し、その受容体への結合を妨げて、レポーター遺伝子からのルシフェラーゼシグナルを減少させることが知られている。従って、このレポーターアッセイを用いて、抗 G r e m l i n 抗体をスクリーニングし、G r e m l i n と BMP との相互作用をブロックするものが存在するかどうかを理解することが可能である。この相互作用がブロックされた場合、これら細胞においてルシフェラーゼシグナルの回復がみられる。

【 0 2 5 3 】

方法

1 0 % F C S 、 1 × L - グルタミン、及び 1 × N E A A を含有する D M E M 中で、C l o n e 1 2 細胞を培養した。また、細胞が I d 1 遺伝子発現を失わないようにするため、細胞をハイグロマイシン B (2 0 0 μ g / m L) の存在下で増殖させる。0 . 5 % F C S 、 1 × L - グルタミン、及び 1 × N E A A を含有する D M E M 中で細胞をアッセイした。細胞のアッセイ時間が短い場合は、ハイグロマイシン B は必要ない。

【 0 2 5 4 】

細胞を P B S で洗浄し、細胞解離バッファを用いて剥離し、スピンし、カウントした後、7 0 μ L 中 5 × 1 0 4 / ウェル (7 . 1 4 × 1 0 5 / m L の密度) で播種した。使用したプレートは、白色で不透明なポリ-D-リジンコーティング 9 6 ウェル滅菌プレートであった。細胞を約 3 ~ 4 時間インキュベーターに入れて沈殿させる。BMP ヘテロダイマーを、2 0 0 μ g / m L になるように 4 m M H C L で再構成した。ガラスバイアルを用いて、BMP をアッセイ培地で 1 0 μ g / m L に希釈して、新たな作業原液を得た。

【 0 2 5 5 】

ポリプロピレンプレートにおいて、最高最終用量 1 μ g / m L の 8 点用量応答曲線のために、G r e m l i n - 1 を 1 : 2 希釈した。

【 0 2 5 6 】

1 ウェルあたり 2 0 μ L の追加の体積の培地を添加し、プレートを 3 7 ° C で 4 5 分間インキュベートした。

【 0 2 5 7 】

細胞のみを含有するウェルを除く全てのウェルに、1 0 0 × で調製した BMP を添加した。全てのウェルをアッセイ培地で 6 0 μ L にし、3 7 ° C で更に 4 5 分間インキュベートする。

【 0 2 5 8 】

インキュベーション後、アッセイプレートのウェルあたり 3 0 μ L のサンプルを移し、2 0 ~ 2 4 時間インキュベートした後、発光シグナルを測定した。

【 0 2 5 9 】

C e l l S t e a d y G l o を予め室温で解凍しておいた。アッセイプレートを約 1 0 ~ 1 5 分間かけて室温に冷却した後、試薬を添加した。シェーカー上にて室温で 2 0 分間かけて c e l l s t e a d y g l o 試薬 (1 0 0 μ L) を添加し、S y n e r g y 2 における c e l l t i t r e g l o プロトコルを用いて発光を測定することにより、ルシフェラーゼシグナルを検出した。

10

20

30

40

50

【0260】

BMPを含有するウェルから最大シグナルが生じ、細胞のみを含有するウェルから最小シグナルが生じた。

【0261】

結果

Gremlin-1の完全長型及び切断型をHek-Id1レポーター遺伝子アッセイで試験して、BMP4/7に対するブロッキング活性を確認した。

【0262】

アッセイにおける最大シグナル及び最小シグナルに基づいて、用量応答アッセイから阻害率を計算し、4パラメータロジスティックフィットを用いてデータを適合させた。曲線の変曲点に基づいてIC₅₀を算出した。

【0263】

【表3】

表3: Hek-Id1レポーター遺伝子アッセイにおける完全長Gremlin-1及び切断型Gremlin-1の効力の結果。

Hek-Id1レポーター遺伝子アッセイ	N	幾何平均(nM)	95%CI (又はN<4の場合は範囲)
Gremlin1完全長	2	1.6	1.3-1.9
Gremlin1切断型	2	1.7	1.1-2.5

【0264】

結論

Gremlin-1は、Hek-Id1レポーター遺伝子アッセイにおいて、BMP4/7シグナル伝達を阻害することができた。

【0265】

実施例4-抗Gremlin-1抗体の生成

実施例1に記載の通り精製したgremlin-1を用いた免疫、及びライブラリパンニングにより、抗Gremlin-1抗体を作製した。献血から増幅されたV領域を有するナイーブヒトライブラリとして、ライブラリをインハウスで作製した。

【0266】

免疫によって、免疫の第1のラウンドからGremlin-1に結合する26個の異なる抗体が得られた。これら抗体を、スクリーニングアッセイで試験するためにスケールアップし、精製した。

【0267】

ライブラリから得られたヒト及びマウス交差反応性抗体25個を、R&D Systems製の組換えヒトGremlinを用いてパンニングした。スケールアップのために10個の抗体を選択し、スクリーニングアッセイにおいて試験するためにscFvとして精製した。

【0268】

実施例5-抗Gremlin-1抗体のスクリーニング

実施例3に記載のHec-Id1レポーター遺伝子アッセイを用い、SMADのリン酸化を測定することにより、抗体をスクリーニングした。SMAD1、5、及び8は、BMPシグナル伝達の際にリン酸化される。従って、Gremlin-1の阻害剤は、SMADのリン酸化を増加させる。

【0269】

A549細胞又はヒト肺線維芽細胞で、SMADリン酸化アッセイを実施した。リン酸化レベルは、MSDを用いて測定した。

【0270】

結果

H e k - I d 1 レポーター遺伝子アッセイでは、免疫由来の抗体（B M P 4 / 7 ヘテロダイマーに対して 1 0 倍過剰の抗体を試験した）に見かけ上のヒットは存在しなかった。結果を図 1 に示す。

【 0 2 7 1 】

対照的に、多数のライブラリ由来の抗体が、H e k - I d 1 レポーター遺伝子アッセイにおいてシグナルを回復させることができた（5 0 % G r e m l i n 用量で 5 0 倍過剰の抗体）（図 2）。これらのうち、A b 2 4 1 6 及び A b 2 4 1 7 は高レベルのエンドトキシンを含有していた。A b 7 3 2 6 は、1 0 倍過剰及び 8 0 % 阻害 G r e m l i n - 1 濃度でブロック能力を維持していた。

【 0 2 7 2 】

追加の結果を図 3 A（ヒト g r e m l i n）及び 3 B（マウス G r e m l i n）に示す。これら図は、1 5 n M 以下の A b 7 3 2 6（P B 3 7 6 と表示）の滴定を示す。A b 7 3 2 6 は、ヒト（I C₅₀ 1 . 3 n M）又はマウス（I C₅₀ 0 . 2 n M G r e m l i n）のいずれかによってブロックされた場合、B M P のシグナル伝達を回復することが示された。抗体は、ヒト及びマウス I g G 1 の両方として機能する。

【 0 2 7 3 】

マウス及びヒトの完全長 I g G 1 の配列を以下に示す。マウス及びヒトの完全長 I g G 1 タンパク質を合成するために、ライブラリ由来の A b 7 3 2 6 可変領域を、適切な抗体定常ドメインを含むベクターに再クローニングした。

【 0 2 7 4 】

A b 7 3 2 6 はナイーブヒトライブラリ由来であるので、A b が s c F v としてクローニングされた場合、7 3 2 6 の可変領域を完全長 A b 又は F a b として再クローニングするためには、プライマー／縮重プライマーのプールを使用して V H 及び V K を P C R 増幅する必要があった。次いで、増幅された P C R 産物を消化し、マウス及びヒトのベクターに同時にクローニングした。V H 及び V K は、プライマー／縮重プライマーのプールによって増幅されたので、P C R プロセス中にアニーリングする微妙に異なるプライマーに由来する、1 つのアミノ酸残基が異なる 2 つの変異体形態の生成物が得られた。

【 0 2 7 5 】

重鎖可変領域の 2 つの変異体形態は、以下に示すように、6 位における 1 個のアミノ酸が異なり、軽鎖可変領域の 2 つの変異体形態は、7 位における 1 個のアミノ酸が異なっていた。

- ・重鎖可変領域変異体 1 は、6 位にグルタミン酸（E）を有する。
- ・重鎖可変領域変異体 2 は、6 位にグルタミン（Q）を有する。
- ・軽鎖可変領域変異体 1 は、7 位にセリン（S）を有する。
- ・軽鎖可変領域変異体 2 は、7 位にスレオニン（T）を有する。

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

【化2】

マウス完全長 I g G 1 ー重鎖変異体 1 (配列番号 1 4)

QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY **AEKFQ**GRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCATDA
RGSGSYYPNH **FDYWGQ**GLTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG
CLVKGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP
SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD
VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK TGRPKAPQVY
TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTK SLSHSPGK

10

【0277】

【化3】

マウス完全長 I g G 1 ー軽鎖変異体 1 (配列番号 1 5)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCK**SSQSVL** **YSSNNKN**YLA WYQQKPGQPP
KLLIYW**ASTR** **ESGVP**DRFSG SSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQTRLE IKRTDAAPT V SIFPPSSEQL TSGGASVVCF LNNFYPKDIN
VKWKIDGSR QNGVLNSWTD QDSKDYISM SSTLTITKDE YERHNSYTCE
ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

20

【0278】

【化4】

マウス完全長 I g G 1 ー重鎖変異体 2 (配列番号 2 8)

QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY **AEKFQ**GRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCATDA
RGSGSYYPNH **FDYWGQ**GLTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG
CLVKGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP
SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD
VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK TGRPKAPQVY
TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTK SLSHSPGK

30

40

【0279】

50

【化5】

マウス完全長 I g G 1 - 軽鎖変異体 2 (配列番号 29)

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFCQQYYDT
PTFGQGTRLE IKRTDAAPT V SIFPPSSEQL TSGGASV VCF LNNFY PKDIN
VKWKIDG SER QNGVLNSWTD QDSK DSTYSM SSTLT LTKDE YERHNSYTCE
ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

10

【0280】

【化6】

ヒト完全長 I g G 1 - 重鎖変異体 1 (配列番号 30)

QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTF T DYMHVWQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY AEKFQGRVTI TADTSTD TAY MELSSLRSED TAVYYCATDA
RSGSGSYYPNH FDYWGQGT LV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPGK

20

【0281】

【化7】

ヒト完全長 I g G 1 - 軽鎖変異体 1 (配列番号 31)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFCQQYYDT
PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFY PREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSK DSTYSL SSTLT LSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

40

【0282】

50

【化 8】

ヒト完全長 I g G 1－重鎖変異体 2（配列番号 1 6）

QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY **AEKFQ**GRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCATDA
RGSGSYYPNH **FDYWGQ**GLTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMEALH NHYTQKSLSL
SPGK

10

【 0 2 8 3】

【化 9】

ヒト完全長 I g G 1－軽鎖変異体 2（配列番号 1 7）

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCK**KSSQSVL** **YSSNNKN**YLA WYQQKPGQPP
KLLIYW**ASTR** **ESGVPDR**FSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFY**PREAK**
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

20

30

【 0 2 8 4】

抗体の C D R は、K a b a t 法を用いて決定した（上記配列中太字でハイライト）。C h o t h i a の定義を用いた追加の H C D R 1 残基はイタリック体である。定常領域の配列には下線を引いている。

【 0 2 8 5】

抗 G r e m l i n 1 抗体を用いた p－S M A D シグナル伝達の回復を、以下の表 4 に示す。

【 0 2 8 6】

40

50

【表 4】

表 4 : p-SMADシグナル伝達の回復

	2417	2418	2419	2481	2482	2483	2484	7326	8427
BMP 2 50ng/ml	109.1% +/- 2.8%	58.2% +/- 1.9%	32.6% +/- 1.4%	40.4% +/- 0.6%	35.3% +/- 0.8%	43.1% +/- 2.1%	104.0% +/- 2.7%	107.2% +/- 3.5%	51.3% +/- 1.4%
BMP 4 25ng/ml	109.6% +/- 3.0%	71.3% +/- 3.1%	31.7% +/- 1.2%	60.1% +/- 2.2%	54.4% +/- 1.3%	72.5% +/- 2.1%	105.2% +/- 3.3%	110.0% +/- 3.8%	78.2% +/- 2.5%
BMP 7 200 ng/ml	111.5% +/- 3.8%	99.5% +/- 3.2%	53.8% +/- 3.4%	64.4% +/- 1.3%	52.3% +/- 1.1%	66.2% +/- 1.2%	105.2% +/- 4.3%	108.0% +/- 3.2%	72.6% +/- 2.5%
BMP- 2/7 50ng/ml	119.3% +/- 2.6%	78.6% +/- 3.6%	50.8% +/- 2.7%	53.7% +/- 3.1%	47.6% +/- 1.5%	56.1% +/- 2.5%	120.4% +/- 4.4%	128.5% +/- 2.9%	62.8% +/- 2.5%
BMP4/7 50ng/ml	113.7% +/- 3.1%	78.0% +/- 4.0%	61.4% +/- 4.0%	48.3% +/- 2.1%	41.7% +/- 1.7%	50.8% +/- 1.7%	112.4% +/- 2.5%	127.0% +/- 3.1%	63.3% +/- 2.1%

10

20

【0287】

結果は、BMP単独（対照BMP）によるSMADリン酸化の百分率として示す。特発性肺線維症患者由来の肺線維芽細胞を用いて実験を行った。rhGremlin-1及び抗Gremlin-1抗体を室温で45分間ブレインキュベートした。次いで、rhGremlin-1及び抗Gremlin-1抗体を30分間かけてBMPと共に細胞に添加した。

【0288】

次いで、表5は、抗Gremlin-1抗体によるGremlin-1-BMP複合体からのBMP-2又はBMP4/7の解離について調べたSMADリン酸化アッセイの更なる結果を示す。再度特発性肺線維症患者由来の肺線維芽細胞を用いて実験を行った。rhBMP-2又はrhBMP4/7を、rhGremlin-1と共に室温で1時間ブレインキュベートした。BMP-2-又はBMP4/7-Gremlin-1複合体を、様々な濃度の抗Gremlin-1抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。抗体濃度は、プレート上の最終濃度を表す。

【0289】

30

40

50

【表 5】

表 5：抗 G r e m l i n - 1 抗体による G r e m l i n - 1 - BMP 複合体からの BMP - 2 又は BMP 4 / 7 の解離

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

【 0 2 9 0 】

表 5 に示す結果は、A b 7 3 2 6 が、既に複合化された BMP - 2 又は BMP 4 / 7 を G r e m l i n - 1 - BMP 複合体から解離させることができることを立証する。A b 7 3 2 6 は、比較抗体 2 4 8 4 よりもはるかに低濃度でこの解離を達成することができる。このことは、A b 7 3 2 6 がアロステリック阻害剤であることの証拠を提供し、A b 7 3 2 6 の結合部位が g r e m l i n - 1 における既知の BMP 結合領域から遠位であるという本発明者らの知見と一致している。このように、A b 7 3 2 6 は、BMP が g r e m l i n - 1 と複合体化している場合でさえもアロステリック結合部位にアクセスすることができ、その結果、g r e m l i n 活性の阻害が顕著に改善される。

【 0 2 9 1 】

実施例 6 - 7 3 2 6 F a b との複合体における G r e m l i n - 1 の結晶構造の取得

A b 7 3 2 6 F a b との複合体におけるヒト G r e m l i n - 1 の結晶構造を、2 . 1 Å の分解能で解析した。F a b 配列を以下に示す：

重鎖：配列番号 1 8

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDG
ETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGG
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

軽鎖：配列番号 1 9

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGGQTRLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 2 9 2 】

次いで、CCP 4 ソフトウェア N C O N T を用いて、G r e m l i n - 1 と F a b との間の 4 Å における全ての接触を同定した。以下の残基が同定された：I l e 1 3 1、L y s 1 4 7、L y s 1 4 8、P h e 1 4 9、T h r 1 5 0、T h r 1 5 1、A r g 1 6 9、L y s 1 7 4、及び G l n 1 7 5（配列番号 1 の U n i P r o t 配列に基づいて付番（マウス G r e m l i n - 2 の付番と一致する構造ファイルでは I l e 1 1 0、L y s 1 2 6

、Lys127、Phe128、Thr129、Thr130、Arg148、Lys153、及びGln154として付番）。

【0293】

図4は、Gremlin-Fab複合体の構造モデルを示し、BMP結合領域に対するFabエピトープ残基を示す。

【0294】

Ab7326は、アロステリックに作用する阻害性抗体である、すなわち、BMP結合領域から離れて結合する。

【0295】

実施例7－抗Gremlin-1抗体Ab7326のGremlin-1への結合についての親和性測定。

10

方法

Biacore T200システム、GE Healthcare Bio-Sciences ABにおいて表面プラズモン共鳴（SPR）技術を用いる生体分子相互作用分析によって、ヒトGremlin1に対する抗Gremlin mIgGの親和性を求めた。固定化した抗マウスFc表面で抗Gremlin mIgGを捕捉し、捕捉されたmIgGに対してGremlin-1を滴定した。600秒間の活性化及び不活性化注入を用いてアミンカップリング化学を介して、CM4センサーチップのフローセル2上に10mM NaAc、pH5.0中50μg/mLで～1600応答単位（RU）のレベルになるように捕捉リガンド（ヤギ抗マウスIgGのaffinipure F(ab')₂断片、Fc断片特異的、115-006-071、Jackson ImmunoResearch Inc.）を固定化した。HBS-EP+バッファ（0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% Surfactant P20）を10μL/分の流速でランニングバッファとして使用した。捕捉リガンドを省略したことを除いてフローセル2と同様に表面を活性化及び不活性化することにより、フローセル1上で参照表面を調製した。

20

【0296】

アッセイバッファは、HBS-EP+300mMの最終NaCl濃度を与えるための追加の150mM NaCl+1% CMD40であった。固定化された抗マウスIgG、Fc表面上において約100RUの捕捉レベルを与えるために、抗Gremlin mIgG（ランニングバッファ中5μg/mL）を60秒間注入してフローセル1及び2に通した。組換えヒトGremlin1を5nMからランニングバッファで滴定し（2倍希釈を使用）、30μL/分の流速で3分間フローセル1及び2に注入し、続いて、5分間の解離相に供した。バッファのみの対照も含まれていた。50mM HClを60秒間注入し、5mM NaOHを30秒間注入し、50mM HClを30秒間注入することにより、10μL/分の流速で表面を再生した。

30

【0297】

Biacore T200評価ソフトウェアを用いてキネティックデータを求めた。親和性測定は25℃で行った。

【0298】

40

結果

5回の測定の平均K_D値として得られた結合親和性は、100pM未満であることが見出された。

【0299】

実施例8－抗Grem1抗体はマウスオルガノイド培養を阻害した

材料及び方法

マウス手技。全ての手技は、英国内務省の規則及びAnimals（Scientific Procedures）Act 1986に基づいて行った。全てのマウスは、Functional Genomics Facility, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford University

50

tyの動物ユニットで飼育した。本研究で使用した系統は全て、C57BL/6Jバックグラウンドで6世代以上維持していた。Apc^{Min} (1) 及びVil1-Grem1 (2)、Apc^{fl/fl} (3) 及びVillinCreERT2 (4) マウスのジェノタイピングプロトコルは既に報告されている。カプランマイヤーデータを作成するために、人道的エンドポイント(貧血、猫背、不活動を示す)に達した時点でマウスを殺処分した。抗Grem1抗体(UCB Ab7326マウスIgG1、その後の全てのマウス実験でも使用)又はマウスIgG1対照Ab101.4抗体(UCB)を、10mg/kg又は30mg/kgの用量で毎週又は隔週(bi-weekly)皮下注射した。長期処理コホートについては、Vil1-Grem1及びApc^{Min}マウスには30mg/kgの用量を6週齢から毎週投与し、Vil1-Grem1/Apc^{Min}コホートでは3週齢で処理を始めて、6週間にわたって週2回、その後週1回投与した。

10

【0300】

組織の調製及び組織学。所定の時点で又は腸管ポリープの症状(貧血、猫背)を示したとき、頸椎脱臼によりマウスを殺処分した。腸管を直ちに摘出し、小腸(近位/SB1、中位/SB2、遠位/SB3)及び大腸に分けた。腸調製装置(5)を使用して縦方向に腸を切開し、PBSで洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)で一晩固定した。ポリープを可視化するために、腸の調製物を0.2%メチレンブルーで10秒間染色し、ライトボックスを用いて観察した。10%ホルマリン固定組織の標本をパラフィンに包埋した後、4µmの切片を作製した。固定された標本を、標準的なプロトコルに従って包埋し、H&E染色した。

20

【0301】

免疫組織学的検査。ホルマリン固定したパラフィン包埋組織切片(4µm)をキシレンで脱脂し、段階的にアルコール→水で再水和した。20分間1.6%H₂O₂を用いて内因性ペルオキシダーゼをブロックした。抗原回復のために、5分間10mmol/Lクエン酸バッファ(pH6.0)で切片を圧力調理した。30分間10%血清で切片をブロックした。スライドを一次抗体と共に2時間インキュベートした。本研究では以下の抗体を使用した;Cytokeratin 20(Abcam、ab118574、1:200)、EphB2(Rand D、AF467、1:125)、Ki67(CST、122025、1:500)、リゾチーム(DAKO、EC 3.2.1.17、1:500)、及びSox9(Millipore、ab5535、1:1000)。適切な二次抗体を室温で1時間適用した。次いで切片をABC(Vector labs)中で30分間インキュベートした。DAB溶液を2~5分間適用し、発色反応を顕微鏡でモニタリングした。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、クリアし、次いで、標本にした。

30

【0302】

インサイチュハイブリダイゼーション(ISH)。DEPC(Sigma)で処理したH₂Oを用いて4µm切片を調製した。製造業者の指示に従って、Grem1(314741)(Advanced Cell Diagnostics)プローブ及びRNAscope 2.5 HD Detection Kit(Advanced Cell Diagnostics)を用いて、インサイチュハイブリダイゼーションを実施した。

【0303】

40

マウス腸陰窩の培養。Sato et al (6)に記載の通り、マウス腸陰窩を単離し、培養した。簡潔に述べると、陰窩を単離し、Matrigel(BD Biosciences)に再懸濁し、24ウェルプレートにプレートアウトした。基本培養培地(ペニシリン/ストレプトマイシン、10mmol/L HEPES、Glutamax、1×N2、1×B27(全てInvitrogen製)、及び1mmol/L N-アセチルシステイン(Sigma)を補給した高度ダルベッコ変法イーグル培地/F12)に、以下の成長因子を含む培地を重ねた:50ng/mL 上皮成長因子(Life Technologies)、100ng/mL Gremlin1(Rand D)、500ng/mL R-spondin1(Rand D)[EGR培地]。抗Grem1抗体(UCB)を1mg/mLの濃度で使用した。培地を2日間毎に交換した。

50

【0304】

ウエスタンブロッティング。攪拌しながら4℃で2時間30mM EDTAと共に長さ2cmの組織片をインキュベートすることによって、結腸上皮細胞の単離を実施した。プロテアーゼ阻害剤 (Complete Mini、Roche) 及びホスファターゼ阻害剤 (PhosSTOP、Roche) を添加したRIPA溶解バッファで、ペレット化した上皮細胞を溶解させた。BCAアッセイ (Thermo Scientific) を用いて全ての溶解物を定量し、35mgを適量の4×ローディング色素 (Invitrogen) で希釈し、95℃で5分間変性させた。製造業者のプロトコルに従ってNuPAGEゲルシステム (Invitrogen) を用いてウエスタンブロッティングを行った。簡潔に述べると、変性した溶解物を4～12%のゲルにロードし、100Vで少なくとも2時間泳動した。半乾式タンクにおいてPVDFメンブレン (Immobilion P, Millipore) 上にゲルを転写し (120mAで少なくとも2時間)、10%ミルク (Marvelle) を含有するTBS中室温で1時間インキュベートすることによりブロックした。次いで、5%ミルク、pSmad1/5/8 (Cell Signalling, 9516S, 1:500)、アクチン (Stanta Cruz, sc-4778, 1:2500) を含むTBS中適切な一次抗体中において、メンブレンを一晩インキュベートした。洗浄後、メンブレンをHRPコンジュゲート二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。更に洗浄した後、プロットをECL試薬 (GE healthcare) 中でインキュベートし、化学発光フィルム (GE healthcare) によって化学発光を検出した。

10

20

【0305】

結果の説明 (図5も参照)

抗GREM1抗体の効果を評価するために、マウスオルガノイド培養を用いた。腸管上皮オルガノイド培養の成功は、外因性BMPアンタゴニストの培地補給に依存する。組換えNoggin及びGrem1は、この目的のために互換的に使用することができ、これらタンパク質のうちの1つが欠けると、培養4日目以降腸陰窩培養が進行しない。

【0306】

組換え上皮成長因子 (E)、Grem1 (G)、及びR-Spondin1 (R) を全て補給した培地 (EGR培地) では、陰窩の約60%がオルガノイドを形成した。組換えGrem1が欠失している培地 (ER培地) では、培養成功率は7日間で2%未満に低下した。

30

【0307】

それ以外の点では全て補給された培地に1mg/mLの抗Grem1抗体を添加すると (EGR+抗体)、腸オルガノイド培養の成功が妨げられたが、これは全て補給された培地におけるGrem1のBMP拮抗作用の消失と一致している。これら結果は、Grem1を除外した培地 (ER) と識別不能であった。

【0308】

実施例9-抗Grem1抗体処理は、処理されたVil1-Grem1動物における腸内pSMAD1, 5シグナル伝達を部分的に回復させる (図6も参照)。

上皮BMP活性は、SMAD1, 5, 8細胞内シグナル伝達トランスドューサのリン酸化によって測定することができる。

40

【0309】

Vil1-Grem1動物では、上皮における異常なGrem1の発現が、結腸陰窩基底部の外側に位置する細胞における異常な幹/前駆細胞の表現型の促進を介してポリポシスを開始させる。Vil1-Grem1マウスは、絨毛の異所性陰窩形成、異常な細胞増殖、及び絨毛形成不全の開始を特徴とする重度の汎腸ポリポシスを約8週齢から発症する。

【0310】

Vil1-Grem1マウスにおける上皮での異常なGrem1発現は、生理学的腸BMP経路活性を抑制し、ウエスタンブロットによって検出されたpSMAD1, 5タンパ

50

ク質レベルが低下した。

【0311】

抗Grem1抗体を30mg/kgの用量で毎週皮下投与したところ、Vil1-Grem1腸上皮における腸上皮pSMAD1、5シグナル伝達を回復させることができたが、より低用量の10mg/kgでは回復しなかった。Grem1の機能的拮抗を示す。

【0312】

実施例10－抗Grem1抗体処理は、Vil1-Grem1汎腸ポリポーシスの表現型を消失させ、正常な細胞運命決定を回復させる（図7及び図30を参照）。

また、抗Grem1抗体（30mg/kg）を6週間にわたって週2回Vil1-Grem1マウスに皮下投与した結果、この動物モデルを特徴付ける異常な腸陰窩絨毛構造が治療的にほぼ正常化すると共に、この汎腸ポリポーシスの表現型が用量依存的に且つ非常に顕著に消失した。

【0313】

処理した動物の免疫組織化学的染色は、未処理の組織を特徴付ける絨毛の異所性陰窩形成及び細胞運命決定の乱れの回復を示した（図7及び図30）。

【0314】

実施例11－Grem1起始ポリポーシスを有する動物モデルにおける抗Grem1抗体による長期処理は、安全であり、動物の寿命を著しく延長する（図8及び図31を参照）。

3週齢（Vil1-Grem1; Ap^{cMin}）又は6週齢（Vil1-Grem1）で開始して、30mg/kgの用量の抗Grem1抗体で週2回（Vil1-Grem1; Ap^{cMin}）又は週1回（Vil1-Grem1）動物を皮下処理した。

【0315】

Grem1起始腫瘍形成モデルにおいて抗Grem1抗体を長期投与すると、ポリープ形成が遅くなり、腫瘍負荷が減少し、Vil1-Grem1動物の動物寿命が著しく延長された。この腫瘍消失効果は、侵襲性Vil1-Grem1; Ap^{cMin}系統であっても、上皮における異常なGrem1発現を起始とする病変全体で一貫しており、抗体処理により、動物の寿命が2倍超になる（VG-minの平均寿命46日間に対し、VG-min処理の平均寿命108日間、 $p = 2.21 \times 10^{-6}$ ）。

【0316】

400日間を超える処理を受けた動物において、一貫した有害事象はこれまで観察されていない。

【0317】

実施例12－Grem1の薬理的ダウンレギュレーションは、Ap^{cMin}マウスにおける変異型Ap^c駆動腫瘍形成を減弱させる（図9及び図32を参照）。

また、上皮におけるAp^cの不活性化によって引き起こされる散発性がんのマウスモデルにおいても、GREM1拮抗作用について調べた。上皮－間葉シグナル伝達クロストークは、間質細胞が急性の上皮におけるAp^cの不活化に応答することを意味し、Vil1-CreERT2; Ap^cfl/flマウスにおける上皮細胞でのAp^cの不活化のわずか5日後に腸筋層及び固有層のGrem1の急速なアップレギュレーションが発生する（図9A）。

【0318】

6週齢から開始した抗Grem1抗体による長期処理は、Ap^{cMin}マウスのポリープ発生に対して一貫した効果を有し、腫瘍負荷の軽減を通して動物の生存期間を延長させた。この研究は、Grem1の間質におけるアップレギュレーションが変異型Ap^c駆動腫瘍形成を増悪させる可能性があること、及び抗Grem1療法が、非Grem1起始腫瘍形成の治療に有用である可能性があることを示す。

【0319】

実施例13－Grem1は骨髄腫の骨髄微小環境で過剰発現し、骨髄腫の成長を減少させるための標的となり得る。

この研究は、Grem1が多発性骨髄腫（MM）の疾患進行において役割を果たしてい

10

20

30

40

50

ることを初めて立証する。患者の骨髄（BM）のトレフィン生検に由来する間質細胞を分析したところ、MMの間にBM微小環境からのGrem1発現が有意に増加することが立証された。更に、ここに提示するデータは、Grem1のレベルの増加がMM PCの増殖を促進すること、及びGrem1を標的として、MMの前臨床マウスモデルにおいてMM腫瘍負荷を有意に低減できることを示す。これは、Grem1がMMの疾患進行において役割を果たしており、したがって、MMの治療についての治療標的となることの初めての証拠を表す。

【0320】

方法

骨髄腫細胞株の培養：別段の記載がない限り、全ての組織培養培地は、10%（v/v）FCS及び添加剤（2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、15mM HEPES、50U/mLペニシリン、及び50µg/mLストレプトマイシン；全てSigma-Aldrich, Sydney, Australia製）を含有していた。マウス5TGM1 MM細胞は、20%（v/v）FCS及び添加剤を補給したイスコフ変法イーグル培地中で維持した。本発明者らは以前、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、及びホタルルシフェラーゼ（Noll et al., 2014）をコードしている3併用（trimodality）レトロウイルスNES-TGLコンストラクト（Diamond et al., 2009; Ponomarev et al (2004)）を用いて5TGM1細胞（Dallas et al., 1999）を改変し、一貫した骨指向性を示す新たなクローン亜系統を樹立した（Noll et al., 2014; (Noll et al., 2015)）。OP9骨髄間質細胞は、10%（v/v）FCS及び添加剤を含むダルベッコ変法イーグル培地中で維持した。5TGM1細胞及びOP9細胞の共培養物は、20%（v/v）FCS及び添加剤を補給したイスコフ変法イーグル培地中で維持した。ヒトMM細胞株RPMI-8226、U266、KMS-11、及びH929は、全てRPMI-1640培地中で培養した（Cheong et al., 2015）。全ての細胞株は、5%二酸化炭素を含む37℃の加湿環境で維持した。

【0321】

マウスBM間質からのRNAの単離：C57BL6/KaLwRij.Hsdマウスに 5×10^5 個の5TGM1.Bmx1 MM PCを注射し、4週間にわたって腫瘍成長を確立した（既述の通り）（Noll et al., 2014; Hewett et al., 2017）。簡潔に述べると、5TGM1細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に 5×10^6 細胞/mLで再懸濁した後、6～8週齢のC57BL/KaLwRijマウスの尾静脈に 5×10^5 個の細胞を注射した。150mg/kg D-ルシフェリン（Biosynth, Raad, Switzerland）を腹腔内注射（i.p.）した後、Xenogen IVIS 100 Imaging System（Caliper Life Sciences, Hopkinton, USA）を用いた動物全身生物発光イメージング（BLI）によって腫瘍の成長をモニタリングした。Living Imageソフトウェアを用いて腫瘍負荷を定量した。腫瘍負荷を有するマウス及び同年齢の非腫瘍対照を、SAHMRI ethics SAM165に従って人道的に間引いた。各マウスの大腿骨及び脛骨を分離し、PBS、2%FCS、及び2mM EDTA（PFE）で骨髄を洗い流した。骨を粉碎し、振盪インキュベーター内において37℃で2時間、3mLの3mg/mLコラゲナーゼIで消化した。懸濁液をPFEで10mLに希釈した。1400gで5分間スピンドして細胞を回収する。1×PFEで洗浄し、スピンドを繰り返す。細胞ペレット及び骨細片を1mLのTRIzol（Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA）に再懸濁し、ボルテックスし、氷上で15分間インキュベートした。TRIzolを回収し、（既述の通り）クロロホルム/イソプロパノール沈殿によりRNA抽出のために処理した。

【0322】

ヒト及びマウスの間質におけるGrem1発現の評価：Royal Adelaide Hospital（Adelaide, Australia）に来院した無作為に選択さ

10

20

30

40

50

れた症候性MM患者及び血液学的に正常な同年齢対照から、インフォームドコンセントを受けて、腸骨稜トレフィンを採取した。全てのMM患者は新たに診断され、それまで治療を受けたことがなかった。本研究は、Royal Adelaide Hospitalの施設内倫理審査委員会から倫理的承認を取得している（倫理承認番号#030206）。接着性間質細胞を各トレフィンからエキスピボで増殖させ、更に1回継代した後に冷凍保存した。間質サンプルを液体窒素中の保存から取り出し、24時間培養した後、既に述べたように下流のRNA抽出のためにTRIzolに回収した。RQ1 DNase (Promega, Wisconsin, USA)でRNAをDNase処理した後、SuperScript III (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)を用いてcDNAを生成した。BioRad CFX ConnectにおいてRT2 SYBR-green master mix (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、ヒト及びマウスの両サンプルにおけるGrem1発現の定量PCR分析を行い、標準曲線法を用いて内因性対照としてのB-アクトニンに対して正規化した。以下のプライマーを使用した：マウスGrem1：フォワード5'-GCGCAAGTATCTGAAGCGAG-3'（配列番号38）；リバー5'-CGGTTGATGATAGTGCGGCT-3'（配列番号39）、ヒトGrem1：フォワード5'-AGGCCAGCACAAATGACTCAG-3'（配列番号40）；リバー5'-GTCTCGCTTCAGGTATTTGCG-3'（配列番号41）；B-アクトニン：フォワード5'-GATCATTTGCTCCTCCTGAGC-3'（配列番号42）；リバー5'-GTCATAGTCCGCGCTAGAAAGCAT-3'（配列番号43）。

【0323】

マウス間質Grem1過剰発現細胞株の作製：Gastrointestinal Cancer Biology Group, SAHMRIにより供与されたpCMV6-KRベクターから、Grem1のマウスcDNAを単離した。マウスGrem1配列をEcoRI及びNotI制限酵素消化により切断し、pLeGoIT2ベクターにクローニングした。OP9-GFP+細胞にレンチウイルスを感染させた後、GFP及びTdTomatoについて陽性である細胞をFACSによって選別した。定量PCR及びウェスタンブロットによってトランスジーンの発現を確認した。

【0324】

MM PC及びBM間質の共培養：それぞれ[細胞密度]で6cmのTCディッシュ及び24ウェルプレートの両方にOP9間質細胞を播種し、5時間付着させた。5TGM1 MM PCを 1×10^5 細胞/mLで懸濁し、間質細胞培養物に添加した。共培養開始の24時間、48時間、及び72時間後に間質細胞を回収した。接触共培養については、分析のための純粋な間質集団を得るために、GFP陰性5TGM1親MM PCからFACSによってGFP+OP9細胞を単離した。非接触共培養については、共培養期間中4µmトランスウェルを用いてOP9細胞から5TGM1.Bmx1 PCを分離した。ヒトMM細胞株RPMI-8226、U266、KMS-11、及びH929を、それぞれ造血的に健常な個体から単離された3つの初代ヒトBM間質サンプルと共に72時間培養した。ヒトMM細胞株を、1×PBSで2回、接着性間質から十分に洗浄した。間質細胞をTRIzolで溶解させ、クロロホルム/イソプロパノール単離によって処理した。RQ1 DNaseでRNAをDNase処理した後、SuperScript III (Invitrogen)を用いてcDNAを生成した。既述したプライマー配列を用いて定量PCRによりGrem1の発現を評価した。

【0325】

ルシフェラーゼ増殖アッセイ：Grem1を過剰発現している及びベクターのみのOP9間質細胞を、1ウェルあたり 5×10^4 細胞で24ウェルプレートに播種し、一晚付着させた。翌日、5TGM1.Bmx1 MM PCを両間質細胞集団に播種し、72時間培養した。インキュベーション後、激しくピペッティングすることにより、各ウェルの内容物全体を対応するマイクロファージチューブに移した。4℃で5分間、2000gで

スピンすることにより細胞を回収した。細胞をPBSで1回洗浄した。各ウェルの細胞ペレットを1×細胞溶解バッファ（供給元名）で溶解した。細胞溶解液20μLを96ウェルプレートに移した。プレートを読み取る直前に、ルシフェラーゼ反応バッファ（5mM MgCl₂、30mM HEPES、150μM ATP、250μM Coenzyme A、及び150μg/mL D-ルシフェリン）100μLを細胞溶解液に添加した。Wallac 1420 Victor Microplate reader（Perkin Elmer, Massachusetts, USA）を用いて生物発光を測定し、MM PC数の直接相関として光強度を使用した。

【0326】

全身性MMの免疫不全マウスモデルにおけるGrem1の標的化：C57BL/KaLwRijマウス（6～8週齢）に、尾静脈注射により 5×10^5 個の5TGM1.Bmx1細胞を接種した。5TGM1.Bmx1 MM PCを接種した3日後、30mg/kg Grem1中和抗体Ab7326又はIgG対照Ab101.4（UCB-Pharma, UK）を皮下（s.c.）注射によりKaLwRijマウスに投与した。4週間モデルの期間中、3日ごとにマウスを処理した。前述のようにBLIによって腫瘍負荷を毎週モニタリングした。実験の最後に、尾採血により血液を採取し、2100gで10分間遠心分離し、血清を回収した。製造業者の指示に従って、Hydragel 30 β1β2キット（Sebia Electrophoresis, Georgia, USA）を用いて血清パラプロテインレベルを分析した。パラプロテインに対応するバンドを血清アルブミン値に対して定量した。（SAHMRI Animal Ethics SAM165）

【0327】

統計値：数値データは平均±平均の標準誤差（S.E.M.）として提示する。2つの試験条件を表すデータは、スチューデントのT検定によって解析した。2つを超える試験条件のデータは、一方向分散分析（ANOVA）によって解析した後、チューキーの多重比較事後検定を行って、差の統計的有意性を判定した。全ての統計解析は、GraphPad Prism 7（GraphPad Software, Inc, San Diego, CA）を用いて行った。全ての実験をトリプリケートで実施した。

【0328】

結果の説明

Grem1の発現は、MMの骨髄間質でアップレギュレーションされる

健常患者及びMM患者に由来するBM間質から得られたmRNAサンプルにおいて、Grem1の発現を分析した。MM患者のBM間質（n=15）は、同年齢の造血的に正常なドナー（n=17）由来のBM間質と比較して、Grem1の発現が有意に高かった（ $p < 0.001$ ）（図10）。また、5TGM1/KaLwRij.Hsdマウスの骨髄腫モデルにおいてもGrem1の発現を調べた。健常及びMM担がんC57BL/KaLwRij.Hsdマウスから緻密骨を分離し、Grem1発現の差について分析した。担がんマウス由来のBM間質は、健常対照と比較してGrem1の発現の有意な増加は認められなかったが、Grem1の発現が増加する傾向が観察された（図11A）。重要なことに、生物発光イメージングによって測定したとき、最大の腫瘍負荷を有するマウスが、最高のGrem1発現を示した（図11B）。この結果は、MM腫瘍増殖に応答するGrem1の増加がヒト状況における知見を裏付けることを示す。

【0329】

MM細胞はBM間質におけるGrem1発現の増加を促進する

BM由来の間質細胞株OP9と共にマウスMM細胞株5TGM1.Bmx1を用いる共培養実験を行って、BM微小環境におけるGrem1の発現に対するMM PCの影響を調べた。72時間の共培養後、Grem1の発現は、MM PCの存在下で培養したBM間質細胞において、MM PC株と接触しなかったものよりも有意に多かった（ $p < 0.05$ ）（図12a）。24時間及び48時間の共培養のより早い時点では、間質におけるGrem1発現の有意な変化は認められなかった（図12a）。トランスウェル及び細胞接触条件の両方で共培養を実施したが、細胞接触共培養のみが、間質におけるGrem1

発現の変化を示した（図12b）。また、造血的に正常な個体に由来する初代ヒト骨髓間質細胞を、ヒトMM細胞株KMS-11、RPMI. 8226、H929、及びU266と共に培養した。KMS-11及びU266細胞株は、72時間の共培養後にBM間質からのGrem1発現の増加を誘導する能力を示したが、細胞株RPMI. 8226及びH929との共培養では、間質におけるGrem1発現は変化しなかった（図13）。

【0330】

Grem1発現の増加はMM PCの増殖を促進する

MM状況におけるGrem1の重要性について更に調べるために、Grem1を過剰発現している間質細胞を作製し、5TGM1 MM PCとの共培養に使用した。MM PCは、Grem1過剰発現間質細胞と共培養した場合、トランスウェル培養及び細胞接触培養の両状況で有意な増殖増加を示した（図14）（それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ ）。Grem1過剰発現BM間質と共に共培養したMM PCは、その後、Smads-1/5/9のリン酸化の減少によって示される通り、BMPシグナル伝達経路の活性化の減少を示した（図16）。BMP経路は、MM PCの増殖を阻害し、アポトーシスを促進することが知られており、観察されたMM PCの増殖を減少させる可能性のある機序を表す（Hjertner et al, 2001; Hollien et al 2012）。

【0331】

Grem1を標的とすると、インビボでMM腫瘍負荷が減少する

インビボにおけるMM腫瘍の樹立及び成長におけるGrem1の重要性を調べるために、5TGM1/KaLwRijマウスMMモデルを利用した。疾患発症後、Grem1中和抗体（Ab7326、UCB-CellTech, UK）又はIgG対照による処理を受けるようにマウスを無作為に割り付け（ $n = 13$ / 処理群）、生物発光イメージングを介して4週間にわたって毎週疾患負荷をモニタリングした。これらの研究は、抗Grem1療法による処理が、インビボにおいてMM腫瘍負荷を有意に減少させることを立証した（図15）（二元配置分散分析、 $p = 0.0056$ ）。疾患負荷のSPEP解析は同等の結果を示し、抗Grem1抗体で処理したマウスは、対照で処理したマウスに比べて血清アルブミンに対するMスパイク強度が有意に低かった。

【0332】

考察

MM患者のBM間質におけるGrem1の増加の所見は、微小環境細胞集団によって生成されるGrem1の増加について報告した先行研究と一致している。更に、MM様腫瘍を有するマウスの骨では、Grem1の発現が増加する傾向が観察された。インビボモデルに使用した細胞株を用いて更なる研究を実施したところ、BM由来の間質細胞株において直接マウスMM PC株を培養すると、その後、間質からGrem1の発現が増加することが示された。この知見は、間質細胞と直接細胞間接触することができないMM PCでは再現されなかったが、発現が増加する傾向が観察された。このことは、間質からのGrem1発現の増加に参与するMM細胞由来の因子が、主に細胞接触に依存していることを示す。これは、正常なヒトの間質と共に培養した4つのヒトMM細胞株のうち2つでも観察された。MM細胞株KMS-11及びU266は、Grem1発現の増加を誘導することができたが、RPMI. 8226及びH929細胞株はできなかった。一部のヒトMM細胞株はGrem1発現の変化を誘導する能力を有するが、他はこの能力を有しないことは、これら細胞株間でGrem1の調節に参与する重要な因子の発現に根本的な違いがあることを示している可能性があり、予備的研究は、MMにおけるGrem1の調節におけるインターロイキン-6（IL-6）の役割を示唆している（図17）。また、間質でのGrem1発現を誘導する細胞株の能力が、Grem1に対するその増殖応答と相関するか否かを判定するために更なる研究が必要である。

【0333】

MMにおけるGrem1の役割を調べるために、腫瘍微小環境と腫瘍細胞の間のクロストークを部分的に再現するために、Grem1を過剰発現しているBM間質細胞を作製し

、MM PCと共に共培養した。MM PCは、Grem1を過剰発現している間質細胞との共培養で有意な増殖増加を示した。Grem1の増加に应答してSmads1、5、及び9のリン酸化が減少したことによって示された通り、BMPシグナル伝達の下流の活性化の減少が観察された(図16)。

【0334】

Grem1はMMにおいて明らかな分裂促進的役割を示すことから、本発明者らは、Grem1を治療標的とすることが治療の選択肢となるか否かについて検討した。MMの5TGM1/KaLwRijマウスモデルにおいてGrem1中和抗体Ab7326を使用すると、MMの腫瘍負荷がほぼ50%減少することが示された。5TGM1 MM PCはGrem1を発現しないので、この効果は純粋に微小環境を標的としたこと結果であり得る。

10

【0335】

まとめると、本研究は、Grem1がMMにおける治療標的となることを示す。

【0336】

実施例14—MMモデルマウスにおけるGrem1の前処理

序論

多発性骨髄腫(MM)腫瘍をマウスに接種した3日後にGrem1中和抗体を適用した結果、腫瘍負荷が約50%減少した。このことから、MM疾患の進行におけるGrem1の明確な役割が証明されたが、Grem1がMM疾患の発症において役割を果たしているか否かについてはまだ確定されていない。この問題に取り組むために、5TGM1/KaLwRijマウスモデルにGrem1中和抗体を投与した後、腫瘍を接種した。

20

【0337】

方法

全身性MMの免疫不全マウスモデルにおける腫瘍細胞接種前のGrem1の標的化：腫瘍接種の3日前及び1日前に、C57BL/KaLwRijマウス(6~8週齢)に、30mg/kgのGrem1中和抗体Ab7326又はIgG対照Ab101.4(UCB-Pharma, UK)を皮下(s.c.)注射によって2回投与した。0日目に、尾静脈注射を介して 5×10^5 個の5TGM1.Bmx1細胞をマウスに接種した。4週間モデルの期間中、30mg/kgのGrem1中和抗体Ab7326又はIgG対照Ab101.4(UCB-Pharma, UK)のいずれかを3日ごとにs.c.注射によってマウスに投与し続けた。前述のようにBLIによって腫瘍負荷を毎週モニタリングした。実験の最後に、尾採血により血液を採取し、2100gで10分間遠心分離し、血清を回収した。製造業者の指示に従って、Hydragel 30 β 1 β 2キット(Sebia Electrophoresis, Georgia, USA)を用いて、血清パラプロテインレベルを分析した。パラプロテインに対応するバンドを血清アルブミン値に対して定量した。(SAHMRI Animal Ethics SAM165)

30

【0338】

結果／考察

本発明者らのこれまでのデータは、骨髄腫の5TGM1/KaLwRijマウスモデルにおいて、Grem1を標的としてMM腫瘍負荷を低減できることを立証した。これにより、Grem1が疾患の進行に寄与する重要な微小環境因子であり、治療の標的となり得ることが立証された。しかし、Grem1がMM疾患の発症においても役割を果たしているか否かはまだ不明であった。この問題に対処するために、マウスをGrem1中和抗体処理又はIgG対照に供した後、MM腫瘍細胞を接種した。図18に示すように、腫瘍細胞接種後4週間で腫瘍負荷の約75%の減少が観察された。

40

【0339】

MM腫瘍細胞の投与前にGrem1をブロックすると、腫瘍細胞接種後の処理と比較して、試験の終了時まで全身腫瘍負荷が更に25%減少することが示された。腫瘍モデルの開始前に投与した場合のGrem1中和抗体の有効性の増加は、MM疾患の発症におけるGrem1の役割を示唆している。

50

【0340】

実施例15－Grem1によって誘導される乳がん細胞の増殖及び抗Grem1抗体によるGrem1効果の拮抗作用

材料及び方法

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）

ヒトMDA-MB-231-TXSA乳がん細胞及びヒトMF9乳腺線維芽細胞を6ウェルプレートに播種し、正常酸素圧又は低酸素条件で48時間培養した。正常酸素圧条件は、5%CO₂、20%O₂で37℃において維持し、一方、低酸素条件は、5%O₂、10%CO₂で低酸素インビトロチャンバー（Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA）において維持した。TRIzol（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）を用いて全RNAを抽出した。ゲノムDNAの夾雑をDNase I（Promega, Madison, WI, USA）で除去した後、superscript IV（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いてcDNAを合成した。1μgの各RNAサンプルを逆転写し、Biorad CFX ConnectにおいてSYBR Green Fluor qPCR mastermix（Qiagen）を用いてRT-PCRによりGrem1遺伝子の発現を定量した。2^{-ΔCT}法を適用し、β-actinに対して標準化された遺伝子発現を用いて、トリプリケートで実験を行った。データは、正常酸素圧対照に対する倍数変化として示す。

【0341】

プライマー対：

ヒトGrem1：

5'-AGGCCCCAGCACAAATGACTCAG-3'（フォワード）（配列番号40）、

5'-GTCTCGCTTCAGGTATTTGCG-3'（リバーズ）（配列番号41）；

β-アクチン：

5'-GATCATTTGCTCCTCCTGAGC-3'（フォワード）（配列番号42）、

5'-GTCATAGTCCGCCTAGAAGCAT-3'（リバーズ）（配列番号43）。

【0342】

低酸素下における増殖アッセイ

ルシフェラーゼを発現しているMDA-MB-231-TXSA細胞を96ウェルマイクロタイタープレートに播種した（1×10⁴細胞／ウェル）。細胞を正常酸素圧又は低酸素条件下で培養し、一晚付着させた。次いで、細胞を6時間血清飢餓状態にした後、漸増濃度のrhGrem1タンパク質（0～1000ng/mL）で処理した。24時間及び48時間の時点で、ルシフェラーゼ発現を評価し、細胞数の代替尺度として使用した。簡潔に述べると、細胞を1×PBSで洗浄し、その後、細胞培養溶解バッファ（Promega）で溶解した。ルシフェラーゼアッセイ試薬（5mM MgCl₂、30mM HEPES、150μM ATP、50mg/mL Coenzyme A、及び150μg/mL D-ルシフェリン（Biosynth AG, Staad, Switzerland））を細胞溶解物に添加し、ルミノメータープレートリーダー（Wallac 3000）を用いて直ちに発光を定量した。

【0343】

トランスウェル共培養増殖アッセイ

ルシフェラーゼを発現しているマウス4T1乳がん細胞（1×10⁴細胞）を、24ウェルプレート中の3μmポリカーボネートメンブレントランスウェル（Costar, Washington, D. C., USA）に播種した。一晚培養した後、4T1細胞を無血清DMEM中で6時間飢餓状態にして細胞成長を同期させた。対照又はGrem1を発

10

20

30

40

50

現している p L E G O i T 2 コンストラクトが既に形質導入されている G F P + マウス間質 O P 9 細胞を、下方チャンバーの 10% F C S D M E M 中に播種した (2×10^4 細胞)。細胞を 72 時間共培養した後、ルシフェラーゼ発現を介して 4 T 1 細胞の増殖を分析した。

【0344】

ウェスタンブロット分析

マウス 4 T 1 B r C a 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、80%コンフルエントになるまで培養した。細胞を無血清培地中で一晚飢餓状態にし、次いで、指定の処理で 2 時間刺激した。細胞溶解物を調製し、10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) ゲルにおいて等量のタンパク質 ($50 \mu\text{g}$) を分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。リン酸化 S m a d 1 / 5 / 9 抗体 (c e l l s i g n a l l i n g t e c h n o l o g i e s, 1:1000 希釈) を用いてイムノブロッティングを行った。 β -アクチンに対する抗体 (S i g m a A l d r i c h, 1:2500 希釈) でメンブレンをブロッティングすることによって、タンパク質サンプルが等しくロードされたことを確認した。O d y s s e y I n f r a r e d I m a g i n g S y s t e m (L I - C O R B i o s c i e n c e, L i n c o l n, N E, U S A) を用いてタンパク質を可視化した。

【0345】

結果及び考察：

本発明者らは、G r e m 1 が低酸素条件下でヒト乳がん細胞の増殖を誘導することを明らかにした。G r e m 1 が乳がんの増殖を促進する機序は未だ不明であるが、他の幾つかの細胞型において低酸素下で B M P の発現が増加することが示されている。従って、G r e m 1 は B M P の抗増殖作用を阻害することによって低酸素下で増殖を誘導している可能性がある。ヒト M D A - M B - 231 - T X S A 乳がん細胞及びヒト M F 9 乳腺線維芽細胞を、正常酸素圧 (20% O_2) 及び低酸素 (5% O_2) 条件で 48 時間培養した。G r e m 1 m R N A を R T - P C R で定量したところ、M D A - M B - 231 - T X S A 細胞 ($p = 0.0024$) 及び M F 9 細胞 ($p = 0.034$) のいずれにおいても、正常酸素圧対照と比較して低酸素下では G r e m 1 発現が増加することが明らかになった (図 19)。

【0346】

低酸素条件下で培養した場合、r h G r e m 1 は、M D A - M B - 231 - T X S A 増殖の用量依存的な増加を刺激し、それぞれ 24 時間後及び 48 時間後に正常酸素圧条件と比較して最大 1.5 倍 ($p < 0.005$) 及び 1.7 倍 ($p < 0.0005$) であった (図 20)。

【0347】

G r e m 1 が他の間質因子に関連して乳がん細胞の増殖を誘導するか否かを更に調べるために、マウス 4 T 1 乳がん細胞を、G r e m 1 又は対照ベクターのいずれかを発現している間質 O P 9 細胞と共培養した。間質細胞由来の G r e m 1 は、72 時間培養した後に乳がん細胞の増殖を 1.8 倍 ($p < 0.0005$) に有意に増加させた (図 21)。このことは、G r e m 1 が間質由来の B M P に拮抗することによって増殖を誘導する可能性があることを更に示唆している。

【0348】

G r e m 1 は公知の B M P - 2 / 4 / 7 アンタゴニストであるので、本発明者らは、ウェスタンブロット分析を介して、G r e m 1 によって誘導される S m a d 1 / 5 / 9 のリン酸化の阻害を阻害する U C B 抗体 A b 7326 の能力を評価した。マウス 4 T 1 乳がん細胞を 10 ng/mL B M P 2 に曝露したところ、S m a d 1 / 5 / 9 がリン酸化された。 100 ng/mL r h G r e m 1 とコインキュベートすると、この B M P 2 によって媒介される S m a d 1 / 5 / 9 のリン酸化が阻害された。注目すべきことに、アイソタイプ対照と共にプレインキュベートした r h G r e m 1 に曝露した 4 T 1 細胞と比較して、A b 7326 と共に r h G r e m 1 をプレインキュベートすると、4 T 1 細胞における

S m a d 1 / 5 / 9 のリン酸化が部分的に回復した（図 2 2）。これら結果から、A b 7 3 2 6 が G r e m 1 の効果を有効に標的とし、中和することができることが確認される。

【 0 3 4 9 】

実施例 1 6 - V G / M i n マウスにおける単剤療法及び併用療法の効果

V i l 1 - G r e m 1 / A p c ^{M i n} 疾患プロセスの最晩期である 3 5 日齢以降、マウスを 3 0 m g / k g の抗 G r e m 1 抗体で毎週処理した及び／又はマウスに 4 0 m g / k g の 5 - フルオロウラシル（5 F U、S i g m a）を 1 日 2 回腹腔内投与した。カプランマイヤーデータを作成するために、人道的エンドポイント（マウスが貧血、猫背、及び不活動を示す）に達した時点でマウスを殺処分した。

【 0 3 5 0 】

この疾患の末期における 5 F U 又は抗 G r e m 1 のいずれかによる単剤療法は、マウスの寿命に影響を与えなかったが、併用療法は、マウスの寿命を有意に延長した（中央生存期間：無処理 4 5 日間（n = 9）、5 F U のみ 4 7 日間（n = 4）、抗 G r e m 1 のみ 4 9 . 5 日間（n = 6）、併用療法 7 6 . 5 日間（n = 6）：ログランク p < 0 . 0 1）、図 2 3 を参照。これらデータは、増殖している上皮を標的とした標準的な化学療法と共に抗 G r e m 1 抗体を使用して、末期の確立された疾患における併用療法の有効性を示す。

【 0 3 5 1 】

実施例 1 7 - ヒト患者由来異種移植片（P D X）モデルにおける抗 G r e m 1 抗体の効果

マウス I g G 1 としての抗 g r e m l i n - 1 A b 7 3 2 6 の有効性を、8 つの患者由来異種移植片（P D X）モデルで試験する。対照組織に対する G R E M 1 遺伝子産物の発現の増加に基づいて、ヒト P D X モデルを選択した。選択されたモデルは、膵臓がん、肺がん、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、頭頸部がん、及び肝臓がん由来する異種移植片を含む。A b 7 3 2 6 を毎週皮下投与する。モデル期間全体を通して腫瘍サイズを評価し、腫瘍及び血漿のサンプルを実験終了時に収集し、分析する。

【 0 3 5 2 】

実施例 1 8 - C 5 7 B l 6 / K a L w R i j マウスにおける腫瘍負荷に対する抗 G r e m 1 抗体の効果（図 3 3）

C 5 7 B l 6 / K a L w R i j マウスを G r e m 1 中和抗体 A b 7 3 2 6 で処理すると、マウスにおける腫瘍負荷が後肢骨において有意に減少したことが観察された（図 3 3 参照）。I g G 対照（B L I により測定）と比較して、腫瘍細胞接種後に抗 G r e m 1 抗体を投与した場合、腫瘍負荷の有意な減少がみられた（図 3 3 A）。再び I g G 対照（B L I により測定）と比較して、腫瘍細胞接種前に抗 G r e m 1 抗体を投与した場合も、腫瘍負荷の有意な減少がみられた（図 3 3 B）。また、腫瘍細胞接種の後（図 3 3 C）又は前（図 3 3 D）の群の両方で、抗 G r e m 1 抗体で処理した群において脾臓腫瘍負荷の減少傾向も観察された。

【 0 3 5 3 】

C 5 7 B l 6 / K a L w R i j マウスは、骨髄（B M）及び脾臓内で M M 細胞が増殖する多発性骨髄腫（M M）のモデルである。図 3 3 に提示されたデータは、抗 G r e m 1 処理が B M 関連腫瘍に加えて脾臓の M M 細胞を標的とすることを立証する。従って、抗 G r e m 1 療法を使用して、骨肉腫等の骨常在腫瘍、並びに肝臓がん、乳がん、及び／又は前立腺がん等の播種性がんの両方を治療することができる。

【 0 3 5 4 】

実施例 1 9 - 確立された V i l 1 - G r e m 1 及び A p c ^{M i n} ポリポーシスの抗 G r e m 1 抗体による後期処理は、疾患の進行を遅らせ、V i l 1 - G r e m 1 マウスの腸表現型を回復させる（図 3 4）

A p c ^{M i n} マウス（図 3 4 B）では 4 月齢から、V i l 1 - G r e m 1 マウス（図 3 4 A）では 5 月齢から開始して、週 3 0 m g / k g の用量の抗 G r e m 1 抗体（U C B）又は対照抗体（U C B）を皮下注射で投与した。

【 0 3 5 5 】

マウスの年齢は、抗体処理開始（A p c ^{M i n} マウスでは 4 月齢、そして、V i l 1 - G

10

20

30

40

50

rem1マウスでは5月齢)前に腸管ポリポースが発症できるようにした。カプランマイヤーデータを作成するために、人道的エンドポイント(マウスが貧血、猫背、及び不活動を示す)に達した時点でマウスを殺処分した。Vil1-Grem1(A)及びApcMin(B)の両モデルにおいて、抗Grem1抗体で処理するとマウスの寿命が有意に延長された。指定時点で殺処分したところ、4週間の処理でVil1-Grem1の腸表現型の回復を示した。

【0356】

実施例20-抗Grem1抗体処理は、Vil1-Grem1マウスをAOM突然変異誘発から保護する(図35)

Vil1-Grem1マウスにおける上皮での異常なGrem1の発現は、上皮幹/前駆細胞の表現型を促進する(Davis et al., 2015)ことから、本発明者らは、これら細胞が体細胞突然変異の影響を受けやすいという仮説を立てた。アゾキシメタン(AOM)投与を用いて、未処理Vil1-Grem1マウス及び抗Grem1処理Vil1-Grem1マウスに対する変異原性侵襲の影響を調べた。AOMは、自然発症CRC発がんを再現するためにマウスモデルで広く利用されている、十分実証されている突然変異原である(Neufert and Neurath, 2007)。カプランマイヤーデータを作成するために、人道的エンドポイント(マウスが貧血、猫背、及び不活動を示す)に達した時点でマウスを殺処分した。

【0357】

マウスに、週30mg/kgの用量の抗Grem1抗体を3回皮下投与し、続いて、週10mg/kgの用量のアゾキシメタン(AOM、Sigma)又はビヒクル(生理食塩水)を3回腹腔内投与した後、更に3週間、週30mg/kgの抗Grem1抗体で処理した。前駆細胞集団の増殖及びその後の異所性陰窩病巣の形成を確実にするために、Vil1-Grem1疾患プロセスにおいて十分に後期である90日齢以降に処理を開始した。

【0358】

AOM投与により、未処理Vil1-Grem1マウスにおけるポリープ形成が顕著に増強された。結腸ポリープ負荷は、AOM処理動物において有意に増加した(図35B)。これは、マウスの生存に負の影響を与えた(図35A):群VG+無処理を群VG+AOM+無処理と比較。AOM処理動物の腫瘍負荷の増加及び生存期間の減少は、突然変異原性侵襲前後の期間に抗Grem1抗体を投与することによって部分的に消失した:群VG+AOM+無処理を群VG+AOM+αGrem1と比較。これらデータは、Vil1-Grem1マウスにおける抗Grem1抗体による細胞運命決定の正常化が、上皮幹/前駆細胞の促進を防ぎ、AOM変異原性侵襲から上皮を保護することを示唆している。

【0359】

実施例21-Foxl1、Wnt5A、及びWnt2Bの発現は、Vil1-Grem1の間質においてアップレギュレートされ、この表現型は、抗Grem1抗体処理によって消失する(図36~38)

抗体処理及び未処理のVil1-Grem1マウス(n=4)における絨毛異所性陰窩におけるWntリガンドの発現源を調べるために、Shoshkes-Carmel et al. (2018)に記載の通り、Foxl1インサイチュハイブリダイゼーション(ISH)を使用して上皮下テロサイト細胞を同定した。HALO画像解析ソフトウェアを用いて、Foxl1の発現レベルを定量した。絨毛間質でのFoxl1発現は、未処理Vil1-Grem1マウスにおいて有意に増加した(p=0.0037)(図36及び図38C)。抗Grem1抗体で処理すると、Foxl1発現レベルが回復し(p値WT対抗体処理Vil1-Grem1マウス(p=0.4864)、このことは、間質のリモデリング及びFoxl1細胞の動員が上皮Grem1依存的であることを示す。

【0360】

どのメディエーターがFoxl1+細胞によって生成されたかを決定するために、マルチプレックスISHを使用して、絨毛上皮下線維芽細胞におけるFoxl1及びWnt5Aの発現の組み合わせを実証した(図37を参照)。Shoshkes-Carmel

10

20

30

40

50

et al. (2018)に記載のテロサイトに類似した長い突起を有する薄い構造が、染色によってマークされた。

【0361】

Vil1-Grem1モデルにおける上皮でのGrem1発現は、その後Wntリガンド5A及び2Bを発現する絨毛間質細胞集団を活性化させる。抗Grem1抗体による処理は、間質細胞の活性化を防ぎ、Wntリガンドの発現を消失させ（図38A及び38B）、これは、間質のリモデリングが上皮Grem1依存的事であることを示す。

【0362】

方法

インサイチュハイブリダイゼーション

パラフィンブロックから、DEPC (Sigma) 処理したH₂Oを用いて切片（厚さ＝0.4 μm）を作製し、切片を60℃で2時間焼成した。組織を脱パラフィン化し、室温（RT）で10分間、RNAscope Hydrogen Peroxide (ACD 322335) で処理した。100℃でRNAscope 1X Target Retrieval Reagents (1:10 ACD 322000) を用いて15分間抗原回復を実施した。HybEZハイブリダイゼーションシステム (ACD) を使用して40℃で30分間、サンプルをRNAscope Protease Plus (ACD 322331) で処理した。プローブを40℃で2時間インキュベートした。使用したプローブは以下の通りであった：LGR4 (ACD 318321)、LGR5 (ACD 312171)、FZD5 (ACD 404911)、FZD7 (ACD 534101)、WNT2B (ACD 405031)、WNT5A (ACD 316791)、WNT5A-C3 (ACD、316791-C3)、及びFOXL1 (ACD 407401)。ヘマトキシリン（茶色）又はDAPI（蛍光）を使用してスライドを対比染色した。

【0363】

ISHの定量

Aperio CS2 Digital Pathology Scanner (Leica Biosystems) を使用して、20倍の倍率でスライドをスキャンした。Aperio ImageScope Pathology Slide Viewing Software (Leica Biosystems) を用いて、マウス1頭あたり100本の絨毛をアノテーションした。HALO画像解析プラットフォーム (Perkin Elmer) を用いてFoxl1発現レベルを定量し、面積当たりのDAB染色%として表した。条件間でDABレベルを比較するために、ボンフェローニ補正を適用した二元配置分散分析及び多重比較を使用した。＜0.05のp値で差を有意であるとみなした。統計ソフトウェアRを用いて解析を行った。

【0364】

実施例22－抗Grem1抗体は、Vil1-Grem1; Apc^{Min}処理マウスにおいて用量応答関係を示す（図39）

Vil1-Grem1; Apc^{Min}マウスにおいて21日齢で開始して、週15、30、及び60mg/kgの可変用量の抗Grem1抗体（UCB）又は対照抗体（UCB）を皮下注射で6週間にわたって隔週（biweekly）で投与し、その後、毎週投与した。 Kaplan-Meierデータ（図39に提示）を作成するために、人道的エンドポイント（マウスが貧血、猫背、及び不活動を示す）に達した時点でマウスを殺処分した。抗Grem1で処理することにより、マウスの寿命は用量依存的に延長されたが、週30mg/kgを超える用量では更なる生存効果はみられなかった。

【0365】

実施例23－Vil1-Grem1マウス及びApc^{Min}マウスにおける抗Grem1抗体による早期及び後期の処理の比較（図40）

42日齢（早期処理）又は腸管ポリポシス発症の120日後（後期処理）で開始して、週30mg/kgの用量の抗Grem1抗体（UCB）又は対照抗体（UCB）を、Vil1-Grem1マウス（図40A）及びApc^{Min}マウス（図40B）に皮下注射で

10

20

30

40

50

投与した。

【0366】

カプランマイヤーデータを作成するために、人道的エンドポイント（マウスが貧血、猫背、及び不活動を示す）に達した時点でマウスを殺処分した。両時点で開始した抗Grem1抗体処理によって、マウスの寿命が有意に延長された。具体的には、Vill1-Grem1マウス（図40A）については、抗Grem1抗体処理によって、ビヒクル群の中央生存期間（242日（ $n=13$ ））が有意に増加した：後期処理：519日；早期処理：540日。Apc^{Min}マウス（図40B）では、抗Grem1抗体で処理した結果、ビヒクル処理群の中央生存期間が192日から261日（後期処理群）及び424.5日（早期処理群）へと有意に延長された。

10

【0367】

実施例24-Grem1中和抗体の使用は、乳がんの前臨床モデルにおいて骨及び肺内の乳がん腫瘍の成長を有意に減少させる（図41～45）

新規抗Grem1中和モノクローナル抗体を用いて、2つの臨床的に関連のある乳がんの前臨床マウスモデルを用いて、乳がんの確立及び進行におけるGrem1のインビボにおける寄与について調べた。

【0368】

方法

細胞培養

PyMT-B01マウス由来の乳がん細胞は、Sheila Stewart教授（St Louis, MO, USA）によって供与され、MDA-MB-231ヒト乳がん細胞株は、Toshiyuki Yoneda博士（元University of Texas Health Sciences Centre, San Antonio, TX）によって供与された。両細胞株ともSFG-NES-TGLベクターのレトロウイルス発現により生成されるルシフェラーゼを発現する（Ponomarev, V., et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. 31 (5): p. 740-51. 5%CO₂加湿雰囲気中37℃で、10%ウシ胎児血清（FBS、Life Technologies, Australia）、100IU/mLペニシリン（Life Technologies, Australia）、100μg/mLストレプトマイシン（Life Technologies, Australia）及び25mM HEPES（Life Technologies, Australia）を補給したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、Life Technologies, Australia）中でがん細胞を培養した。

20

30

【0369】

動物

動物実験は、South Australian Health and Medical Research Institute (SAHMRI) のAnimal Ethics Committeeによって倫理番号SAM373の下で承認された動物プロトコル手順に従って行われ、「Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes」で定められた指針に準拠する。

40

【0370】

前臨床乳がんモデルにおけるGrem1抗体処理

PyMT-B01：腫瘍細胞接種の1週間前に、30mg/kgの用量の抗Grem1抗体Ab7326又はIgG対照Ab101.4を、5週齢のC57BL6免疫不全マウスに2回皮下（s.c）投与した。1×10⁵個のルシフェラーゼを発現しているPyMT-B01マウス乳がん細胞を、尾動脈（CA）を介して全身に注射した。

【0371】

MDA-MB-231：腫瘍細胞接種の1週間前に、30mg/kgの用量の抗Grem1抗体UCB6114又はIgG対照AbA33を、5週齢のNOD/SCID/ga

50

mma (NSG) 免疫不全マウスに2回皮下 (s.c) 投与した。1×10⁵個のルシフェラーゼ発現MDA-MB-231ヒト乳がん細胞を、CAを介して全身に注射した。

【0372】

試験期間中、週2回の処理を継続した。1週間隔で、マウスに150mg/kgルシフェリンを腹腔内投与 (i.p) し、Xenogen IVIS生物発光イメージングシステムを用いて画像化し、Living Imageソフトウェアを用いて腫瘍負荷を定量した。動物倫理上の要求に従って、それぞれPyMT-B01モデル及びMDA-MB-231モデルについて腫瘍細胞注入後13日目及び22日目に試験を終了した。動物の淘汰時に器官を解剖し、腫瘍転移を分析するためにエクスピボでBLI画像化した。

【0373】

結果

試験の終了時に、Grem1中和抗体Ab7326で処理したPyMT-B01担がんマウスは、CAを介して腫瘍を注入した場合、アイソタイプ対照Ab101.4で処理したマウスと比較して、全身腫瘍負荷が35%減少した (図41)。このBLIシグナルは主に後肢に集中しており、これは、このモデルに関連する広範囲の骨格腫瘍病変を示す。アイソタイプ対照と比較して、Grem1中和抗体で処理したマウスでは、肺転移腫瘍負荷の統計的に有意な減少も観察された (図42A)。Grem1中和抗体で処理したPyMT-B01担がんマウスでは、肝臓転移腫瘍負荷の減少傾向も観察された (図42B)。

【0374】

第2の試験の終了時 (22日目) に、AbA33で処理した対照群と比較して、Grem1中和抗体 (UCB6114) 処理群では、MDA-MB-231担がんNSGマウスの平均腫瘍負荷が低かった (図43)。

【0375】

また、抗Grem1抗体 (UCB6114) で処理したマウスでは、肺転移の平均腫瘍負荷の減少も観察された (図45)。これら結果は、Grem1中和抗体がGrem1を標的とすることで、骨及び肺内の乳がん腫瘍の成長が有意に減少することを示す。これら研究は、抗Grem1療法が転移性乳がんにおける好適な治療の選択肢となり得るという仮説を裏付ける。結論として、本発明者らは、インビボにおいてGrem1中和抗体がGrem1を標的とすることが、乳がんの骨格及び肺に転移した腫瘍の成長を減少させるための有効な治療戦略となるという最初の証拠を提供する。

【0376】

実施例25-Grem1中和抗体の使用は、前立腺がんの前臨床モデルにおいて前立腺がんの腫瘍成長を減少させる (図46及び47)

新規抗Grem1中和モノクローナル抗体 (UCB6114) を用いて、前立腺がんの前臨床マウスモデルにおける前立腺がんの確立及び進行に対するGrem1のインビボにおける寄与について調べた。

【0377】

方法

細胞培養

PC-3ヒト前立腺がん細胞株は、ATCC (Manassas, VA, USA) から入手した。細胞株は、SFG-NES-TGLベクターのレトロウイルス発現により生成されるルシフェラーゼを発現する (Ponomarev, V., et al. 2004)。5%CO₂加湿雰囲気中37℃で、10%ウシ胎児血清 (FBS、Life Technologies, Australia)、100IU/mLペニシリン (Life Technologies, Australia)、100µg/mLストレプトマイシン (Life Technologies, Australia) 及び25mM HEPES (Life Technologies, Australia) を補給したRPMI1640 (Life Technologies, Australia) 中でがん細胞を培養した。

【0378】

10

20

30

40

50

動物

動物実験は、South Australian Health and Medical Research Institute (SAHMRI) のAnimal Ethics Committeeによって倫理番号SAM373の下で承認された動物プロトコル手順に従って行われ、「Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes」で定められた指針に準拠する。

【0379】

前臨床前立腺がんモデルにおけるGrem1抗体処理

腫瘍細胞接種の1週間前に、30mg/kgの用量の抗Grem1抗体(UCB6114)又はIgG対照AbA33を、5週齢のNOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)免疫不全マウスに2回皮下(s.c)投与した。5×10⁵個のルシフェラーゼ発現PC-3マウス前立腺がん細胞を、尾動脈(CA)を介して全身に注射した。

【0380】

試験期間中、週2回の抗体処理を継続した。1週間隔で、マウスに150mg/kgルシフェリンを腹腔内(i.p)投与し、Xenogen IVIS生物発光イメージングシステムを用いて画像化し、Living Imageソフトウェア(PerkinElmer, MA, USA)を用いて腫瘍負荷を定量した。各試験の最後に、動物の淘汰時に器官を解剖し、腫瘍転移を分析するためにエキスポでBLI画像化した。

【0381】

結果

PC-3前立腺がんモデルは、BLIによる骨格腫瘍負荷の証拠に加えて、7日目から有意な肝腫瘍負荷(前立腺がん転移の別の一般的な部位)を示した。アイソタイプ対照抗体(AbA33)で処理したマウスと比較して、Grem1中和抗体(UCB6114)で処理したマウスでは、動物全体(図46A)及び肝臓(図46B)の腫瘍負荷の有意な減少が観察された。Grem1中和抗体で処理したマウスでは、後肢(図46C)及び肺(図46D)の腫瘍負荷の減少傾向も観察された。

【0382】

配列表

配列番号1(ヒトGremlin-1; Uniprot ID: O60565)

MSRTAYTVGALLLLLTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRG
RGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCY
GQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCI
SIDLD

配列番号2(N末端タグを有する結晶構造解析で使用したヒト切断型Gremlin-1)

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTI
HEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPT
TKKKRVTRVKQCRCISIDLD

配列番号3(Ab7326 HCDR1 Kabat及びChothiaの複合)

GYTFTDYMH

配列番号4(Ab7326 HCDR1 Kabat)

DYYMH

配列番号5(Ab7326 HCDR2 Kabat)

LVDPEDGETIYAEKFQG

配列番号6(Ab7326 HCDR3 Kabat)

DARGSGSYYPNHFDY

配列番号7(Ab7326 LCDR1 Kabat)

KSSQSVLYSSNNKNLYLA

配列番号8(Ab7326 LCDR2 Kabat)

10

20

30

40

50

WASTRES

配列番号 9 (Ab7326 LCDR3 Kabat)

QQYYDTPT

配列番号 10 (Ab7326重鎖可変領域変異体1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSS

配列番号 11 (Ab7326軽鎖可変領域変異体1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIK

10

配列番号 12 (Ab7326重鎖可変領域変異体2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSS

配列番号 13 (Ab7326軽鎖可変領域変異体2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIK

配列番号 14 (マウス完全長IgG1重鎖変異体1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP
AVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVS
SVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNS
TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQM
AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQVQSN
WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK

20

配列番号 15 (マウス完全長IgG1軽鎖変異体1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTDAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKKWIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMS
STLTTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC

30

配列番号 16 (ヒト完全長IgG1重鎖変異体2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

配列番号 17 (ヒト完全長IgG1軽鎖変異体2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 18 (Fab重鎖変異体1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

50

配列番号 19 (Fab軽鎖変異体1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 20 (N末端タグを有する結晶構造解析で使用したヒト切断型Gremlin-1)

AMPGEEVLESSQEALHVTERRKYLRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFY
IPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

配列番号 21 (アミノ酸1~21のシグナルペプチドが欠失している配列番号1の成熟Gremlin-1配列)

KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHV
TERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFC
KPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

配列番号 22 (ヒトIgG4P重鎖変異体1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHMWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

配列番号 23 (ヒトIgG4P軽鎖変異体1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 24 (ヒトIgG1重鎖DNA変異体1)

caagtgcactggtggaatccggggccgaagtgaagagcccgagccactgtgaagatctcttgcaagtgc
tccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacctgggaagggccttgagtggatgg
gtctggtcgtatcccgaggacggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgcgtcaccatcaccgccg
acacttcaccgacaccgcgtacatggagctgtccagcttgagggtccgaggacacagccgtgtactactgcgc
cacggatgctcggggaagcggcagctactacccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgac
tgtctcgagcgttctacaaagggccctccgtgttccgctcgtccatcatcgaagtctaccagcggaggca
ctgcggctctcggttgctcgtgaaggactacttccggagccggtgaccgtgtcgtggaacagcggagccct
gaccagcggggtgcacaccttccggcgtcttgagtcagcagcggccttactccctgtcatcagtggtgactg
tcccgctccagctcattgggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaacacctagcaacaccaaggtga
caagaaagtcgagcccaaatcgtgtgacaagactcacacttgcgcgctgcccggcaccggaactgctggg
aggtcccagcgtcttctgttccctccaaagccgaaagacacgctgatgatctccgcaccccgagggtcactt
gcgtggtcgtggacgtgtcacatgaggaccagagggtgaagttcaattggtacgtggatggcgtcgaagtcca
caatgccaaaactaagcccagagaagaacagtacaattcgacctaccgcgtcgtgtccgtgctcacgggtgtg
catcaggattggctgaacgggaaggaatacaagtgaaggtgtccaacaaggcgtgccggcaccgatcga
gaaaactatctcaaagcgaagggaagcctaggggaacctcaagctacacgctgccaccatcacgggatga
actgactaagaatcaagtctcactgacttgtctgggtgaaggggtttaccctagcgacattgccgtggagtggg
aatccaacggccagccagagaacaactacaagactacccctccagtgctcgactcggtggtgcttcttctt
tactcgaagctcaccgtggataagtcgggtggcagcagggaaacgtgttctcctgctcgggtgatgcatgaag
ccctccataaccactatacccaaaagtcgctgtcctgtcgccgggaaag

配列番号 25 (ヒトIgG1軽鎖DNA変異体1)

gacattgtgatgaccagtcacccgattcgcttgctggtgtccctgggagaacggggccaccattaactgcaaga
gtcacagtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggatcagcagaagcctggacagcct

10

20

30

40

50

cccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccgggggtgccggatagattctccggatcgggttcgg
gcactgacttcactctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcgggtgacttctgtcagcagtactac
gacaccccgacctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtagcgggtggccgctccctccgtgttcatctt
ccacacctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctacccccgc
gaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcgggcaactcccagggaatccgtcaccgagca
ggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaag
gtgtacgcctgcgaagtgaccaccaggggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc
配列番号 2 6 (ヒトIgG4P重鎖DNA変異体1)

caagtgcaactgggtggaatccggggccgaagtgaanaagcccgaggccactgtgaagatctcttgcaaagt
tccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacctgggaagggccttgagtggatgg
gtctgtgctgatcccaggagcggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgcgtcaccatcaccgccg
acacttccaccgacaccgcgtacatggagctgtccagcttgagggtccgaggacacagccgtgtactactgcgc
cacggatgctcggggaagcggcagctactaccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgac
tgtctcgagcgttctacaaagggccccctccgtgttccctctggccccctgtctcccggtccacctccgagtctac
cgccgctctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctg
acctccggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtg
ccctcctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggac
aagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcccctgcccctgaatttctgggcggaccttccgt
gttctgttccccccaaagcccaaggacacctgatgatctcccggaaccccgaaagtacctgcgtgggtgggtg
gacgtgtcccaggaagatcccagggtccagttcaattggtagctggacggcgtggaagtgcacaatgccaag
accaagcccagagaggaacagttcaactccacctaccgggtgggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggac
tggtgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaagggcctgccctccagcatcgaaaagaccatc
tccaaggccaagggccagccccgcgagccccagggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgacaa
gaaccaggtgtccctgacctgtctgggtcaagggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaac
ggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgtcggacagcgacggctccttcttctgtactctc
ggctgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgc
acaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
配列番号 2 7 (ヒトIgG4P軽鎖DNA変異体1)

gacattgtgatgaccagtcccccgattcgcttgccgtgtccctgggagaacggggccaccattaactgcaaga
gtcacagtccgtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggatcagcagaagcctggacagcct
cccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccgggggtgccggatagattctccggatcgggttcgg
gcactgacttcactctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcgggtgacttctgtcagcagtactac
gacaccccgacctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtagcgggtggccgctccctccgtgttcatctt
ccacacctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctacccccgc
gaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcgggcaactcccagggaatccgtcaccgagca
ggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaag
gtgtacgcctgcgaagtgaccaccaggggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc
配列番号 2 8 (マウス完全長IgG1重鎖変異体2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP
AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVS
SVFIFPPKPKDVLITLTLPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNS
TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQM
AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQVQSN
WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
配列番号 2 9 (マウス完全長IgG1軽鎖変異体2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTDAAPT
SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM

10

20

30

40

50

SSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREC

配列番号 3 0 (ヒト完全長IgG1重鎖変異体1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDATVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 3 1 (ヒト完全長IgG1軽鎖変異体1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 2 (Fab重鎖変異体2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDATVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

20

配列番号 3 3 (Fab軽鎖変異体2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 4 (ヒトIgG4P重鎖変異体2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDATVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

30

配列番号 3 5 (ヒトIgG4P軽鎖変異体2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 6 (ヒトGremlin-1;全配列)

40

actcgggtgcgccttccgcggaccggcgaccagtgacggccgcccgcgtcactctcgggtcccgtgacccc
gcgccgagccccggcggtcttgccgcggccgcactcagcgccacgcgtcgaaagcgagggccccgagga
cccgccgcactgacaggtgagcgcgggacgcacccggcagggatgtgagtgggcgagggaagagggccgc
aaaccaaccaggacccgctcagttccacgcgcggcagccctccgtgcgcgcagggtcgggtgcgttgctc
cggggggtgaattgtgaagaaccatcgcggggtccttcctgctgaggccgcggacaccgtgacctgctgctc
gggtctgcagggaacgtaggaaaaaaagttgtcaggagcgggcaggtgacccccacatcccgtttccacc
tcccgaggccccgaacacgctcctggtgctggtggcagcagcgccctggcagacgcgcccgttagcgagg
gcgcgaagtccaggccgagcagcgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
tgcccttgagagggtcccatgtgcttggggcgccgcgctgggtctggggcgcttggggcgccattggagtc
cgcggggttgagacatccggagaatccatgatgtgtgcatttgcgatccccgaggtgagatggagactggcaa

50

50

tttactgattatgagcaggttgcttagctaaaatgagaaatacagcaagaagagggatggaaagagctggct
taaactttcccaaagacatcatgaacactgggaacaggtcatacatataccatttttttctcagtcctcagtat
tagaatattgtgttcctagaggctttgtgaaaattggaatacattgccatgacctgcacaggatagaggtggtta
atatggccttaccttgctttagatgtttactcttgatccctaagggaaaactggaaggaaagcatgctgtagaga
ggacctgcttgagagtatgtgtcctctgggacaagtggaaatgaaagagaggatagaggcaaagagaaaaaa
aggtggagatggggtgagacttgctggaggacagttgcaaagaaaactcatgatgagaataacatcacatttc
ttgaagaagctgaactgcattgatgggaagttgaggcagagtttgaaaagaagatatactgtctgcaaaaaag
aatcaacggagatgtcaggtatcttgatgcacctgagtcctatgagatgcagcttaatttaattaatgatatga
gtaggccatttcataagtgggtggaaattaccataaagtgtttgcagctaatagacggcgcatgaatgatgtcata
ggaaacctaatgtctggatgagctatggattgaatttttactatgggacaccttctacatgttgctgtggaaaaga
attgtcctcaagaaatgtacatcttctgcatttcctctacatctctgatatttacaagtgcacattatttggtgat
actacaactgggatttcaagtgcacatcactactatttccttctactgaagaatcaagagcagtcctgggggtggg
gagagcttgagtgattgacaaggatgtggcagagccctgggtccactatgaattatagtcttaccctgcttact
gtcactcatgtagagcagctagtgtgcctcagagcactgctgttctctgagaagctgaggctctcgattgacatt
cttgaagttgggtgtttacttctctgaataaacaaggttggaactcagacatcttacaataagtactaaaga
ttttgaagaataggttttttaaaaaatgaaaaaacatttcatttccatagctaataaatcttattttgaggaaaat
gtacttttctttaaaaaaaaaaaaaagcctgtctgtcactctagacccttggcttagaaggtaggcacactcaca
tagaaacagaaagtctgtccaaattaaaactgaaaaccacagttgactaattttgaatttatagctctgtgttg
gcttctgcgatagtattaatttcaatggcttcaattagaaaatgaaacctatgcatccatagagaacaggta
aaaagtcagggaacatttgaggttttccaagaaaaagaaagacaagtccttaggaagctctctaggtatggaagga
atttgccacactgagagttagacatccaaaggatagcaattggctcttctgctcatgggcactgggtgaaggcat
tttaaatgccaagaatggtacctctgtaaataatgaggttcataataatcatgcatttaccaaatttttataag
cacctgccttgtgccaggcactgagggtgaaggatgaataagccctcatcaactgtcagactagatatttact
caataacagatgtgaaaatgccaagaaggaaaagttgagtataaagaaagccttaagtgggttcagagaaata
aaattgcatttttcggatagatgtttatggaatcgcccttatgaggtaaactgtcctatgcagtgaacatacatt
cccagttagtctcagattggcctctgtgatgacaaactcagagggtcctgggtcaggagggtgaattgtctg
gaggccattttcaggaggtatggaggaagactggggcataggcctggggccatcccatgtactcctcctctga
aatggggagcaactgaattgtgttttatttttagatcttcgtccaactgaataaccagaaattcgtgaaaccttctc
aaattcacactatattttgagaccaggagaaggctccttgagaaattgccacactgtcttatcctagtctctgga
aaaattcagtcctgtattataactgggcgtttctcataagtgccttttttttcttttttataataactttaagt
tctgggatacatgtgcagaatgtgcaggtttgttacataggtatacacgtgccatgggtggttctgcacccatc
aaccatcatctacattaggtatttctcctaagctaccccttccctagccccccaccctcgacaggccccagt
gtttgatgttccctccctgtgtccatgtgttctcattgttcaactccacttatgagtgagagcatgcggtgtttg
gttttctgttctgtgttagtttctgagaatgatggtttttggcttcatccacgtccctgcaaaggacatgaact
catcctttttatggctgcatagtattccatgggtgtatgtgtccacatttgctttatccagtctatcattgatgagc
acttgggttgggtccaagtctttgctattatgactagtactgcgataaacatgtgtatatgtgtctttatattagaa
tgatttataatccttttaggtctataccagtaataggattcctgggtcaaatgggtatttctggttctagatccttga
ggaattgccacactgtcttcacaacggttgaactaatttacactcccaccaacagtgtaaaagcatttcctattt
ctccacatccttccaacatctgttgttctgactctttaatgacggccatttctaactggcgtgaaatgggtatct
cattgtgggttttgatttgcatttctctaataaccacgatgatgagctttttctcatatgtttgctggccccataaa
tgtcttcttttgagaaatgtctgttcatatcctttgccacttttgatgggggtgtttgctttttcttgtaaatttgt
ttgagttcctggttagattctggatattagcccttgtcagatggatagactgcaaaaattttctccattctgtag
gttgctgttccactctgatggtagtttcttttgccatgcagaagctgttttagtttaattagatccaatttgtcagttt
tggcttttgttgccattgcttttgggtgttttagtcatgaagtctttgcccattgcctatgtcctgaattgtattgccct
ggttttcttctaggattttatggttttaggtcttacatttaagtctttaatccatcttgaattaattttgtataagg
tgtaaggaaagggtccagtttcagtttctgcgtatggctagccagttttccaacgttatttattaaataggga
tcctttcccattgcttgttttgcaggtttgtcaaagatcagacgggtttagatgtgtgggtgttttctgaggc
ctctgttctgttccattgggtctgtatatctgctttgataccagtagcgtgttttgggttactgtagcctttagta
cagtttgaagtcaggtagcgtgatgcttgttcttttgccttaggattgtcttggctatatgggctctttttggttc
tatatgaaatttaaagtagttttttcatagacatctatagaactctccaccccaaatcaacagaatatacattctt

10

20

30

40

50

ctcagtatcgcatcacacttatttctaaaatgaccacataattagaagtaaaacactcctcagcaaagtcaaaaa
acagaaatcctaacagtgctgtcagacccagtgcaatcaaattagaactcaggattaagaaacttactgaaaa
ccacacaactgcatggaaactgaacaacctgctcctgaatgactactgggtaaataacaaaattaaggcagaa
ataaatagggttctttgaaagaaatgagaacaaagacacaaatataaccagaatctctgggacacagctaaagcag
tgtttagagggaaattgatagcactaaatgccacaggagaaagcgggacagatctaaaatcgacacccta
atcacaattaaaagaactagagaaacaagagcaaaacaaattcaaaagctagcagaagacaagaaataactaa
gatcagagcagaactgaaggagatagagacacaaaaaaccttcaaaaaatcaatgaatccaggagctgtttt
ttttttttgaaaagattaatgaaatagactgcttagccaaactaataaaggagaaaaagagagaagaatcaaata
gacaatagacacaataaaaaagtataaaggggatatcaccactgatccacagaaatacaaaactaccatcag
agaatactataaacacctctacgcaataaactagaaaattgggaagaaatggatacattcctgaacgcatac
acctcccaagactaaaccaggaagaagttgaatccctgaatagaccaatagcaagttctgaaattgaggcag
taattagtagcctaccaacaaaaaagcccaggaccagacagattcacagccgaagtctaccagaggtaca
aaggaggagctagtaccattccttctgaaactattccaaacaatagaaaaagaaggactcctccctaactcattt
atgaggccagcatcatcctgataccaaaacctggcagagacacacataaaggaaattcaggccaatatccct
gatgaacattgatgtgaaaatcctcaataaaaactggtcagcacatcaaaaagcttacctgccatgatcaagtt
ggcttcatccctgggatgcaaggctggttcaacatacgcaaatcaataaacgtaatacatcacatacacagaa
ccaatgacaaaaaccacatgattatctcaatagatgcagaaaaggccttcgataaaattcaacaccccttcaat
gctaagaactctcaataaactaggtattgatgaacatatctcaaaataataagagttatttatgacaaaccac
agccagtatcatactgaatgggcaaaagctgggaagcattccctttgaaaaccgccacaaggatgacttctctca
ccactcctattcaacatactattgggaagttctggccagggaagcaggcaagacaaataaataaagggtattc
aaataggaagagaggaagtcaaattgtctctgtttgcagatgacatgattgtatatttagaaaaccccatcatct
cagcccaaatctccttaagctgataagcaacttcagcaaagtctcaggatacaaaatcaatgtgcaaaaatca
caagcattcctatacaccaataatagacaaacagccaaatcatgagtgaactcccattcacaagtgtacaaa
gaataaaatacctaggaatccaacttacaagggatgtgaaggaccttcaaggagaactacagaccactgct
caaggtataagagaggacacaaacaaatggaaaaacattccatgctcatggataggaagaatcaatattatg
aaaatggccatactgccaaaacaatttatagattcaatgccatcccatcaagctaccactgacttcccttcaca
gaattagaaaaaaactacttttaatttcataatggaactgaaaaaagagccggtatagccaagacgatcctaag
caaaaagaaaaaagctggaagcatcatgctacctgacttcaaactatactacaaggctac
agtaacaaaaacagcatggtatagatataagtgcttttttttaaaagacaaagtaaatTTTTTgtgttggg
gtaaaacaaaagctctgcataaagagcagggatgttgtaacatacactgaccaaagggtgggaaacctacagtt
ggagcagaagctgaatgtcacattatcagctccgaacttataatgggtctaaaagtactagggttaattgttggaaa
gatggtgccatttaagatatcttaaatcaatatttaatttttaatttgacattatcctagagttgaatggtgtt
tacttaccatgtgctgttcattagaaaatctagatcctacactgcctttgcgcaaggtagttgctctaataatacc
aacctgtccagttttggtgggagaaataatgttactgttaagttgcacttagtggttattatgtgtaatactggta
ttccaaagagagaaggaaaaatgtttgctacacagctgtgttcttaggttcagaaaaccacaggagtgaggacag
gagaaccttcaggattcagggtccgattgttgtgatggccgcaggaggagactgtgaatttgaaactgcatcc
attgaaaagaaaatccctccacactttaataattctctcctgccccatggcagcaagtgccttataggccttgc
actcaaagcttaataaaaaggcagacctgctgaatcataatctgcatcttaacaatatcccagatattgtctgc
actttcttttttttttctttctttctttcttttttttgagacagagctctcgctcagtcacccaggctggagtga
gtggcgcatctcggctcactgcaagctctgactcccggttcacgccattctcctgccttagactcccgagta
gctggcactacaggcgcccgccactacgcccggctaattttttgtatttttagtagagatggggtttcaccgtg
ttagccaggatggtctcgatctcctgacctcgatccgccatctgggcctccaaagtgtcgggattac
aggcgtgagccactgcgcccggccaattgtctgcactttcaagtctaagaagcactgtccaggaggaaaatc
tttttagctgaggcttctctcttgcactctccttttaaaaatatgctgctccttctccacctttccctcttctccg
ccttttctgtctgcctttactacctccctgaacattcaactttagaagagttccctttctctgaattgcattctt
catttattcattcttttctctctgtctatggtttcctattttttgtcggttttccctcacctcacctccttgttattt
tttgccattgttcacatatcactgccctttcagaccatatctagcttctgacctatccactaatccattgccacta
atttattcagcatgccatgccatttattaatgtaaatatttgacatacttgttctatcatgccatttttctacct
tttaattgtatatacacagacacatgtgaatgacataatttactatttaaaaggtagaaaaatgtatatcgtggt
acaaagtatacattgagtatctgtgcccagtttcaagatgagaataagttagagaggtgaagcctcatgagtca

10

20

30

40

50

cgtcacctacacgctactgtctttcattccatctgcagtagtccacacatttggttagttctccaattgctgtcac
attgacatcgagttggatctgaacagcgtagctggggagacgaagtattggtatctttgcttaaatggagtgat
ttactgagagacaaagtacatctttaagatcagatagcaagttactgcaccaggagcgcgacctttctgtttt
gttgttttccctctgtcaaatgccttctgggtctccatgaatctctcctccacatatgataaaaatgcaaagtctca
taagcattcacagctcaggaagcctcaggctagttggggagaaaagactgggaggtttccggaggaatgaag
tcctctgagcagagaggttaattcatcttgctgtaaaaacaaaatagaaaataagttccctcaataagtgaacg
taatacaaaagacaaatgtggttgggtgccagaggccaggaagaagtcttgtgagaatagggtgcagagaagag
ctaggccctggctgagtttaaaccttgacttagtcactgtgggactctgggtgagttactccatggattgatggc
tgggtcatggagataatagtacctaattcatacaggtactgtgagaagtaaatggaatatcctacgttaagtgtt
taacgggtgcgtttaaatgctagggtgctattattattaatttttaaatgaactttgccaatgttttgtgtcttccctct
ctgtgtcttctttcttagtatgagccgcacagcctacaggtgggagccctgcttctctcttggggaccctgc
tgccgggtgctgaagggaagaaagggtcccaagggtgccatccccccgagacaaggccagcacaat
gactcagagcagactcagtcgccccagcagcctggctccaggaaccgggggaggggccaaggggcggggca
ctgccaatgcccggggagggaggtgctggagtccagccaagaggccctgcatgtgacggagcgcaaatacctg
aagcgagactgggtgcaaaaccagccgcttaagcagaccatccacgaggaaggctgcaacagtcgcaccatc
atcaaccgcttctgttacggccagtgaactctttctacatcccagggcacatccggaaggaggaagggttctt
tcagtcctgtctcttctgcaagcccaagaaattcactacatgatgggtcacactcaactgcctgaactacagc
cacctaccaagaagaagagagtcacacgtgtgaagcagtgctgttcataatccatcgatttggattaagccaa
atccagggtgcacccagcatgtcctaggaatgcagccccaggaagtcccagacctaaacaaaccagattcttac
ttggcttaaacctagaggccagaagaacccccagctgcctcctggcaggagcctgcttgtgcgtagttcgtgt
gcatgagtggtggtggtgcctgtgggtgttttttagaccagagaaaacacagtctctgctagagagcactc
cctattttgtaaacatatctgctttaatggggatgtaccagaaaccacctcaccgggtcacatctaaaggg
gcggggccgtgggtctggttctgactttgtgttttgtgccctcctggggaccagaatctcctttcggaatgaatg
ttcatggaagaggctcctctgagggcaagagacctgttttagtgctgcattcgacatggaaaagtccttttaac
ctgtgtctgcatctcttctcctcctcctcacaatccatctcttctaagttgatagtactatgtcagtctaatt
ctcttgtttgccaagggttcttaaatcacttaacctatgatgcaaatgtttttcattttgtgaagacctccag
actctgggagaggctgggtgtgggcaaggacaagcaggatagtgagtgagaaaggaggggtggagggtga
ggccaaatcagggtccagcaaaagtcagtagggacattgcagaagcttgaaaggccaataccagaacacagg
ctgatgcttctgagaaagtcttttcttagtatttaacagaacccaagtgaacagaggagaaatgagattgccag
aaagtgattaactttggccgttgcaatctgctcaaacctaaccacaaactgaaaacataaatactgaccactcc
tatgttcggaccaagcaagtttagctaaacaaacaaactcctctgctttgtccctcagggtggaaaagagaggt
agtttagaactctctgcataggggtgggaattaatcaaaaaccgcagaggctgaaattcctaatacctttcctt
atcggtggttatagtcagctcatttccattccactatttcccataatgcttctgagagccactaacttgattgataa
agatcctgcctctgctgagtgtagctgacagtagtctaagatgagagagtttagggactactctgttttagcaag
agatattttgggggtctttttgttttaactattgtcaggagattgggctaaagagaagacgacgagagtaagga
aataaagggaattgcctctggctagagagtagttaggtgttaatacctggtagagatgtaagggatatgacctc
ccttctttatgtgtcactgaggatctgaggggacctgttaggagagcatagcatcatgatgtattagctgtt
catctgctactgggtggatggacataactattgtaactattcagttattactggtaggcactgtcctctgattaaa
cttggcctactggcaatggctacttaggattgatctaagggccaaagtgcagggtgggtgaactttattgtactt
tggatttgggttaacctgttttcttaagcctgagggtttatatacaaaactcctgaatactcttttgccttgtatct
tctcagcctcctagccaagtcctatgtaatatggaaaacaaacactgcagacttgagattcagttgccgatcaa
ggctctggcattcagagaaccttgcaactcgagaagctgtttttatttctgttttgtttgatccagtgctctccc
atctaacaactaaacaggagccatttcaaggcgaggagatattttaaacacccaaaatgttgggtctgattttca
aacttttaactcactactgatgattctcacgctaggcgaatttgtccaaacacatagtgtgtgtgtttgtatac
actgtatgacccaccccaaatctttgtattgtccacattctccaacaataaagcacagagtggatttaattaag
cacacaaatgctaaggcagaattttgagggtgggagagaagaaaagggaagaagctgaaaatgtaaaacc
acaccaggggaggaaaaatgacattcagaaccagcaaacactgaatttcttgtttgttttaactctgccacaag
aatgcaatttcgttaacggagatgacttaagttggcagcagtaattcttcttttaggagcttgtaccacagcttgc
cacataagtgcagatttggctcaagtaagagaatttctcaacactaacttactgggataatcagcagcgta
actaccctaagcatatcactagccaaagagggaatatctgttcttcttactgtgcctatattaagactagta

10

20

30

40

50

10

20

【 0 3 8 3 】

30

40

50

Cheong, C.M., et al., Tetraspanin 7 (TSPAN7) expression is upregulated in multiple myeloma patients and inhibits myeloma tumour development in vivo. *Exp Cell Res*, 2015. 332(1): p. 24-38.

Chesi, M., et al., Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*, 2012. 120(2): p. 376-85.

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

Ciucan, L., et al., Treatment with anti-gremlin 1 antibody ameliorates chronic hypoxia/SU5416-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Am J Pathol*, 2013. 183(5): p. 1461-73.

Curran, S.P., et al., Deletion of Gremlin1 increases cell proliferation and migration responses in mouse embryonic fibroblasts. *Cellular Signalling*, 2012. 24(4): p. 889-98.

Dallas, S.L., et al., Ibandronate reduces osteolytic lesions but not tumour burden in a murine model of myeloma bone disease. *Blood*, 1999. 93(5): p. 1697-706.

Das, D.S., et al., A novel hypoxia-selective epigenetic agent RRx-001 triggers apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Leukemia*, 2016. 30(11): p. 2187-2197.

Davis H, Irshad S, Bansal M, Rafferty H, Boitsova T, Bardella C, et al. Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med*. 2015;21(1):62-70.

Diamond, P., et al., Targeted disruption of the CXCL12/CXCR4 axis inhibits osteolysis in a murine model of myeloma-associated bone loss. *J Bone Miner Res*, 2009. 24(7): p. 1150-61.

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

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

Fowler, J.A., et al., Bone marrow stromal cells create a permissive microenvironment for myeloma development: a new stromal role for Wnt inhibitor Dkk1. *Cancer Research*, 2012. 72(9): p. 2183-9.

Gazzerro, E. et al. (2005), *Endocrinology* 146, 655-665. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia.

Gazzerro, E. et al. (2007), *J.Biol.Chem.* 282, 31549-31557. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass.

Ghobrial, I.M., Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*, 2012. 120(1): p. 20-30.

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

Guan et al. (2017). Gremlin1 promotes carcinogenesis of glioma in vitro. *Exp Pharmacol Physiol*, 44 (2): 244-256

Hewett, D.R., et al., DNA Barcoding Reveals Habitual Clonal Dominance of Myeloma Plasma Cells in the Bone Marrow Microenvironment. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2017. 19(12): p. 972-981.

Hideshima, T., et al., Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 2007. 7(8): p. 585-98.

Hjertner, O., et al., Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and

10

20

30

40

50

induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood*, 2001. 97(2): p. 516-22.

Holien, T., et al., Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia*, 2012. 26(5): p. 1073-80.

Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet*. 2001;28(2):184-7.

Howe J, Roth S, Ringold J, Summers R, Jarvinen H, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*. 1998;280(5366):1086-8.

Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M. & Harland, R. M. (1998), *Mol. Cell* 1, 673-683. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.

Isella C, Terrasi A, Bellomo SE; Petti C, Galatola G, Muratore A, et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet*. 2015;47(4):312-9.

Irshad S, Bansal M, Guarnieri P, Davis H, Al Haj Zen A, Baran B, et al. Bone morphogenetic protein and Notch signalling crosstalk in poor-prognosis, mesenchymal-subtype colorectal cancer. *J Pathol*. 2017.

Jaeger E, Leedham S, Lewis A, Segditsas S, Becker M, Cuadrado PR, et al. Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet*. 2012;Jan;45(1):2-3.

Karagiannis, G.S., et al., Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biol Chem*, 2015. 396(2): p. 163-83.

Karagiannis, G.S., et al., Enrichment map profiling of the cancer invasion front suggests regulation of colorectal cancer progression by the bone morphogenetic protein antagonist, gremlin-1. *Mol Oncol*, 2013. 7(4): p. 826-39.

Kim, M., et al., Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *Plos One*, 2012. 7(4): p. e35100.

Kim, H.S., et al., GREM1 is expressed in the cancer-associated myofibroblasts of basal cell carcinomas. *Plos One*, 2017. 12(3): p. e0174565.

Koketsu, K., et al., Gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, is a crucial angiogenic factor in pituitary adenoma. *Int J Endocrinol*, 2015. 2015: p. 834137.

Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, Multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2004. 351(18): p. 1860-73.

Laurila, R., et al., The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. 6(7): p. 1400-8.

Lavoz, C., et al., Gremlin regulates renal inflammation via vascular endothelial growth factor receptor 2 pathway. *J Pathol*, 2015.

Lawson, M.A., et al., Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 8983.

Lewis A, Freeman-Mills L, de la Calle-Mustienes E, Giraldez-Perez RM, Davis H, Jaeger E, et al. A polymorphic enhancer near GREM1 influences bowel cancer risk through differential CDX2 and TCF7L2 binding. *Cell Rep*. 2014;8(4):983-90.

Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood*. 2010;116(18):3677-80.

Mulvihill, M.S., et al., Gremlin is overexpressed in lung adenocarcinoma and increases cell growth and proliferation in normal lung cells. *Plos One*, 2012. 7(8): p. e42264.

Namkoong, H., et al., The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer*, 2006. 6: p. 74.

Neufert, C., Becker, C. & Neurath, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2, 1998-2004, (2007).

Noll, J., et al., Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*, 2014. 99(1).

Noll, J.E., et al., PTTG1 expression is associated with hyperproliferative disease and poor prognosis in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: p. 106.

Noll, J.E., et al., SAMS1 Is a Tumor Suppressor Gene in Multiple Myeloma. *Neoplasia*, 2014. 16(7): p. 572-85.

Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-38.

Ponomarev, V., et al., A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004. 31(5): p. 740-51.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262-5.

Schmid, G. J., Kobayashi, C., Sandell, L. J. & Ornitz, D. M. (2009), *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 238, 766-774. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice.

Scoville D, Sato T, He X, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling *Gastroenterology*. 2008;134(3):849-64.

Sethi A, Wordinger RJ, Clark AF. Gremlin utilizes canonical and non-canonical TGFbeta signaling to induce lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*. 2013;113:117-27.

Shoshkes-Carmel, M. et al. Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* 557, 242-246, (2018).

Sneddon, J.B., et al., Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(40): p. 14842-7.

Tamminen, J.A., et al., Gremlin-1 associates with fibrillin microfibrils in vivo and regulates mesothelioma cell survival through transcription factor slug. *Oncogenesis*, 2013. 2: p. e66.

Tomlinson IP, Carvajal-Carmona LG, Dobbins SE, Tenesa A, Jones AM, Howarth K, et al. Multiple Common Susceptibility Variants near BMP Pathway Loci GREM1, BMP4, and BMP2 Explain Part of the Missing Heritability of Colorectal Cancer. *PLoS Genet*. 2011;7(6):e1002105.

Topol, L.Z., et al., Identification of drm, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(8): p. 4801-10.

Vande Broek, I., et al., Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clin Exp Metastasis*, 2008. 25(4): p. 325-34.

10

20

30

40

50

Verheyden, J.M. and X. Sun, An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. Nature, 2008. 454(7204): p. 638-41.

Wang, D.J., et al., The bone morphogenetic protein antagonist Gremlin is overexpressed in human malignant mesothelioma. Oncology Reports, 2012. 27(1): p. 58-64.

Worthley, D.L., et al., Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. Cell, 2015. 160(1-2): p. 269-84.

Yin, Y., et al., Overexpression of Gremlin promotes non-small cell lung cancer progression. Tumour Biol, 2015.

Yu, Y. Y. et al. (2010), Bone 46, 841-851. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair.

WO-2014159010 (Priority: 14 Mar, 2013) Regeneron Pharmaceuticals Inc. "Human antibodies to GREM 1".

WO-2013137686 (Priority: 15 Mar, 2012) Seoul National University and Daegu Foundation, Korea "Gremlin antibody".

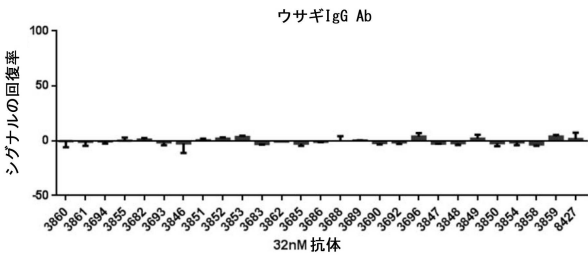
US 2009041757A1 (Priority: 16 Mar, 2007) Stanford University, "Bone morphogenetic protein antagonist and uses thereof".

WO2007124486 (Priority: 21 Apr, 2007) Children's Hospital Los Angeles, "BMP4 inhibitors".

WO2002054940 (Priority: 12 Jan 2001) University of Medicine and Dentistry of New Jersey, "Bone morphogenetic protein-2 in the treatment and diagnosis of cancer".

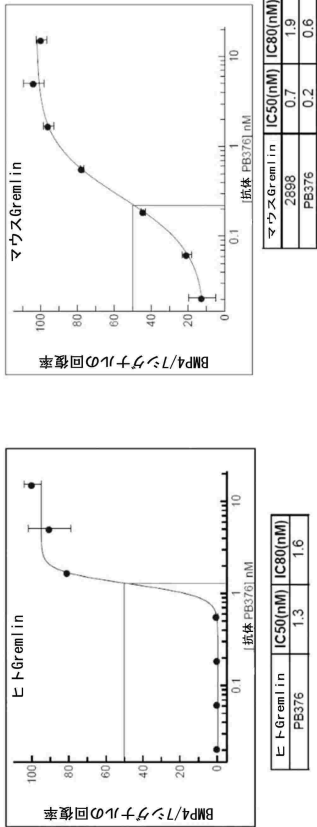
【図面】

【図 1】

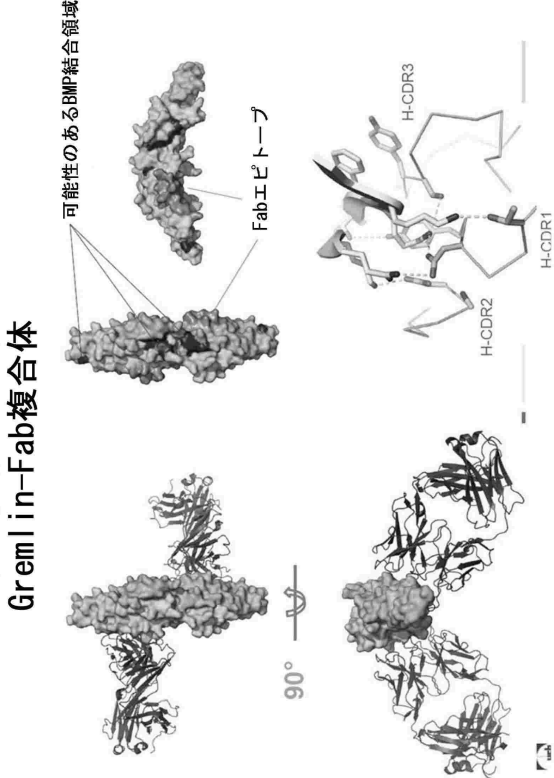


【図 3】

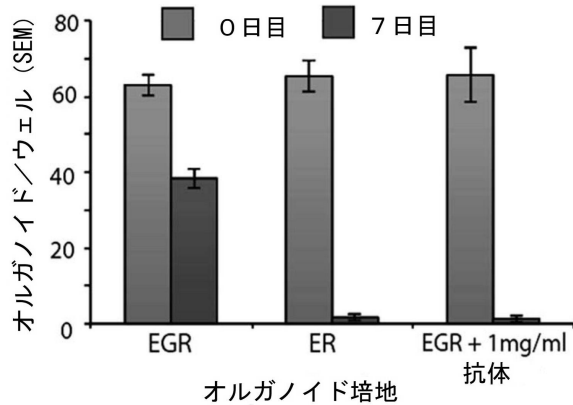
プレート最高濃度15nMの7点にわたる3倍滴定（100%Gremlin用量の10倍）



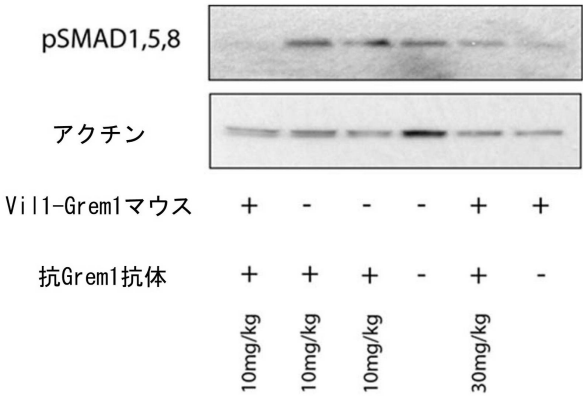
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

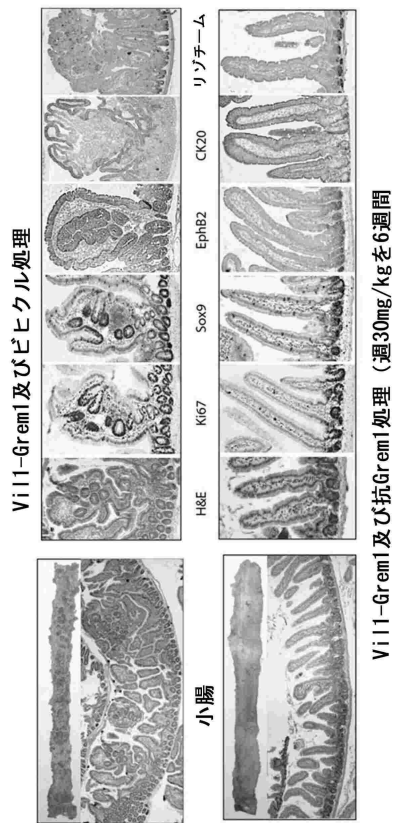
20

30

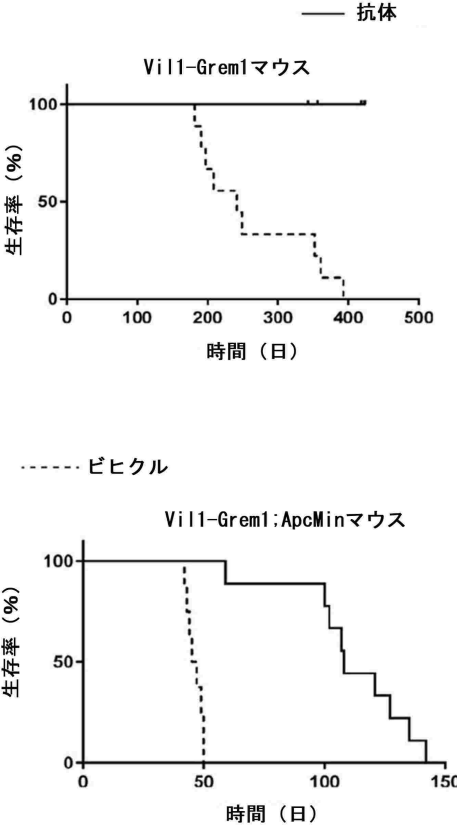
40

50

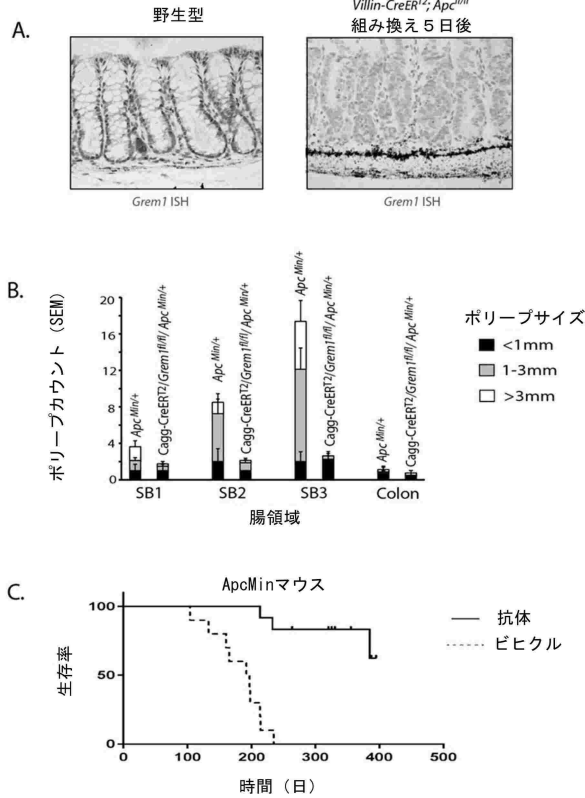
【図 7】



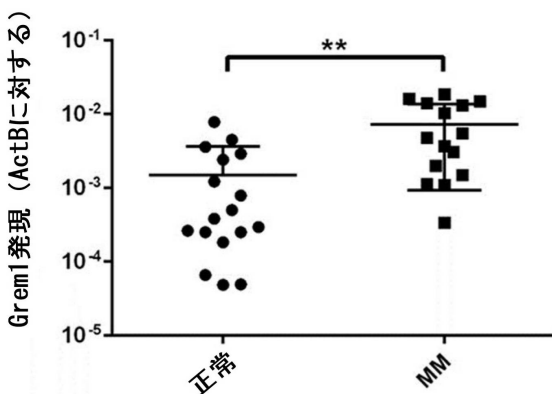
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

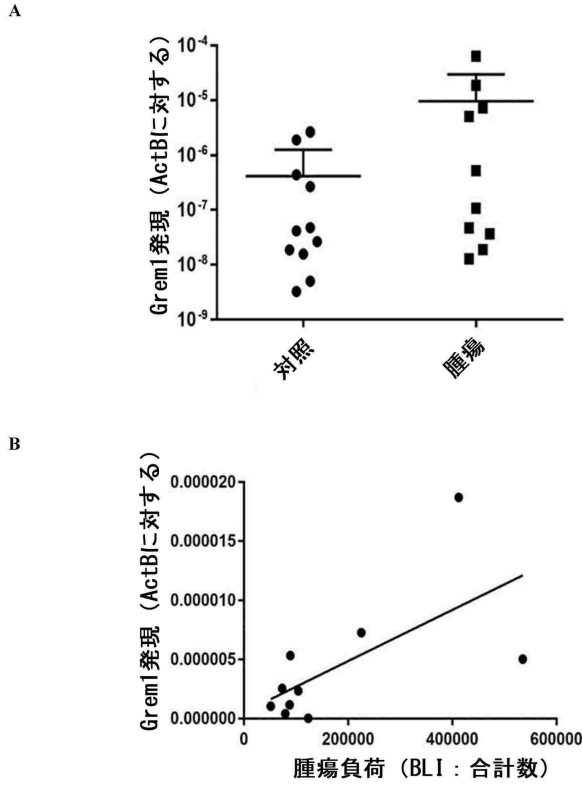
20

30

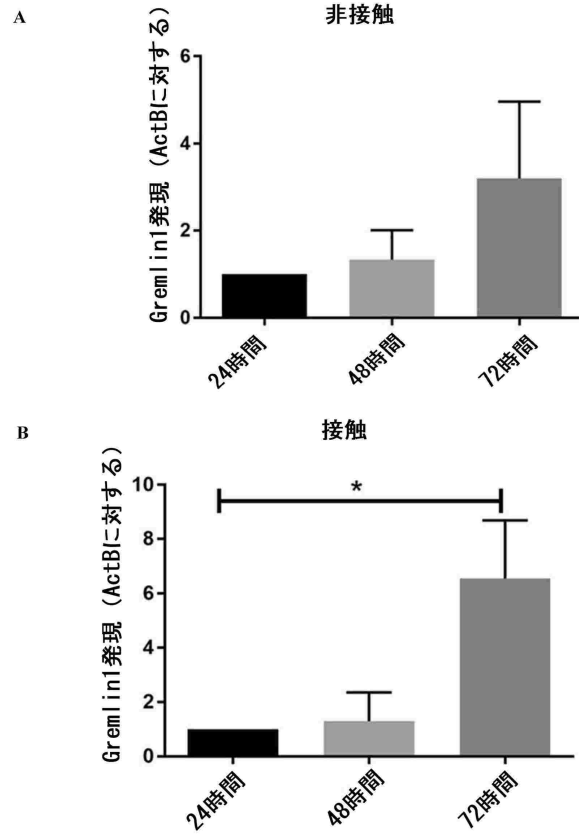
40

50

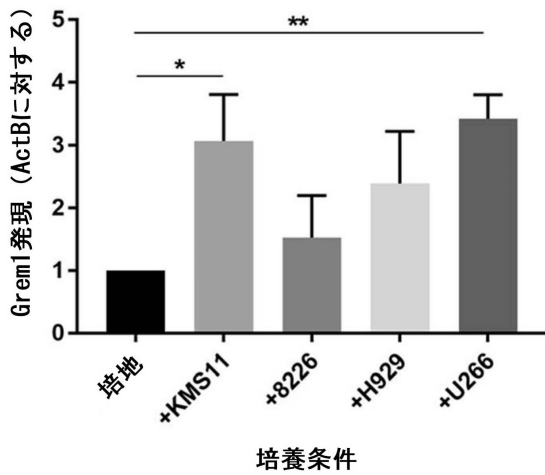
【図 1 1】



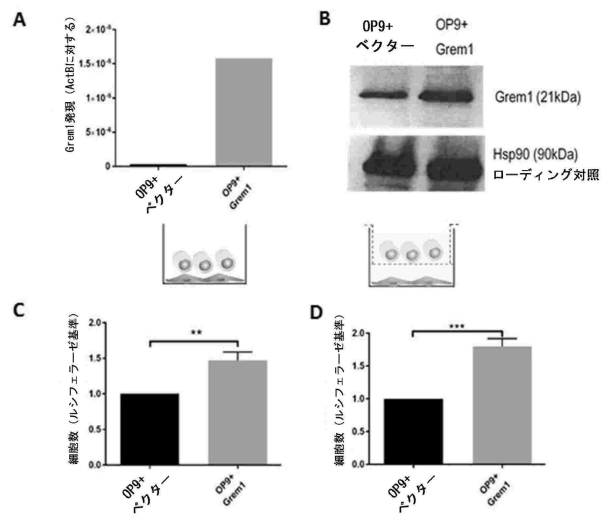
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

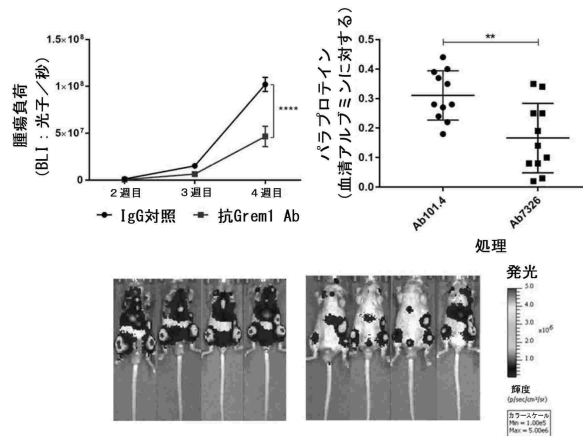
20

30

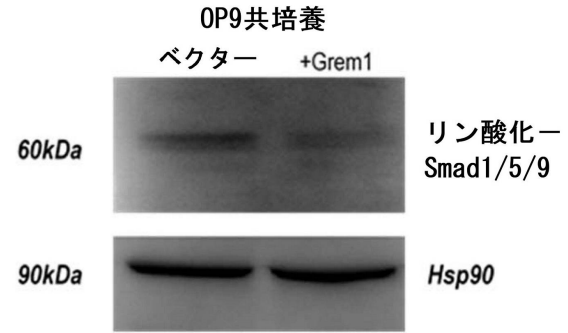
40

50

【図 15】

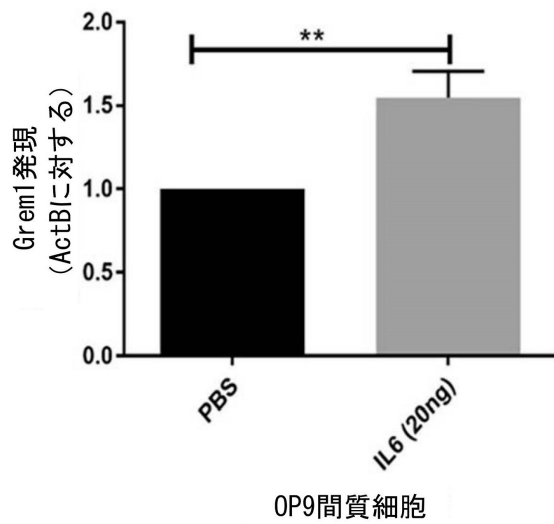


【図 16】

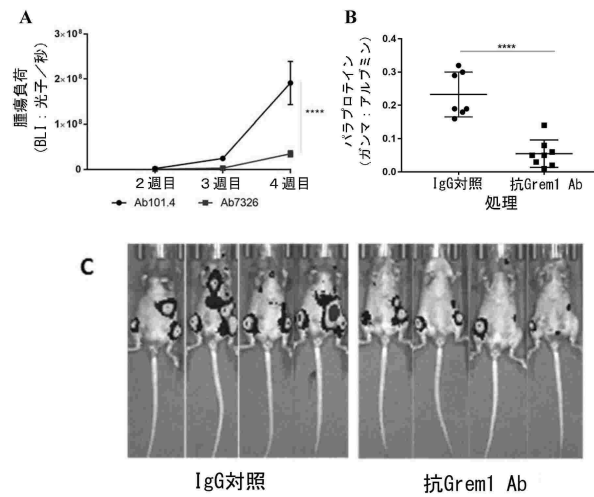


10

【図 17】



【図 18】



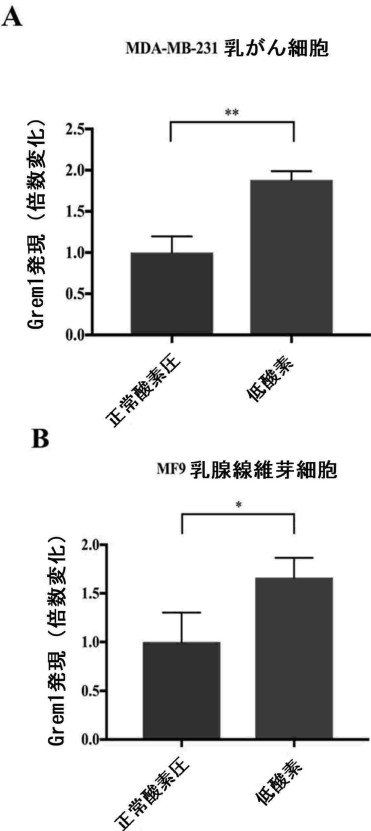
20

30

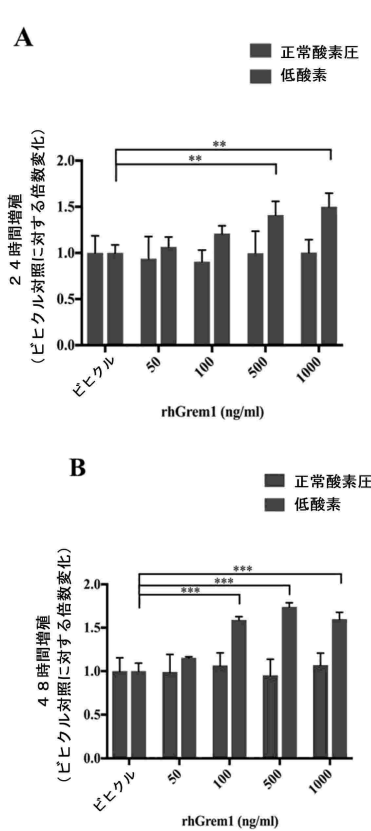
40

50

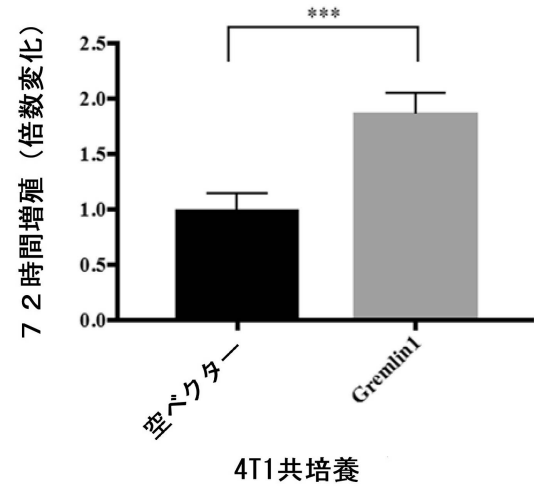
【図 1 9】



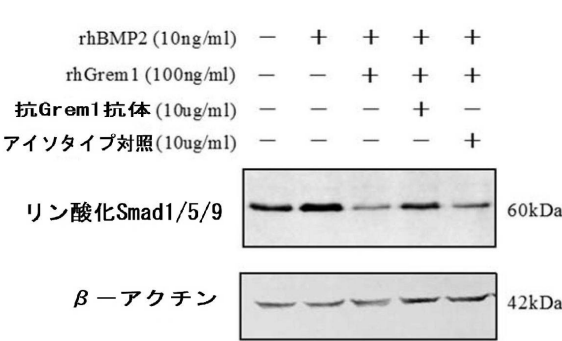
【図 2 0】



【図 2 1】



【図 2 2】



10

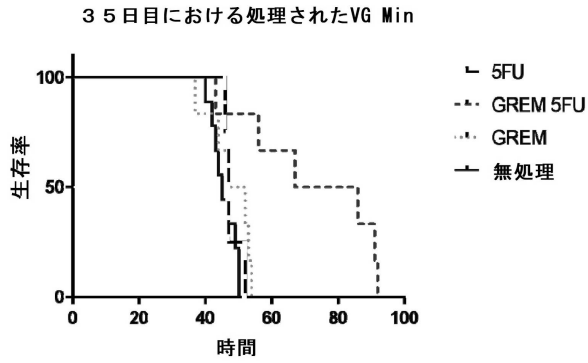
20

30

40

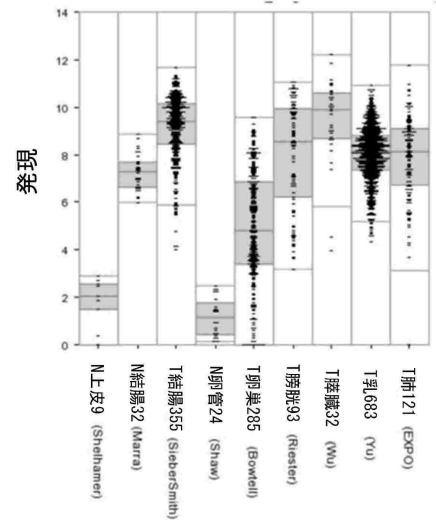
50

【図 2 3】



【図 2 4】

N = 正常組織発現 (入手可能な場合)
T = 腫瘍発現

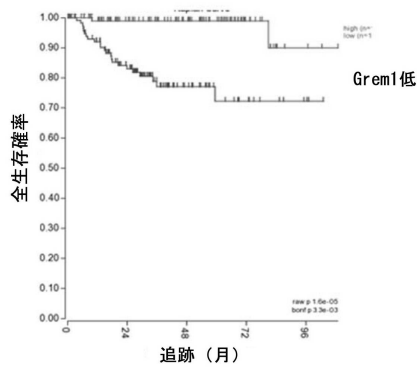


10

【図 2 5】

膀胱がん—Hoglundデータセット (308個の腫瘍) GEO [gse21501](#) PMID [20644708](#)

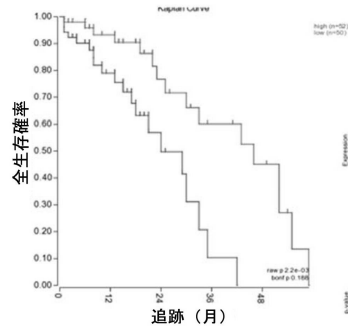
赤色の線—Grem1低
青色の線—Grem1高



【図 2 6】

膵臓がん—Yehデータセット (132個の腫瘍) GEO [gse21501](#) PMID [20644708](#)

赤色の線—Grem1低
青色の線—Grem1高



20

30

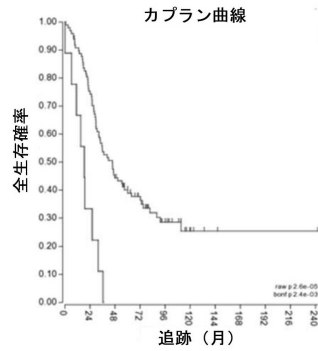
40

50

【図 27】

卵巣腺がん—Mehta—Grigoriouデータセット (107個の腫瘍) GEO [GSE26193](#), PMID [22101765](#)

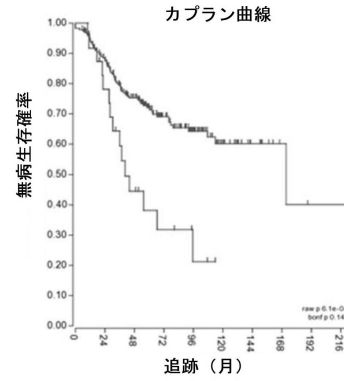
赤色の線—Grem1低
青色の線—Grem1高



【図 28】

基底乳がん—Bertucciデータセット (266個の腫瘍) GEO [gse21653](#), PMID [20490655](#)

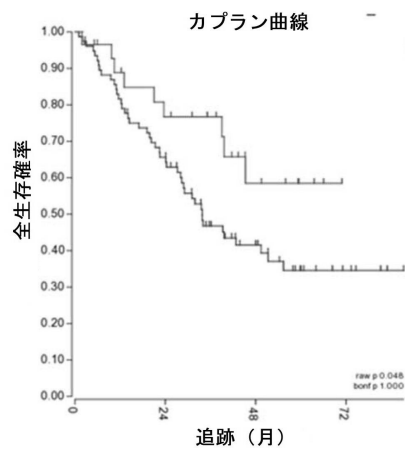
赤色の線—Grem1低
青色の線—Grem1高



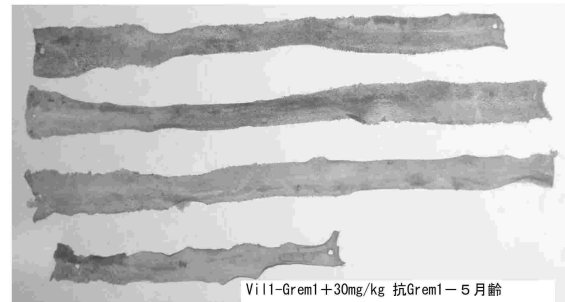
【図 29】

肺がん—Bildデータセット (114個の腫瘍) GEO [GSE3141](#), PMID [16273092](#)

赤色の線—Grem1低
青色の線—Grem1高



【図 30】



10

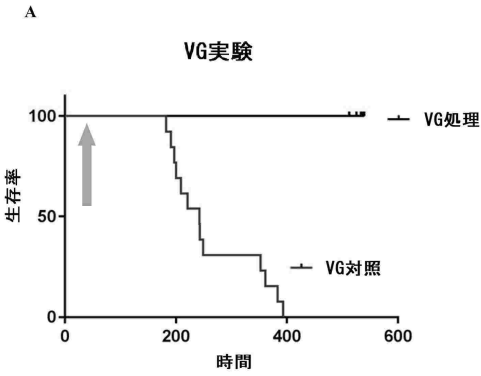
20

30

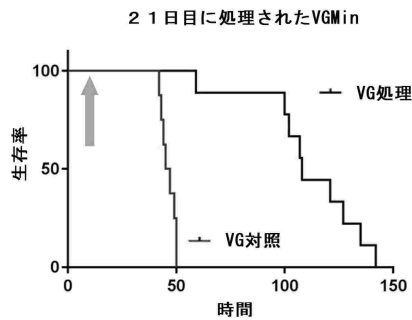
40

50

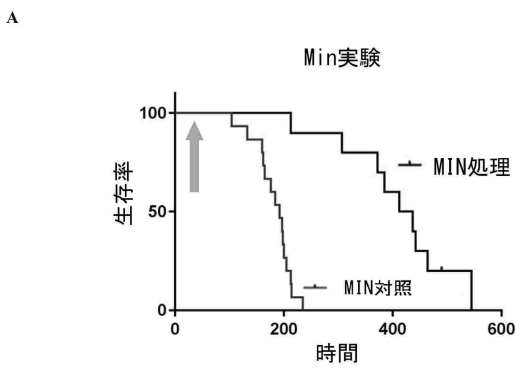
【図 3 1】



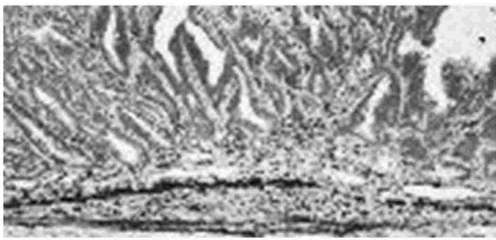
B



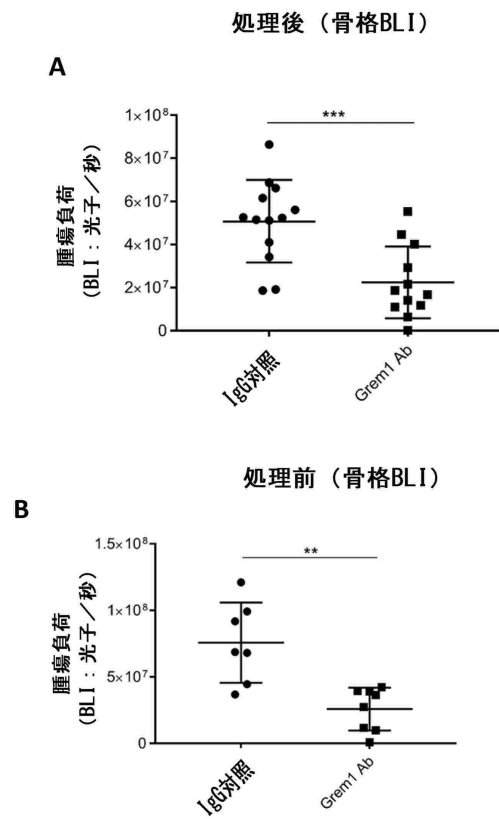
【図 3 2】



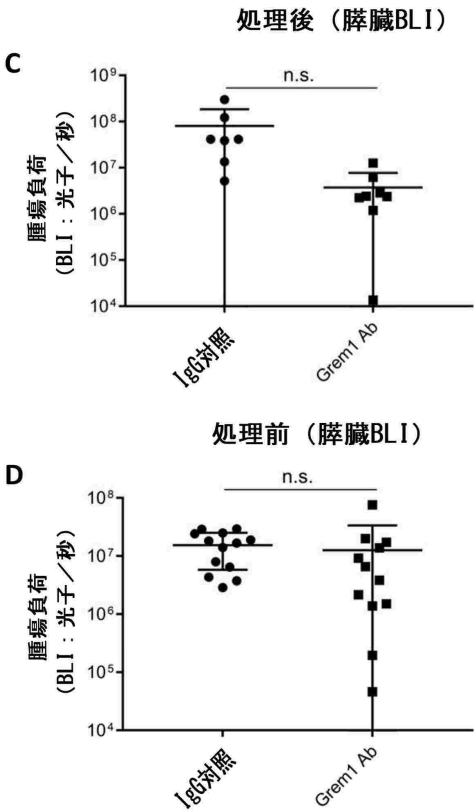
B



【図 3 3 - 1】



【図 3 3 - 2】



10

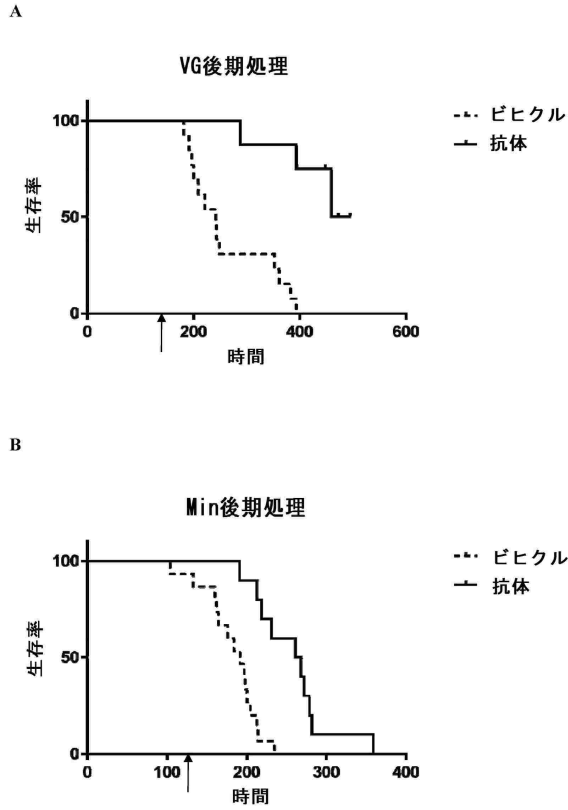
20

30

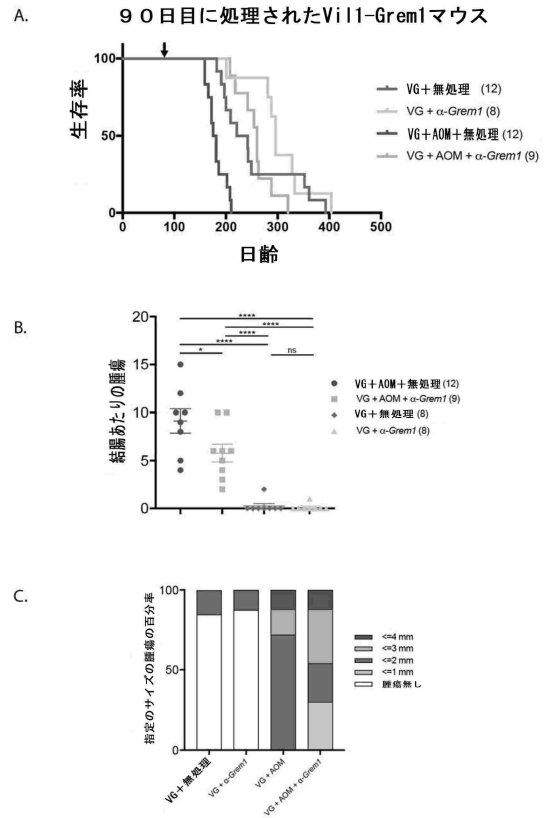
40

50

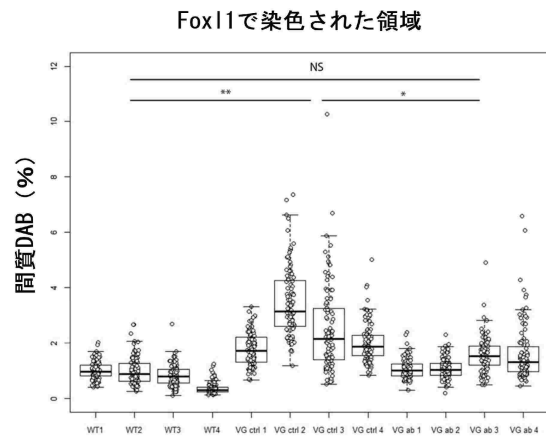
【図 3 4】



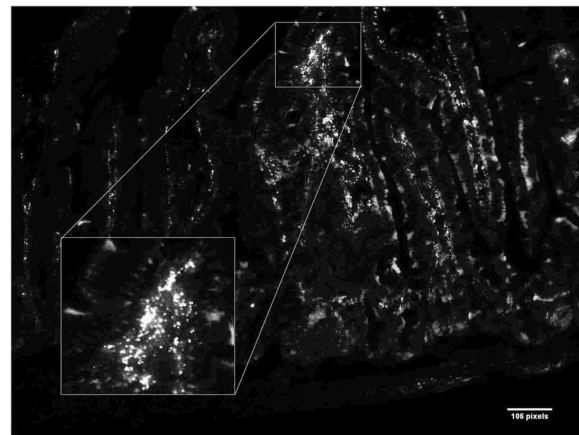
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



10

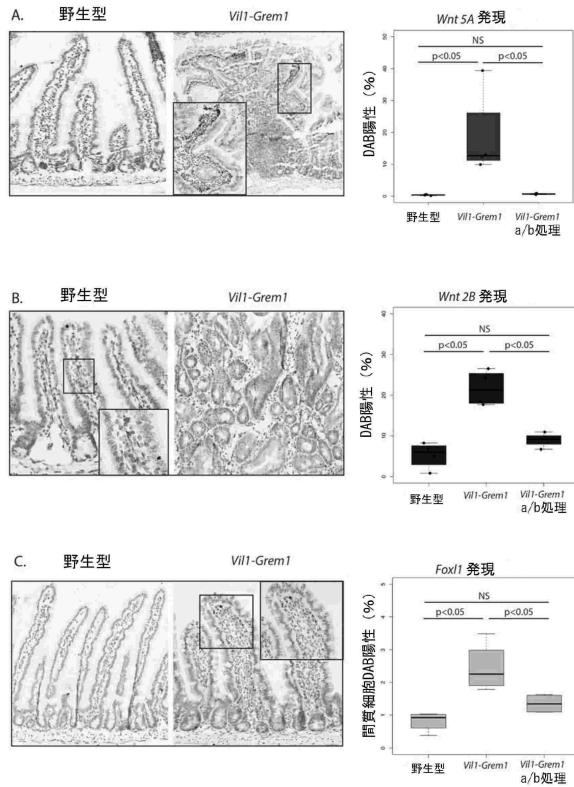
20

30

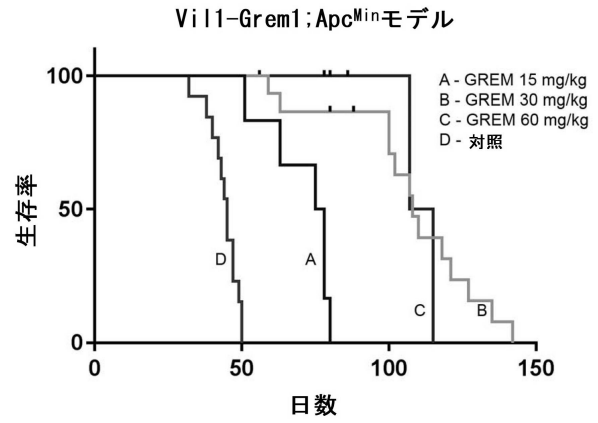
40

50

【図 38】



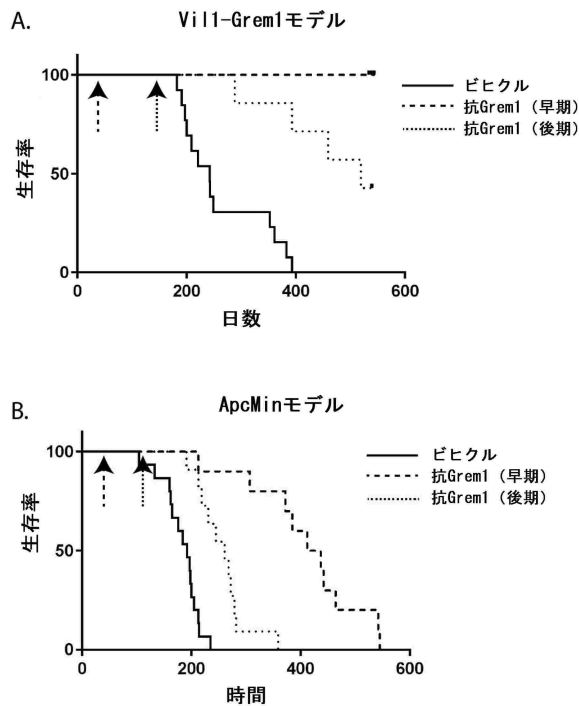
【図 39】



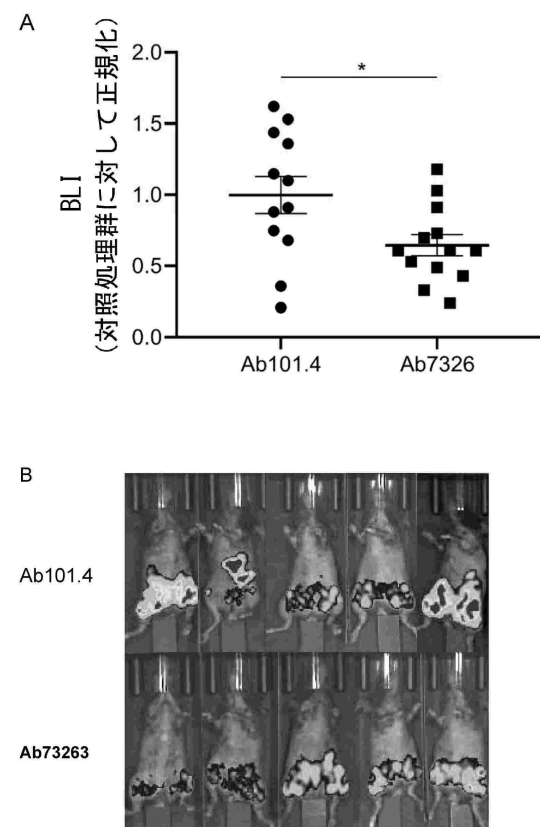
10

20

【図 40】



【図 41】

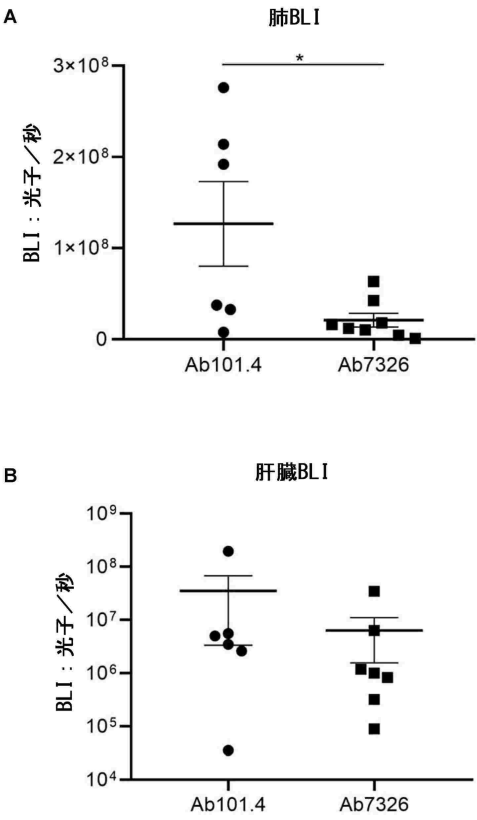


30

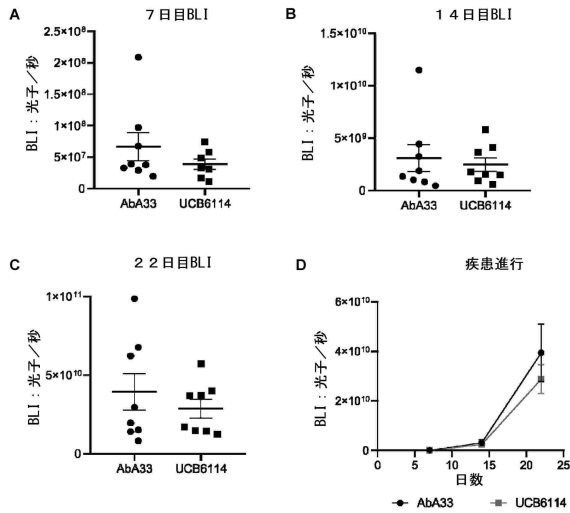
40

50

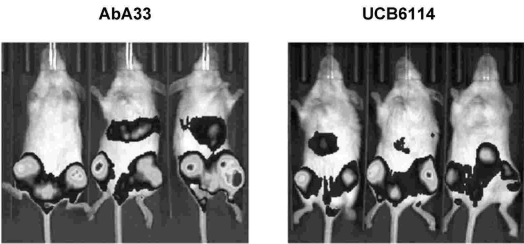
【図 4 2】



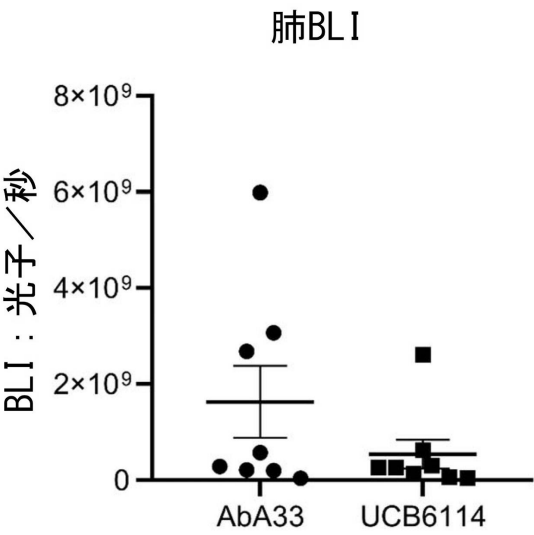
【図 4 3】



【図 4 4】



【図 4 5】



10

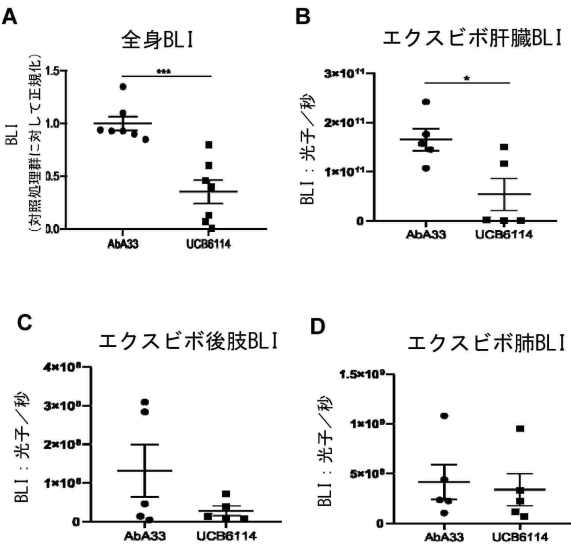
20

30

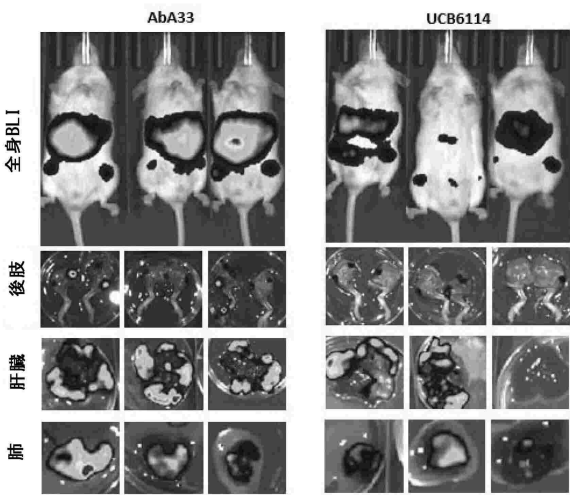
40

50

【図 4 6】



【図 4 7】



10

【配列表】

0007565219000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)

F I

A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 2 1
C 0 7 K 16/18

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 デイヴィス、ギャレス チャールズ グリンデュア

イギリス国、エスエル1 3ダブリュイーー バークシャー スラウ、バス ロード 208、ユーシー
ビー セルテック、アイピーディー内

(72)発明者 リーダム、シモン

イギリス国、オーエックス3 7ビーエヌ オックスフォードシャー オックスフォード、ルーズヴ
ェルト ドライヴ、ウェルカム トラスト センター フォー ヒューマン ジェネティクス内

(72)発明者 ザネッティーノ、アンドリュウ

オーストラリア国、5089 サウス オーストラリア、ハイブリー、ドメイン コモンズ 6

(72)発明者 クラーク、キンバリー

オーストラリア国、5043 サウス オーストラリア、アスコット パーク、オードリー ストリ
ート 1/18

(72)発明者 ヒューイット、ダンカン

オーストラリア国、5031 サウス オーストラリア、マイル エンド、デアビン ストリート 9

(72)発明者 パナゴプロス、ヴァシリオス

オーストラリア国、5038 サウス オーストラリア、ブラインプトン

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0041757 (US, A1)

特表2016-519650 (JP, A)

特表2015-512894 (JP, A)

特許第7097364 (JP, B2)

SNEDDON J. B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2006年, Vol.103 No.40, pp.14842-1
4847

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 16/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)
U n i P r o t / G e n e S e q