

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-529371

(P2019-529371A)

(43) 公表日 令和1年10月17日 (2019. 10. 17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395 Z N A D	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 9/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 9/12 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 9/12	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 11/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-511517 (P2019-511517)	(71) 出願人	597160510
(86) (22) 出願日	平成29年8月23日 (2017. 8. 23)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成31年3月22日 (2019. 3. 22)		・インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/048137		REGENERON PHARMACEU
(87) 国際公開番号	W02018/044640		TICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成30年3月8日 (2018. 3. 8)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(31) 優先権主張番号	62/380, 562		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
(32) 優先日	平成28年8月29日 (2016. 8. 29)		・ミル・リバー・ロード777番
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肺動脈性肺高血圧を処置するための抗グレムリン-1 (GREM1) 抗体およびその使用の方法

## (57) 【要約】

本発明は、抗グレムリン-1 (GREM1) 抗体およびその抗原結合性断片、ならびに肺動脈性肺高血圧 (PAH) を有する対象を処置するためのそのような抗体またはその抗原結合性断片の使用の方法を提供する。肺動脈性肺高血圧 (PAH) を有する対象を処置する方法であって、対象に、治療有効量の抗グレムリン-1 (GREM1) 抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含み、対象への抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与の治療的効果が、対象における肺動脈の肥厚を阻害すること、対象における一回拍出量を増加させること、対象における右心室の心拍出量を増加させること、および対象の生存期間を延長し、それによって、PAHを有する対象を処置することからなる群から選択される、方法が、開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

肺動脈性肺高血圧（PAH）を有する対象を処置する方法であって、  
 前記対象に、治療有効量の抗グレムリン - 1（GREM1）抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含み、  
 前記対象への前記抗 GREM1 抗体またはその抗原結合性断片の投与の治療的効果が、  
 前記対象における肺動脈の肥厚を阻害すること、  
 前記対象における一回拍出量を増加させること、  
 前記対象における右心室の心拍出量を増加させること、および  
 前記対象の生存期間を延長し、それによって、前記 PAH を有する対象を処置すること  
 からなる群から選択される、方法。

10

## 【請求項 2】

前記対象が、ヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記対象が、グループ I（WHO）の PAH を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記対象に、少なくとも 1 つの追加の治療剤を投与することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記治療剤が、抗凝血剤、利尿剤、強心性配糖体、カルシウムチャネル遮断剤、血管拡張剤、プロスタサイクリン類似体、内皮アンタゴニスト、ホスホジエステラーゼ阻害剤、エンドペプチダーゼ阻害剤、脂質降下剤、およびトロンボキサン阻害剤からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、GREM1 の、骨形成タンパク質 - 2（BMP2）、BMP4、BMP7、またはヘパリンのうちの 1 つへの結合を遮断する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、  
 （a）表面プラズモン共鳴によって測定される場合、37 において、約 275 nM よりも低い結合解離平衡定数（ $K_D$ ）で、GREM1 に結合すること、  
 （b）表面プラズモン共鳴によって測定される場合、37 において、約 3 分を上回る解離半減期（ $t_{1/2}$ ）で、GREM1 に結合すること、  
 （c）表面プラズモン共鳴によって測定される場合、25 において、約 280 nM よりも低い  $K_D$  で、GREM1 に結合すること、  
 （d）表面プラズモン共鳴によって測定される場合、25 において、約 2 分を上回る  $t_{1/2}$  で、GREM1 に結合すること、  
 （e）25 での競合 ELISA アッセイにおいて測定される場合、約 1.9 nM よりも低い  $IC_{50}$  で、GREM1 の、BMP4 への結合を遮断すること、  
 （f）GREM1 によって媒介される BMP シグナル伝達の阻害を遮断し、細胞分化を促進すること、および  
 （g）GREM1 のヘパリンへの結合を遮断すること  
 からなる群から選択される 1 つまたは複数の特性を呈する、請求項 1 に記載の方法。

30

40

## 【請求項 8】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、GREM1 への特異的結合に関して、重鎖可変領域（HCVR）の相補性決定領域（CDR）を含む抗体またはその抗原結合性断片と競合し、前記 HCVR が、配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からな

50

る群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、GREM1 への特異的結合に関して、軽鎖可変領域 (LCVR) の CDR を含む抗体またはその抗原結合性断片と競合し、前記 LCVR が、配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からなる群から選択される前記重鎖可変領域 (HCVR) 配列のうちのいずれか 1 つ内に含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 (CDR) (HC DR 1、HC DR 2、および HC DR 3)、ならびに配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択される前記軽鎖可変領域 (LCVR) 配列のうちのいずれか 1 つ内に含まれる 3 つの軽鎖 CDR (LC DR 1、LC DR 2、および LC DR 3) を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCVR を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCVR を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、(a) 配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCVR、ならびに (b) 配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCVR を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、

(a) 配列番号 4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340、356、372、388、404、420、436、452、468、484、500、516、532、548、564、および 580 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR1 ドメイン、

(b) 配列番号 6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342、358、374、390、406、422、438、454、470、486、502、518、534、550、566、および 582 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR2 ドメイン、

(c) 配列番号 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344、360、376、392、408、424、440、456、472、488、504、520、536、552、568、および 584 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR3 ドメイン、

(d) 配列番号 12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348、364、380、396、412、428、444、460、476、492、508、524、540、556、572、および 588 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR1 ドメイン、

(e) 配列番号 14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350、366、382、398、414、430、446、462、478、494、510、526、542、558、574、および 590 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR2 ドメイン、ならびに / または

(f) 配列番号 16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352、368、384、400、416、432、448、464、480、496、512、528、544、560、576、および 592 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR3 ドメインを含む、請求項 10 に記載の方法。

#### 【請求項 15】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154、162 / 170、178 / 186、194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 266、274 / 282、290 / 298、306 / 314、322 / 330、338 / 346、354 / 362、370 / 378、386 / 394、402 / 410、418 / 426、434 / 442、450 / 458、466 / 474、482 / 490、498 / 506、514 / 522、530 / 538、546 / 554、562 / 570、および 578 / 586 からなる群から選択される HCV R / LCVR アミノ酸配列ペアを含む、請求項 10 に記載の方法。

#### 【請求項 16】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、重鎖可変領域 (HCV R) の相補性決定領域 (CDR) および軽鎖可変領域 (LCVR) の CDR を含む抗体または抗原結合性断片と同じ、GREM1 上のエピトープに結合し、前記 HCV R が、配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 LCVR が、配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314

10

20

30

40

50

、 3 3 0、 3 4 6、 3 6 2、 3 7 8、 3 9 4、 4 1 0、 4 2 6、 4 4 2、 4 5 8、 4 7 4、 4 9 0、 5 0 6、 5 2 2、 5 3 8、 5 5 4、 5 7 0、 および 5 8 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願

本出願は、2016年8月29日に提出された米国仮特許出願番号第62/380,562号に基づく優先権の利益を主張しており、その全体の内容は、参考として本明細書中に本明細書によって援用される。

【 0 0 0 2 】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、この配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2017年8月10日に作成された前記ASCIIのコピーは、118003\_\_28820\_\_SL.txtという名称であり、サイズが195,927バイトである。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

肺動脈性肺高血圧(PAH)は、肺動脈圧の持続的な増加により肺大動脈および肺小動脈の両方が損傷されることによって特徴付けられる進行性障害である。PAHは、血行動態的には、収縮期肺動脈圧が30mmHgよりも高いか、または平均肺動脈圧の評価が25mmHgよりも高く、肺毛細血管または左心房圧が、15mmHgまたはそれよりも低いとして、定義される。たとえば、Zaimanら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.、33巻：425～31頁(2005年)を参照されたい。PAHにおける持続的な血管狭窄は、構造モデリングをもたらし、その際に、肺血管の平滑筋細胞および内皮細胞が、正常な収縮する表現型から、細胞成長およびマトリックス堆積をもたらす合成表現型への表現型転換を受ける。最も小さな血管の壁部が肥厚すると、血液と肺との間で酸素および二酸化炭素を正常に運ぶ能力が低下し、やがて、肺高血圧により、肺動脈の肥厚および血液が流れる経路の狭窄が生じる。最終的に、血管平滑筋細胞および内皮細胞の増殖により、肺脈管構造の内腔の消滅を伴う血管のリモデリングが生じる。肺高血圧を有する患者から得られた組織サンプルの組織検査では、特に、直径が100μmに満たない血管について、内膜肥厚、ならびに平滑筋細胞の肥大が、示される。これにより、血液が減少した内腔領域を通して押し出されるため、肺動脈圧における進行的な上昇が引き起こされる。結果として、心臓の右側は、これを補うためにより激しく働き、その負担の増加により、右心室が大きくなり、肥厚することになる。大きくなった右心室により、肺塞栓の危険性が生じるが、これは、血液が、心室および脚部にとどまりやすくなるためである。たまたま血液に凝塊がプールされると、最終的にはそれが移動し、肺に留まり得る。最終的には、右心室にさらなる負荷がかかることにより、心不全が生じ、これらの患者に早期死亡が引き起こされる。

【 0 0 0 4 】

PAHを有する対象の処置のための標準的な治療薬は、主として、血行動態学的で、血管の調子に影響を及ぼすものであり、たとえば、プロスタサイクリン類似体、エンドセリン受容体アンタゴニスト、ホスホジエステラーゼ阻害剤、および可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化剤/刺激剤が挙げられ、これらは、症状の緩和をもたらす、予後を改善する。しかしながら、これらの治療薬は、十分ではなく、PAHを有する患者に障害のない長期生存をもたらすような、肺脈管構造の構造的かつ機能的な完全性を再構築するものではない。

【 0 0 0 5 】

たとえば、形質転換増殖因子-ベータ(TGF-β)経路および/または骨形成タンパ

10

20

30

40

50

ク質 (BMP) 経路など、PAHの発症およびPAHにおける構造的リモデリングをもたらし得る細胞経路が多数存在する。TGF- $\beta$  受容体スーパーファミリータンパク質 BMPR2、ACVRL1、もしくはENG、またはシグナル伝達因子SMAD9をコードする遺伝子における変異が、遺伝的形態のPAHに対する易罹患性を増加させるという発見によって、TGF- $\beta$  スーパーファミリーのメンバーのPAHにおける病原因的な役割が、示唆されている。また、PAH患者が、BMPR2の発現/シグナル伝達が低減されていること (Atkinsonら、Circulation、105巻(14号): 1672~1678頁、2002年; Alastaloら、J. Clin. Invest.、121巻: 3735~3746頁、2011年)、BMPR2の喪失がある場合、肺動脈平滑筋細胞のTGF- $\beta$  の活性化が成長阻害に対して感受性でないこと (Morrellら、Circulation、104巻(7号): 790~795頁、2001年; Yangら、Circ. Res.、102巻、1212~1221頁、2008年)、およびBMPR2のBMP9活性化が、前臨床PAHを好転させること (Longら、Nat Med.、21巻: 777~785頁、2015年) も示されている。BMPに対する生物学的応答は、BMPと直接的に会合し、受容体結合を阻害することができるBMPアンタゴニストによって負に制御される。

#### 【0006】

BMPと直接的に会合し、受容体結合およびBMPシグナル伝達を阻害することができる、1つのそのようなアンタゴニストは、システインノットスーパーファミリーのメンバーであるヒトグレムリン-1 (GREM1) であり (Hsu, D.R.ら、1998年、Mol. Cell、1巻: 673~683頁)、これは、BMP2、BMP4、およびBMP7に高い親和性で結合する (Yanagitaら、(2005年)、Cytokine Growth Factor Rev、16巻: 309~317頁)。GREM1は、低酸素状態の際、マウスの肺内の小血管の壁部において、上昇していることが見出されている。グレムリン1のハプロ不全は、BMPシグナル伝達を増大させ、血管リモデリングを阻害することによる血管抵抗の低減と関連付けられている (Cahillら、(2012年)、Circulation、125巻(7号): 920~30頁)。加えて、GREM1の発現は、低酸素状態下において、ヒト肺内皮細胞で増加し (Costelloら、(2008年)、Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol、295巻(2号): L272~84頁)、GREM1は、特発性および遺伝性のPAH患者の肺のリモデリングされた血管に発現される (Cahillら、(2012年)、Circulation、125巻(7号): 920~30頁)。

しかしながら、PAHの治療法におけるいかなる進歩があったにせよ、現在のところ、この死に至る疾患の治療の見込みはなく、患者の大半で、右心室不全の進行が継続される。したがって、GREM1を阻害することによって、TGF- $\beta$  のシグナル伝達を減少させ、BMPシグナル伝達を増加させるために、TGF- $\beta$  およびBMP経路によって制御される血管リモデリングを標的とする、臨床上有益な方法および組成物が、当該技術分野において必要とされている。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0007】

- 【非特許文献1】Zaimanら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.、33巻: 425~31頁(2005年)
- 【非特許文献2】Atkinsonら、Circulation.、105巻(14号): 1672~1678頁、2002年
- 【非特許文献3】Alastaloら、J. Clin. Invest.、121巻: 3735~3746頁、2011年
- 【非特許文献4】Morrellら、Circulation.、104巻(7号): 790~795頁、2001年
- 【非特許文献5】Yangら、Circ. Res.、102巻、1212~1221頁、2008年
- 【非特許文献6】Longら、Nat Med.、21巻: 777~785頁、2015年
- 【非特許文献7】Hsu, D.R.ら、1998年、Mol. Cell、1巻: 673~683頁

10

20

30

40

50

【非特許文献 8】Yanagitaら、(2005 年)、Cytokine Growth Factor Rev、16 巻：309～317 頁

【非特許文献 9】Cahillら、(2012 年)、Circulation、125 巻(7 号)：920～30 頁

【非特許文献 10】Costelloら、(2008 年)、Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol、295 巻(2 号)：L272～84 頁

【非特許文献 11】Cahillら、(2012 年)、Circulation、125 巻(7 号)：920～30 頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0008】

本発明は、少なくとも部分的に、抗グレムリン-1(GREM1)抗体またはその抗原結合性断片が、肺動脈性肺高血圧の動物モデルにおいて、血管リモデリングの作用を緩和するのに有効であるという発見に基づく。

【0009】

したがって、一態様では、本発明は、肺動脈性肺高血圧(PAH)を有する対象を処置するための方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含み、ここで、対象への抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与は、対象における肺動脈の肥厚を阻害し、それによって、PAHを有する対象を処置する。

20

【0010】

別の態様では、本発明は、肺動脈性肺高血圧(PAH)を有する対象を処置する方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含み、ここで、対象への抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与は、対象における一回拍出量を増加させ、それによって、PAHを有する対象を処置する。

【0011】

さらに別の態様では、本発明は、肺動脈性肺高血圧(PAH)を有する対象を処置する方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含み、ここで、対象への抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与は、対象における右心室の心拍出量を増加させ、それによって、PAHを有する対象を処置する。

30

【0012】

別の態様では、本発明は、肺動脈性肺高血圧(PAH)を有する対象を処置する方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含み、ここで、対象への抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与は、対象の生存期間を延長させ、それによって、PAHを有する対象を処置する。

【0013】

一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0014】

一実施形態では、対象は、グループI(WHO)のPAHを有する。

40

【0015】

本発明の方法は、対象に、少なくとも1つの追加の治療剤、たとえば、抗凝固剤、利尿剤、強心性配糖体、カルシウムチャネル遮断剤、血管拡張剤、プロスタサイクリン類似体、内皮アンタゴニスト、ホスホジエステラーゼ阻害剤、エンドペプチダーゼ阻害剤、脂質降下剤、および/またはトロポキサン阻害剤を投与することをさらに含み得る。

【0016】

本発明において使用するための抗体またはその抗原結合性断片は、GREM1の、骨形成タンパク質-2(BMP2)、BMP4、BMP7、またはヘパリンのうちの1つへの結合を遮断し得る。

50

## 【0017】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、  
 (a) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、37 において、約275 nMよりも低い結合解離平衡定数 ( $K_D$ ) で、GREM1に結合すること、  
 (b) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、37 において、約3分を上回る解離半減期 ( $t_{1/2}$ ) で、GREM1に結合すること、  
 (c) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、25 において、約280 nMよりも低い  $K_D$  で、GREM1に結合すること、  
 (d) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、25 において、約2分を上回る  $t_{1/2}$  で、GREM1に結合すること、  
 (e) 25 での競合ELISAアッセイにおいて測定される場合、約1.9 nMよりも低い  $IC_{50}$  で、GREM1の、BMP4への結合を遮断すること、  
 (f) GREM1によって媒介されるBMPシグナル伝達の阻害を遮断し、細胞分化を促進すること、および  
 (g) GREM1のヘパリンへの結合を遮断すること  
 からなる群から選択される1つまたは複数の特性を呈する。

10

## 【0018】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、GREM1への特異的結合に関して、重鎖可変領域 (HCVR) の相補性決定領域 (CDR) を含む抗体またはその抗原結合性断片と競合し、HCVRは、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

20

## 【0019】

さらに別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、GREM1への特異的結合に関して、軽鎖可変領域 (LCVR) のCDRを含む抗体またはその抗原結合性断片と競合し、LCVRは、配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

30

## 【0020】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択される重鎖可変領域 (HCVR) 配列のうちのいずれか1つ内に含まれる3つの重鎖相補性決定領域 (CDR) (HCDR1、HCDR2、およびHCDR3)、ならびに配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択される軽鎖可変領域 (LCVR) 配列のうちのいずれか1つ内に含まれる3つの軽鎖CDR (LCDR1、LCDR2、およびLCDR3) を含み、たとえば、抗体もしくはその抗原結合性断片は、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む、か

40

50



つ／または抗体もしくはその抗原結合性断片は、配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCVR を含む、かつ／または抗体もしくはその抗原結合性断片は、(a) 配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCVR、ならびに (b) 配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCVR を含む。

10

# 【0021】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340、356、372、388、404、420、436、452、468、484、500、516、532、548、564、および 580 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HC DR 1 ドメイン、

20

(b) 配列番号 6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342、358、374、390、406、422、438、454、470、486、502、518、534、550、566、および 582 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HC DR 2 ドメイン、

(c) 配列番号 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344、360、376、392、408、424、440、456、472、488、504、520、536、552、568、および 584 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HC DR 3 ドメイン、

30

(d) 配列番号 12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348、364、380、396、412、428、444、460、476、492、508、524、540、556、572、および 588 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LC DR 1 ドメイン、

(e) 配列番号 14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350、366、382、398、414、430、446、462、478、494、510、526、542、558、574、および 590 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LC DR 2 ドメイン、ならびに／または

40

(f) 配列番号 16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352、368、384、400、416、432、448、464、480、496、512、528、544、560、576、および 592 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LC DR 3 ドメインを含む。

# 【0022】

さらに別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 1

50

22、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298、306/314、322/330、338/346、354/362、370/378、386/394、402/410、418/426、434/442、450/458、466/474、482/490、498/506、514/522、530/538、546/554、562/570、および578/586からなる群から選択されるHCV R/LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

#### 【0023】

さらに別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、重鎖可変領域(HCV R)の相補性決定領域(CDR)および軽鎖可変領域(LCVR)のCDRを含む抗体または抗原結合性断片と同じ、GREM1上のエピトープに結合し、HCV Rは、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、LCVRは、配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

#### 【0024】

他の実施形態では、本発明において使用するのに好適な抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトGREM1に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片であり、ここで、抗体またはその断片は、以下の特徴のうちの1つまたは複数呈する：(i)配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCV Rを含むこと、(ii)配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCVRを含むこと、(iii)配列番号8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344、360、376、392、408、424、440、456、472、488、504、520、536、552、568、および584からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR3ドメイン、ならびに配列番号16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352、368、384、400、416、432、448、464、480、496、512、528、544、560、576、および592からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR3ドメインを含むこと、(iv)配列番号4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、18

0、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340、356、372、388、404、420、436、452、468、484、500、516、532、548、564、および580からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR1ドメイン、配列番号6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342、358、374、390、406、422、438、454、470、486、502、518、534、550、566、および582からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR2ドメイン、配列番号12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348、364、380、396、412、428、444、460、476、492、508、524、540、556、572、および588からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR1ドメイン、ならびに配列番号14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350、366、382、398、414、430、446、462、478、494、510、526、542、558、574、および590からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR2ドメインを含むこと、(v)  $10^{-7}$  またはそれよりも低いKDで、GREM1に結合すること、(vi) GREM1の、BMP2、BMP4、またはBMP7のうちの1つへの結合を遮断すること、(vii) GREM1によるBMPシグナル伝達の阻害を遮断し、細胞分化を促進すること、ならびに(viii) GREM1の、ヘパリンへの結合を遮断すること。

10

20

30

40

50

#### 【0025】

一実施形態では、本発明の方法において使用するのに好適な単離されたヒト抗体またはその抗原結合性断片は、表面プラズモン共鳴によって測定される場合、 $10^{-7}$  Mまたはそれよりも低いKDで、GREM1に結合する。

#### 【0026】

一実施形態では、本発明の方法において使用するための、GREM1に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択される重鎖可変領域(HCVR)配列のうちのいずれか1つ内に含まれる3つの重鎖相補性決定領域(CDR)(HCDR1、HCDR2、およびHCDR3)、ならびに配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択される軽鎖可変領域(LCVR)配列のうちのいずれか1つ内に含まれる3つの軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2、およびLCDR3)を含む。

#### 【0027】

一実施形態では、本発明の方法は、GREM1に結合し、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202

、 2 1 0 / 2 1 8、 2 2 6 / 2 3 4、 2 4 2 / 2 5 0、 2 5 8 / 2 6 6、 2 7 4 / 2 8 2  
 、 2 9 0 / 2 9 8、 3 0 6 / 3 1 4、 3 2 2 / 3 3 0、 3 3 8 / 3 4 6、 3 5 4 / 3 6 2  
 、 3 7 0 / 3 7 8、 3 8 6 / 3 9 4、 4 0 2 / 4 1 0、 4 1 8 / 4 2 6、 4 3 4 / 4 4 2  
 、 4 5 0 / 4 5 8、 4 6 6 / 4 7 4、 4 8 2 / 4 9 0、 4 9 8 / 5 0 6、 5 1 4 / 5 2、  
 5 3 0 / 5 3 8、 5 4 6 / 5 5 4、 5 6 2 / 5 7 0、 および 5 7 8 / 5 8 6 からなる群か  
 ら選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む、単離されたヒト抗体またはそ  
 の抗原結合性断片の使用を含む。

# 【 0 0 2 8 】

別の実施形態では、本発明の方法は、 G R E M 1 に結合する単離されたヒト抗体または  
 その抗原結合性断片の使用を含み、ここで、この抗体またはその断片は、以下の特徴のう  
 ちの 1 つまたは複数を呈する： ( i ) 配列番号 2、 1 8、 3 4、 5 0、 6 6、 8 2、 9 8  
 、 1 1 4、 1 3 0、 1 4 6、 1 6 2、 1 7 8、 1 9 4、 2 1 0、 2 2 6、 2 4 2、 2 5 8  
 、 2 7 4、 2 9 0、 3 0 6、 3 2 2、 3 3 8、 3 5 4、 3 7 0、 3 8 6、 4 0 2、 4 1 8  
 、 4 3 4、 4 5 0、 4 6 6、 4 8 2、 4 9 8、 5 1 4、 5 3 0、 5 4 6、 5 6 2、 および  
 5 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9  
 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に  
 類似の配列を有する H C V R を含むこと、 ( i i ) 配列番号 1 0、 2 6、 4 2、 5 8、 7  
 4、 9 0、 1 0 6、 1 2 2、 1 3 8、 1 5 4、 1 7 0、 1 8 6、 2 0 2、 2 1 8、 2 3 4  
 、 2 5 0、 2 6 6、 2 8 2、 2 9 8、 3 1 4、 3 3 0、 3 4 6、 3 6 2、 3 7 8、 3 9 4  
 、 4 1 0、 4 2 6、 4 4 2、 4 5 8、 4 7 4、 4 9 0、 5 0 6、 5 2 2、 5 3 8、 5 5 4  
 、 5 7 0、 および 5 8 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 9 0  
 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有  
 するその実質的に類似の配列を有する L C V R を含むこと、 ( i i i ) 配列番号 8、 2 4  
 、 4 0、 5 6、 7 2、 8 8、 1 0 4、 1 2 0、 1 3 6、 1 5 2、 1 6 8、 1 8 4、 2 0 0  
 、 2 1 6、 2 3 2、 2 4 8、 2 6 4、 2 8 0、 2 9 6、 3 1 2、 3 2 8、 3 4 4、 3 6 0  
 、 3 7 6、 3 9 2、 4 0 8、 4 2 4、 4 4 0、 4 5 6、 4 7 2、 4 8 8、 5 0 4、 5 2 0  
 、 5 3 6、 5 5 2、 5 6 8、 および 5 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、また  
 は少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 %  
 の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 3 ドメイン、ならびに配  
 列番号 1 6、 3 2、 4 8、 6 4、 8 0、 9 6、 1 1 2、 1 2 8、 1 4 4、 1 6 0、 1 7 6  
 、 1 9 2、 2 0 8、 2 2 4、 2 4 0、 2 5 6、 2 7 2、 2 8 8、 3 0 4、 3 2 0、 3 3 6  
 、 3 5 2、 3 6 8、 3 8 4、 4 0 0、 4 1 6、 4 3 2、 4 4 8、 4 6 4、 4 8 0、 4 9 6  
 、 5 1 2、 5 2 8、 5 4 4、 5 6 0、 5 7 6、 および 5 9 2 からなる群から選択されるア  
 ミノ酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは  
 少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 3 ドメ  
 インを含むこと、 ( i v ) 配列番号 4、 2 0、 3 6、 5 2、 6 8、 8 4、 1 0 0、 1 1 6  
 、 1 3 2、 1 4 8、 1 6 4、 1 8 0、 1 9 6、 2 1 2、 2 2 8、 2 4 4、 2 6 0、 2 7 6  
 、 2 9 2、 3 0 8、 3 2 4、 3 4 0、 3 5 6、 3 7 2、 3 8 8、 4 0 4、 4 2 0、 4 3 6  
 、 4 5 2、 4 6 8、 4 8 4、 5 0 0、 5 1 6、 5 3 2、 5 4 8、 5 6 4、 および 5 8 0 か  
 らなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少  
 なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配  
 列を有する H C D R 1 ドメイン、配列番号 6、 2 2、 3 8、 5 4、 7 0、 8 6、 1 0 2、  
 1 1 8、 1 3 4、 1 5 0、 1 6 6、 1 8 2、 1 9 8、 2 1 4、 2 3 0、 2 4 6、 2 6 2、  
 2 7 8、 2 9 4、 3 1 0、 3 2 6、 3 4 2、 3 5 8、 3 7 4、 3 9 0、 4 0 6、 4 2 2、  
 4 3 8、 4 5 4、 4 7 0、 4 8 6、 5 0 2、 5 1 8、 5 3 4、 5 5 0、 5 6 6、 および 5  
 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5  
 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類  
 似の配列を有する H C D R 2 ドメイン、配列番号 1 2、 2 8、 4 4、 6 0、 7 6、 9 2、  
 1 0 8、 1 2 4、 1 4 0、 1 5 6、 1 7 2、 1 8 8、 2 0 4、 2 2 0、 2 3 6、 2 5 2、  
 2 6 8、 2 8 4、 3 0 0、 3 1 6、 3 3 2、 3 4 8、 3 6 4、 3 8 0、 3 9 6、 4 1 2、

10

20

30

40

50

4 2 8、4 4 4、4 6 0、4 7 6、4 9 2、5 0 8、5 2 4、5 4 0、5 5 6、5 7 2、  
および 5 8 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なく  
とも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実  
質的に類似の配列を有する L C D R 1 ドメイン、ならびに配列番号 1 4、3 0、4 6、6  
2、7 8、9 4、1 1 0、1 2 6、1 4 2、1 5 8、1 7 4、1 9 0、2 0 6、2 2 2、  
2 3 8、2 5 4、2 7 0、2 8 6、3 0 2、3 1 8、3 3 4、3 5 0、3 6 6、3 8 2、  
3 9 8、4 1 4、4 3 0、4 4 6、4 6 2、4 7 8、4 9 4、5 1 0、5 2 6、5 4 2、  
5 5 8、5 7 4、および 5 9 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なく  
とも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一  
性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 2 ドメインを含むこと、( v ) 表面  
プラズモン共鳴によって測定される場合、 $10^{-7}$  M またはそれよりも低い K D で、G R  
E M 1 に結合すること。

10

**【 0 0 2 9 】**

さらに別の実施形態では、本発明の方法は、G R E M 1 に結合し、重鎖可変領域 ( H C  
V R ) の相補性決定領域 ( C D R ) および軽鎖可変領域 ( L C V R ) の C D R を含む、単  
離されたヒト抗体またはその抗原結合性断片の使用を含み、ここで、H C V R は、配列番  
号 2、1 8、3 4、5 0、6 6、8 2、9 8、1 1 4、1 3 0、1 4 6、1 6 2、1 7 8  
、1 9 4、2 1 0、2 2 6、2 4 2、2 5 8、2 7 4、2 9 0、3 0 6、3 2 2、3 3 8  
、3 5 4、3 7 0、3 8 6、4 0 2、4 1 8、4 3 4、4 5 0、4 6 6、4 8 2、4 9 8  
、5 1 4、5 3 0、5 4 6、5 6 2、および 5 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配  
列を有し、L C V R は、配列番号 1 0、2 6、4 2、5 8、7 4、9 0、1 0 6、1 2 2  
、1 3 8、1 5 4、1 7 0、1 8 6、2 0 2、2 1 8、2 3 4、2 5 0、2 6 6、2 8 2  
、2 9 8、3 1 4、3 3 0、3 4 6、3 6 2、3 7 8、3 9 4、4 1 0、4 2 6、4 4 2  
、4 5 8、4 7 4、4 9 0、5 0 6、5 2 2、5 3 8、5 5 4、5 7 0、および 5 8 6 か  
らなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

20

**【 0 0 3 0 】**

一実施形態では、本発明は、重鎖可変領域 ( H C V R ) の C D R および軽鎖可変領域 ( L C V R ) の C D R を含む抗体または抗原結合性断片と同じ、ヒト G R E M 1 上のエピト  
ープに結合する、単離された抗体またはその抗原結合性断片の使用を含む方法であって、  
H C V R が、配列番号 2、1 8、3 4、5 0、6 6、8 2、9 8、1 1 4、1 3 0、1 4  
6、1 6 2、1 7 8、1 9 4、2 1 0、2 2 6、2 4 2、2 5 8、2 7 4、2 9 0、3 0  
6、3 2 2、3 3 8、3 5 4、3 7 0、3 8 6、4 0 2、4 1 8、4 3 4、4 5 0、4 6  
6、4 8 2、4 9 8、5 1 4、5 3 0、5 4 6、5 6 2、および 5 7 8 からなる群から選  
択されるアミノ酸配列を有し、L C V R が、配列番号 1 0、2 6、4 2、5 8、7 4、9  
0、1 0 6、1 2 2、1 3 8、1 5 4、1 7 0、1 8 6、2 0 2、2 1 8、2 3 4、2 5  
0、2 6 6、2 8 2、2 9 8、3 1 4、3 3 0、3 4 6、3 6 2、3 7 8、3 9 4、4 1  
0、4 2 6、4 4 2、4 5 8、4 7 4、4 9 0、5 0 6、5 2 2、5 3 8、5 5 4、5 7  
0、および 5 8 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、方法を提供する。

30

**【 0 0 3 1 】**

一実施形態では、本発明の方法は、ヒト G R E M 1 の、B M P 2、B M P 4、B M P 7  
、またはヘパリンのうちのいずれか 1 つへの結合を遮断し、重鎖可変領域 ( H C V R ) の  
相補性決定領域 ( C D R )、および軽鎖可変領域 ( L C V R ) の C D R を含む、単離され  
たヒト抗体またはその抗原結合性断片の使用を含み、ここで、H C V R は、配列番号 2、  
1 8、3 4、5 0、6 6、8 2、9 8、1 1 4、1 3 0、1 4 6、1 6 2、1 7 8、1 9  
4、2 1 0、2 2 6、2 4 2、2 5 8、2 7 4、2 9 0、3 0 6、3 2 2、3 3 8、3 5  
4、3 7 0、3 8 6、4 0 2、4 1 8、4 3 4、4 5 0、4 6 6、4 8 2、4 9 8、5 1  
4、5 3 0、5 4 6、5 6 2、および 5 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有  
し、L C V R は、配列番号 1 0、2 6、4 2、5 8、7 4、9 0、1 0 6、1 2 2、1 3  
8、1 5 4、1 7 0、1 8 6、2 0 2、2 1 8、2 3 4、2 5 0、2 6 6、2 8 2、2 9  
8、3 1 4、3 3 0、3 4 6、3 6 2、3 7 8、3 9 4、4 1 0、4 2 6、4 4 2、4 5

40

50

8、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0032】

別の実施形態では、本発明は、GREM1に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片の使用を含み、ここで、この抗体またはその断片は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を呈する：(i)配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および578からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCVRを含むこと、(ii)配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および586からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCVRを含むこと、(iii)配列番号8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344、360、376、392、408、424、440、456、472、488、504、520、536、552、568、および584からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR3ドメイン、ならびに配列番号16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352、368、384、400、416、432、448、464、480、496、512、528、544、560、576、および592からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR3ドメインを含むこと、(iv)配列番号4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340、356、372、388、404、420、436、452、468、484、500、516、532、548、564、および580からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR1ドメイン、配列番号6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342、358、374、390、406、422、438、454、470、486、502、518、534、550、566、および582からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR2ドメイン、配列番号12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348、364、380、396、412、428、444、460、476、492、508、524、540、556、572、および588からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR1ドメイン、ならびに配列番号14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222

10

20

30

40

50

、 2 3 8、 2 5 4、 2 7 0、 2 8 6、 3 0 2、 3 1 8、 3 3 4、 3 5 0、 3 6 6、 3 8 2、 3 9 8、 4 1 4、 4 3 0、 4 4 6、 4 6 2、 4 7 8、 4 9 4、 5 1 0、 5 2 6、 5 4 2、 5 5 8、 5 7 4、 および 5 9 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 2 ドメインを含むこと、( v ) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、 $10^{-7}$  M またはそれよりも低い K D で、G R E M 1 に結合すること、( v i ) G R E M 1 の、B M P 2、B M P 4、または B M P 7 のうちの 1 つへの結合を遮断すること、( v i i ) G R E M 1 による B M P シグナル伝達の阻害を遮断し、細胞分化を促進すること、ならびに ( v i i i ) G R E M 1 のヘパリンへの結合を遮断すること。

10

**【 0 0 3 3 】**

別の実施形態では、本発明は、配列番号 1、1 7、3 3、4 9、6 5、8 1、9 7、1 1 3、1 2 9、1 4 5、1 6 1、1 7 7、1 9 3、2 0 9、2 2 5、2 4 1、2 5 7、2 7 3、2 8 9、3 0 5、3 2 1、3 3 7、3 5 3、3 6 9、3 8 5、4 0 1、4 1 7、4 3 3、4 4 9、4 6 5、4 8 1、4 9 7、5 1 3、5 2 9、5 4 5、5 6 1、および 5 7 7 からなる群から選択される核酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の相同性を有するその実質的に同一の配列によってコードされる H C V R を含む抗体またはその断片の使用を含む方法を提供する。

**【 0 0 3 4 】**

一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 9、2 5、4 1、5 7、7 3、8 9、1 0 5、1 2 1、1 3 7、1 5 3、1 6 9、1 8 5、2 0 1、2 1 7、2 3 3、2 4 9、2 6 5、2 8 1、2 9 7、3 1 3、3 2 9、3 4 5、3 6 1、3 7 7、3 9 3、4 0 9、4 2 5、4 4 1、4 5 7、4 7 3、4 8 9、5 0 5、5 2 1、5 3 7、5 5 3、5 6 9、および 5 8 5 からなる群から選択される核酸配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の相同性を有するその実質的に同一の配列によってコードされる L C V R をさらに含む。

20

**【 0 0 3 5 】**

一実施形態では、本発明の方法は、配列番号 7、2 3、3 9、5 5、7 1、8 7、1 0 3、1 1 9、1 3 5、1 5 1、1 6 7、1 8 3、1 9 9、2 1 5、2 3 1、2 4 7、2 6 3、2 7 9、2 9 5、3 1 1、3 2 7、3 4 3、3 5 9、3 7 5、3 9 1、4 0 7、4 2 3、4 3 9、4 5 5、4 7 1、4 8 7、5 0 3、5 1 9、5 3 5、5 5 1、5 6 7、および 5 8 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる H C D R 3 ドメイン、ならびに配列番号 1 5、3 1、4 7、6 3、7 9、9 5、1 1 1、1 2 7、1 4 3、1 5 9、1 7 5、1 9 1、2 0 7、2 2 3、2 3 9、2 5 5、2 7 1、2 8 7、3 0 3、3 1 9、3 3 5、3 5 1、3 6 7、3 8 3、3 9 9、4 1 5、4 3 1、4 4 7、4 6 3、4 7 9、4 9 5、5 1 1、5 2 7、5 4 3、5 5 9、5 7 5、および 5 9 1 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる L C D R 3 ドメインを含む抗体または抗体の抗原結合性断片の使用を含む。

30

40

**【 0 0 3 6 】**

別の実施形態では、本発明の方法は、配列番号 3、1 9、3 5、5 1、6 7、8 3、9 9、1 1 5、1 3 1、1 4 7、1 6 3、1 7 9、1 9 5、2 1 1、2 2 7、2 4 3、2 5 9、2 7 5、2 9 1、3 0 7、3 2 3、3 3 9、3 5 5、3 7 1、3 8 7、4 0 3、4 1 9、4 3 5、4 5 1、4 6 7、4 8 3、4 9 9、5 1 5、5 3 1、5 4 7、5 6 3、および 5 7 9 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる H C D R 1 ドメイン、配列番号 5、2 1、3 7、5 3、6 9、8 5、1 0 1、1 1 7、1 3 3、1 4 9、1 6 5、1 8 1、1 9 7、2 1 3

50

、 2 2 9、2 4 5、2 6 1、2 7 7、2 9 3、3 0 9、3 2 5、3 4 1、3 5 7、3 7 3  
 、 3 8 9、4 0 5、4 2 1、4 3 7、4 5 3、4 6 9、4 8 5、5 0 1、5 1 7、5 3 3  
 、 5 4 9、5 6 5、および 5 8 1 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または少  
 なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配  
 列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる H C D R 2 ドメイン、配  
 列番号 1 1、2 7、4 3、5 9、7 5、9 1、1 0 7、1 2 3、1 3 9、1 5 5、1 7 1  
 、 1 8 7、2 0 3、2 1 9、2 3 5、2 5 1、2 6 7、2 8 3、2 9 9、3 1 5、3 3 1  
 、 3 4 7、3 6 3、3 7 9、3 9 5、4 1 1、4 2 7、4 4 3、4 5 9、4 7 5、4 9 1  
 、 5 0 7、5 2 3、5 3 9、5 5 5、5 7 1、および 5 8 7 からなる群から選択されるヌ  
 クレオチド配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もし  
 くは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされ  
 る L C D R 1 ドメイン、ならびに配列番号 1 3、2 9、4 5、6 1、7 7、9 3、1 0 9  
 、 1 2 5、1 4 1、1 5 7、1 7 3、1 8 9、2 0 5、2 2 1、2 3 7、2 5 3、2 6 9  
 、 2 8 5、3 0 1、3 1 7、3 3 3、3 4 9、3 6 5、3 8 1、3 9 7、4 1 3、4 2 9  
 、 4 4 5、4 6 1、4 7 7、4 9 3、5 0 9、5 2 5、5 4 1、5 5 7、5 7 3、および  
 5 8 9 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 9 0 %、少なくと  
 も 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質  
 的に類似の配列によってコードされる L C D R 2 ドメインをさらに含む抗体またはその断  
 片の使用を含む。

10

#### 【図面の簡単な説明】

20

#### 【0037】

【図 1】図 1 A および 1 B は、肺動脈性肺高血圧の慢性低酸素マウスモデルにおいて、H  
 4 H 6 2 4 5 P の投与により、肺動脈のサイズ（断面積）および右心室の一回拍出量が、  
 正常酸素状態のレベルの付近まで回復することを示す、グラフである。図 1 A は、肺動脈  
 性肺高血圧の慢性低酸素マウスモデルにおける、肺動脈（P A）断面積（C S A）に対す  
 る、R E G N 2 4 7 7 の投与の効果を示す、グラフである。図 1 B は、肺動脈性肺高血圧  
 の慢性低酸素マウスモデルにおける、右心室の一回拍出量に対する、R E G N 2 4 7 7 の  
 投与の効果を示す、グラフである。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0038】

30

#### 発明の詳細な説明

本発明は、少なくとも部分的に、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合性断片が、肺動  
 脈性肺高血圧の動物モデルにおいて、血管リモデリングの作用を緩和するのに有効である  
 という発見に基づく。以下に詳述される説明により、G R E M 1 の活性を選択的に阻害す  
 るための抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物をどのように作製し、  
 使用するか、ならびに肺動脈性肺高血圧（P A H）を有する対象を処置するための組成物  
 、使用、および方法について開示している。

#### 【0039】

#### I. 定義

本発明をより容易に理解することができるように、ある特定の用語を、最初に定義する  
 。加えて、あるパラメーターの値または値の範囲に言及される場合は常に、言及された値  
 の近傍の値および範囲もまた、本発明の一部であることを意図すると意図されることに、  
 留意されたい。

40

#### 【0040】

「1つの（a）」および「1つの（an）」という冠詞は、1つまたは1つを上回る（す  
 なわち、少なくとも1つの）その冠詞の文法上の目的物を指して本明細書に使用される。  
 例として、「1つの要素」とは、1つの要素または1つを上回る要素、たとえば、複数の  
 要素を意味する。

#### 【0041】

「含む」という用語は、「含むが、限定されない」という語句を意味して本明細書に使

50



用され、また、それと互換可能に使用される。

【0042】

「または」という用語は、文脈により別途明確に示されない限り、「および/または」という用語を意味して本明細書に使用され、また、それと互換可能に使用される。

【0043】

数または一連の数の前にある「少なくとも」という用語は、文脈から明らかなように、「少なくとも」という用語に隣接する数、および論理的に含まれ得るすべての後続の数または整数を含むことが理解される。少なくともが、一連の数または範囲の前に存在する場合、「少なくとも」が、その一連の数または範囲内の数のそれぞれを修飾し得ることが、理解される。

10

【0044】

本明細書において使用されるとき、範囲は、上限および下限の両方を含む。

【0045】

「骨形成タンパク質」または「BMP」という用語は、身体全体の組織構造を統合する、中枢的な形態形成シグナルとしての機能を果たす、増殖因子の群を指す。BMPは、もともとは、骨および軟骨の形成を誘導するそれらの能力によって発見されたが、現在では、胚発生の際に様々な異なる機能を有すること、身体のパターン形成および形態形成カスケードに関与すること、および器官の恒常性に必須であることが、公知である。現在までに、20種類のBMPが発見されており、そのうち、BMP2～BMP7は、形質転換増殖因子ベータスーパーファミリーに属する。

20

【0046】

「GREM1」という用語は、システインノットスーパーファミリーのメンバーであるヒトグレムリン-1を指す。ヒトGREM1のアミノ酸配列は、受託番号NP\_037504としてGenBankに提供されており、本明細書においては配列番号594としても参照される。GREM1は、本明細書において配列番号593として提供される核酸によってコードされ、受託番号NM\_013372としてGenBankにおいても見出される。GREM1は、染色体15q13～q15にマッピングされている、高度に保存された184個のアミノ酸のタンパク質である。このタンパク質は、シグナルペプチド（アミノ酸1～24）、予測グリコシル化部位（アミノ酸42における）、システインリッチ領域、およびシステインノットモチーフ（アミノ酸94～184）を含み、その構造は、形質転換増殖因子-ベータ（TGF-）スーパーファミリーのメンバーによって共有されている。GREM1は、分泌型および細胞結合型（たとえば、膜結合型）の両方の形態で存在する。GREM1はまた、グレムリン1、システインノットスーパーファミリー1-BMPアンタゴニスト1（CKTSF1-B1）、DANDメインファミリーメンバー2（DAND2）、Mos形質転換細胞において下方制御されるタンパク質（DRM）、グレムリン、GREMLIN、グレムリン-1前駆体、高グルコースにおいて増加しているタンパク質2（IHG-2）、MGC126660、増殖誘導遺伝子2タンパク質（PIG2）、またはグレムリン1様タンパク質としても公知である。GREM1は、骨形成タンパク質（BMP）のアンタゴニストである。これは、BMPに結合し、BMPがそれらの受容体に結合するのを阻害する。GREM1とBMPとの間の相互作用は、利用可能なBMPのレベルを微調整し、発生および疾患のプロセスに影響を及ぼす。GREM1は、BMP-2、BMP-4、およびBMP-7に結合し、それらを阻害し得る。

30

40

【0047】

「肺高血圧」（「PH」）という用語は、任意の原因による肺における高い血圧を表して使用される用語である。一方で、「高血圧」または「高い血圧」という用語は、身体全体の動脈における高い血圧を指す。

【0048】

「肺動脈性肺高血圧」（「PAH」）という用語は、肺動脈圧の持続的な上昇によって特徴付けられる、進行性肺障害を指す。PAHを有する患者は、典型的に、25 mm Hgまたはそれよりも高い肺動脈圧を有し、肺毛細血管または左心房圧が、15 mm Hg

50

またはそれよりも低い。これらの血圧は、典型的に、対象において、右心カテーテル法を使用して、安静時に測定される。PAHは、処置されない場合、診断されてから2．8年以内に（平均して）死に至る。

#### 【0049】

世界保健機構（WHO）は、5つのグループのPAHの臨床上的分類を提供している（Simonneauら、J Am Coll Cardiol.、2013年；62巻（25—S）、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。

#### 【0050】

##### 1．肺動脈性肺高血圧（PAH）

###### 1．1．特発性

10

###### 1．2．遺伝性

###### 1．2．1．BMPR2

###### 1．2．2．ALK1、ENG、SMAD9、CAV1、KCNK3

###### 1．2．3．未知

###### 1．3．薬物および毒素誘導性

###### 1．4．以下に関連するもの：

###### 1．4．1．結合組織疾患

###### 1．4．2．HIV感染

###### 1．4．3．門脈圧亢進

###### 1．4．4．先天性心疾患

20

###### 1．4．5．住血吸虫症

##### 1'．肺静脈閉塞性疾患（PVOD）および／または肺毛細血管腫症（PCH）

##### 1''．新生児遷延性肺高血圧（PPHN）

#### 【0051】

##### 2．左心疾患に起因する肺高血圧

###### 2．1．左心室収縮不全

###### 2．2．左心室拡張障害

###### 2．3．弁膜疾患

###### 2．4．先天性／後天性左心流入管／流出管閉塞および先天性心筋症

#### 【0052】

30

##### 3．肺疾患および／または低酸素に起因する肺高血圧

###### 3．1．慢性閉塞性肺疾患

###### 3．2．間質性肺疾患

###### 3．3．制限型および閉塞型のパターンが混合した他の肺疾患

###### 3．4．睡眠時呼吸障害

###### 3．5．肺胞性低換気障害

###### 3．6．高所への慢性的な曝露

###### 3．7．発生異常

#### 【0053】

##### 4．慢性血栓塞栓性肺高血圧（CTEPH）

40

#### 【0054】

##### 5．不明瞭な多因子機序の肺高血圧

###### 5．1．血液障害：慢性溶血性貧血、骨髄増殖性障害、脾臓摘出

###### 5．2．全身性障害：サルコイドーシス、肺組織球増加症、リンパ管筋腫症

###### 5．3．代謝障害：グリコーゲン貯蔵疾患、ゴーシェ病、甲状腺障害

###### 5．4．その他：腫瘍による閉塞、線維性縦隔炎、透析中の慢性腎不全、部分的PH。

#### 【0055】

一実施形態では、本発明の方法により利益を得るであろう対象は、グループI（WHO）のPAHを有する対象である。

#### 【0056】

50

ベースライン（たとえば、診断されたとき）のPAHは、たとえば、PAHを有する患者の疾患重症度の尺度であるWHO機能的クラスによって測定される場合、軽度、中等度、または重度であり得る。WHO機能的分類は、New York Heart Association（NYHA）のシステムの適合であり、たとえば、疾患の進行および処置に対する応答をモニタリングする際に、活動の耐容性を定性的に評価するために日常的に使用されている（Rubin、（2004年）、Chest、126巻：7～10頁）。WHOのシステムでは、認識される機能的クラスは4つ存在する。

【0057】

クラスI：身体活動の制限をもたらすことがない肺高血圧；通常の身体活動により、過度の呼吸困難もしくは疲労、胸部疼痛、または失神寸前が生じない。

10

【0058】

クラスII：身体活動のわずかな制限をもたらす肺高血圧；患者は、安静時には快適であり、通常 of 身体活動により、過度の呼吸困難もしくは疲労、胸部疼痛、または失神寸前が生じる。

【0059】

クラスIII：著しい身体活動の制限をもたらす肺高血圧；患者は、安静時には快適であり、通常よりも少ない活動により、過度の呼吸困難もしくは疲労、胸部疼痛、または失神寸前が生じる。

【0060】

クラスIV：症状を伴わずにはいかなる身体活動を行うことも不可能になる肺高血圧；患者は、右心不全の兆候を示し、呼吸困難および/または疲労が、安静時ですら存在し得、任意の身体活動によって、不快が増加される。

20

【0061】

一実施形態では、本発明の方法により利益を得るであろう対象は、ベースラインにおいて、WHOのクラスIのPAH、（たとえば、グループI（WHO）のPAH）を有する対象である。別の実施形態では、本発明の方法により利益を得るであろう対象は、ベースラインにおいて、WHOのクラスIIのPAH（たとえば、グループI（WHO）のPAH）を有する対象である。別の実施形態では、本発明の方法により利益を得るであろう対象は、ベースラインにおいて、WHOのクラスIIIのPAH（たとえば、グループI（WHO）のPAH）を有する対象である。

30

【0062】

本明細書において使用されるとき、「対象」とは、動物、たとえば、哺乳動物、例として、霊長類（たとえば、ヒト、非ヒト霊長類、たとえば、サルおよびチンパンジー）、非霊長類（たとえば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス、ウマ、およびクジラ）、または鳥類（たとえば、カモまたはガチョウ）である。

【0063】

一実施形態では、対象は、ヒト、たとえば、本明細書において記載されるように、PAH、たとえば、グループI（WHO）のPAHに関して処置もしくは評価を受けているヒト、PAH、たとえば、グループI（WHO）のPAHを有する危険性にあるヒト、PAH、たとえば、グループI（WHO）のPAHを有するヒト、および/またはPAH、（たとえば、グループI（WHO）のPAH）に関して処置を受けているヒトである。

40

【0064】

本明細書において使用されるとき、「処置すること」または「処置」という用語は、PAH、（たとえば、グループI（WHO）のPAH）に関連する1つまたは複数の症状の軽減または緩和を含むがこれらに限定されない、有益または所望される結果を指す。「処置」はまた、疾患の過程を遅延することもしくは疾患の症状の発生を低減すること、後期発症疾患の重症度を低減すること、または処置の非存在下において予測される生存期間と比較して生存期間を延長することを意味し得る。たとえば、そのような疾患、障害、または状態と関連する症状の発生の低減（たとえば、その疾患もしくは障害に関して臨床上許

50

容される規模で、少なくとも約10%)、または症状の遅延を呈すること(たとえば、数日、数週間、数ヶ月、もしくは数年)は、有効な処置と考えられる。

【0065】

「治療有効量」とは、本明細書において使用されるとき、PAH、たとえば、グループI(WHO)のPAHを有する対象に投与した場合に、疾患の処置を達成する(たとえば、既存の疾患または疾患の1つもしくは複数の症状を減少、緩和、もしくは維持することによって)か、または疾患を管理するのに十分である、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の量を含むことが意図される。「治療有効量」は、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片がどのように投与されるか、疾患およびその重症度ならびに病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的体質、PAHのステージ、存在する場合の先行するまたは同時の処置の種類、ならびに処置を受ける患者の他の個別の特徴に応じて、変動し得る。

10

【0066】

「治療有効量」はまた、対象に投与した場合に、疾患または疾患の1つもしくは複数の症状を緩和するのに十分である、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の量を含むことが意図される。疾患を緩和することは、疾患の過程を遅延すること、または後期発症疾患の重症度を低減することを含む。

【0067】

「治療有効量」はまた、任意の処置に該当する妥当な利益/危険性比で、なんらかの所望される局所的または全身的作用をもたらす、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の量を含む。本発明の方法において利用される抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片は、そのような処置に該当する妥当な利益/危険性比をもたらすのに十分な量で、投与され得る。

20

【0068】

II. 本発明の方法

本発明は、肺動脈性肺高血圧を有する対象を処置するための方法を提供する。本方法は、一般に、対象に、治療有効量の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む。

【0069】

本発明の一部の態様では、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与により、対象における肺動脈の肥厚が阻害される、たとえば、対象における肺動脈の、ベースライン、たとえば、診断時からのさらなる肥厚が阻害される。肺動脈の肥厚は、たとえば、胸部CT(たとえば、非強調(unenhanced)の軸方向10mmのCT切片)によって判定し、これを使用して、主肺動脈の直径(mPA)を計算することができる。正常な対象の主肺動脈の直径は、約2.4cm~約3.0cmである。肺動脈性肺高血圧を有する対象の主肺動脈の直径は、約3.1cm~約3.8cmであるか、またはそれを上回る。たとえば、Edwardsら、(1998年)、Br J Radiol、71巻(850号):1018~20頁を参照されたい。

30

【0070】

本発明の他の態様では、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与により、対象における一回拍出量および/または一回拍出量対収縮終期量の比(「SV/ESV」)が増加する。「一回拍出量」(「SV」)は、単回の収縮で、右心室または左心室から送り出される血液の量である。一回拍出量は、心エコー図による心室容積の測定値を使用して計算することができ、脈拍の終了時における心室内の血液の量(「収縮終期量」、「EDV」と称される)を、脈拍の直前の血液の量(「拡張終期量」、「ESV」と称される)から差し引くことによって、計算することができる。一回拍出量はまた、たとえば、右心カテーテル法中に熱希釈法によって測定される心拍出量を、心拍数で除したものの、またはEDVからESVを差し引き、体表面積に関して指数化したものとして、計算することもできる。一回拍出量という用語は、心臓の2つの心室のそれぞれに適用することができる。それぞれの心室の一回拍出量は、一般に等しく、いずれも、健常な対象ではおよそ7

40

50

0 mLである。健常な対象のSV/ESVは、約0.9～約2.2であり、PAHを有する対象のSV/ESVは、約0.2～約0.9である。たとえば、Brewisら、(2016年)、Int J Cardiol、218巻：206～211頁を参照されたい。

#### 【0071】

本発明のさらに他の態様では、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与により、対象における右心室の心拍出量および/または心指数(CI)が増加する。「心拍出量」(「CO」)は、単位時間で心室によって送り出される血液の量として定義される。「心指数」(「CI」)は、1分間における左心室の心拍出量(CO)を、「体表面積」(「BSA」)と関連付け、それによって、心臓の性能を個体のサイズと関連付ける、血行動態パラメーターである。心エコー技法および放射性核種撮像技法を使用して、心室サイズのリアルタイムでの変化を推測することができ、したがって、一回拍出量をコンピュータ計算することができ、これに、心拍数を乗じると、心拍出量が得られ、BSAは、たとえば、デュボイスの式(Verbraecken, Jら、(2006年)、Metabolism - Clin Exper、55巻(4号)：515～24頁)またはモステラーの式(Mosteller、(1987年)、N Engl J Med、317巻：1098頁)を含む、当業者に公知の式のうちのいずれか1つを使用して計算することができる。PAHを有さない対象は、1平方メートル当たり、約4.0～8.0 L/分の範囲の心拍出量、および約2.6～約4.2 L/分の心指数を有する。PAHを有する対象は、1平方メートル当たり、約1.9～約2.3 L/分の心指数を有する(RyanおよびArcher、(2016年)、Circ Res、115巻：176～188頁)。

10

20

#### 【0072】

本発明の方法において、PAHを有する対象に、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を投与することにより、PAHを有する対象における他の血行動態測定値、たとえば、例として、右心房圧、肺動脈圧、呼気終末圧の存在下における肺毛細血管楔入圧、全身動脈圧、心拍数、肺血管抵抗、および/または全身血管抵抗を改善することができる。右心房圧、肺動脈圧、呼気終末圧の存在下における肺毛細血管楔入圧、全身動脈圧、心拍数、肺血管抵抗、および/または全身血管抵抗を測定するための方法およびデバイスは、当業者に公知である。

#### 【0073】

PAHを有さない対象は、約1 mm Hg～約5 mm Hgの右心房圧を有し、PAHを有する対象は、約11 mm Hg～約13 mm Hgの右心房圧を有する。

30

#### 【0074】

PAHを有さない対象は、約9 mm Hg～約20 mm Hgの肺動脈圧を有し、PAHを有する対象は、約57 mm Hg～約61 mm Hgの肺動脈圧を有する。

#### 【0075】

PAHを有さない対象は、約4 mm Hg～約12 mm Hgの呼気終末圧の存在下における肺毛細血管楔入圧を有し、PAHを有する対象は、約9 mm Hg～約11 mm Hgの呼気終末圧の存在下における肺毛細血管楔入圧を有する。

#### 【0076】

PAHを有さない対象は、約90 mm Hg～約96 mm Hgの全身動脈圧を有し、PAHを有する対象は、約87 mm Hg～約91 mm Hgの全身動脈圧を有する。

40

#### 【0077】

PAHを有さない対象は、1分間当たり約60回(bpm)～約90 bpmの心拍数を有し、PAHを有する対象は、約84 bpm～88 bpmの全身動脈圧を有する。

#### 【0078】

PAHを有さない対象は、約20 dynes/cm<sup>5</sup>～約130 dynes/cm<sup>5</sup>(または約0.25～約1.625ウッド単位)の肺血管抵抗を有し、PAHを有する対象は、約1200 dynes/cm<sup>5</sup>～約1360 dynes/cm<sup>5</sup>(または約15～約17ウッド単位)の肺血管抵抗を有する。

#### 【0079】

50

PAHを有さない対象は、約700ダインス/cm<sup>5</sup>～約1600ダインス/cm<sup>5</sup>（または約9～約20ウッド単位）の全身血管抵抗を有し、PAHを有する対象は、約1840ダインス/cm<sup>5</sup>～約2000ダインス/cm<sup>5</sup>（または約23～約25ウッド単位）の全身血管抵抗を有する。

#### 【0080】

本発明の方法はまた、処置を受けている対象において、他の臨床上のパラメーター、たとえば、肺機能を改善することができる。たとえば、処置期間の最中または後に、対象は、たとえば、6分間の歩行距離（6 MWD）もしくは活動の尺度の試験、またはBorg呼吸困難指標（BDI）の低下によって測定される、運動能力または活動の増加を有し得る。

10

#### 【0081】

本発明の方法はまた、1つまたは複数の生活の質のパラメーターを、ベースラインと比べて、改善し得る。たとえば、SF-36（登録商標）健康状態調査の機能的スケールのうちの少なくとも1つのスコアの増加、たとえば、より低いWHOの機能的クラスへの移動による状態の重症度におけるベースラインと比べた改善、および/または寿命の増加がある。

#### 【0082】

運動能力に関する任意の好適な尺度を使用して、対象が、運動能力または活動の増加を有するかどうかを判定することができる。1つの好適な尺度は、6分間の歩行試験（6 MWT）であり、これは、対象が、6分間で、どれだけ長い距離を歩行することができるか、すなわち、6分間の歩行距離（6 MWD）を測定する。別の好適な尺度は、Borg呼吸困難指標（BDI）であり、これは、認められる呼吸困難（呼吸の難しさ）を評価するための数値スケールである。これは、6分間の歩行試験（6 MWT）の完了後の息切れの程度を測定し、0のBDIは、息切れがないことを示し、10は、最大限の息切れを示す。一実施形態では、本発明の方法は、対象に、6 MWDにおけるベースラインからの、少なくとも約10分間、たとえば、約10分間、15分間、20分間、または約30分間の増加をもたらす。別の実施形態では、6 MWTの後に、本発明の方法は、対象に、ベースラインBDIから、少なくとも約0.5～約1.0指標ポイントの低下をもたらす。

20

#### 【0083】

生活の質に関する任意の好適な尺度を、使用することができる。たとえば、SF-36（登録商標）の健康状態調査は、自己報告により次の8つの健康パラメーターを測定する複数項目のスケールを提供する：身体機能、物理的な健康上の問題に起因する機能の制限、身体の疼痛、全般的な健康状態、活力（エネルギーおよび疲労）、社会的機能、感情上の問題に起因する機能の制限、ならびに精神的な健康状態（精神的苦痛および精神的ウェルビーイング）。この調査は、身体上の構成要素の概要および精神的な構成要素の概要も提供する。一実施形態では、本発明の方法は、対象に、SF-36の身体的な健康状態に関するパラメーター（身体的な健康状態、身体機能、身体の疼痛、および/もしくは全般的な健康状態）のうちの少なくとも1つ、ならびに/またはSF-36の精神的な健康状態に関するパラメーター（活力、社会的機能、感情機能、および/もしくは精神的な健康状態）のうちの少なくとも1つにおける、ベースラインと比べた改善を提供する。そのような改善は、任意の1つまたは複数のパラメーターのスケールにおける、少なくとも1ポイント、たとえば、少なくとも2ポイントまたは少なくとも3ポイントの増加の形態をとり得る。

30

40

#### 【0084】

本発明の方法はまた、処置を受けている対象の予後を改善することができる。たとえば、本発明の方法は、対象に、処置期間中の臨床悪化事象の可能性の低減、および/または血清中の脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）もしくはNT pro-BNPもしくはそのN末端ホルモン前駆体であるNT-pro-BNPの濃度のベースラインからの低減をもたらすことができ、ここで、ベースラインにおいて、対象における状態の最初の診断からの時間は、約2年を上回らない。

50

## 【0085】

最初の診断からの時間は、様々な態様では、たとえば、約1.5年を上回らないか、約1年を上回らないか、約0.75年を上回らないか、または約0.5年を上回らない場合がある。臨床悪化事象(CWE)には、死亡、肺移植、PAHによる入院、心房中隔欠損作製術、さらなる肺高血圧治療の開始、またはこれらの組合せが含まれる。PAHの臨床悪化までの時間は、処置の開始からCWEの最初の発生までの時間として定義される。

## 【0086】

一実施形態では、本発明の方法は、BNPまたはNT-pro-BNPの濃度に、ベースラインから、少なくとも約15%、たとえば、少なくとも約25%、少なくとも約50%、または少なくとも約75%の低減をもたらす。

10

## 【0087】

一実施形態では、本発明の方法は、処置期間中の、死亡、肺移植、肺動脈性肺高血圧による入院、心房中隔欠損作製術、および/またはさらなる肺高血圧治療の開始の可能性に、少なくとも約25%、たとえば、少なくとも約50%、少なくとも約75%、または少なくとも約80%の低減をもたらす。

## 【0088】

本発明の方法はまた、処置の開始時点から、たとえば、少なくとも約30日間、PAHを有する対象の寿命を延長することができる(生存期間を延長することができる)。

## 【0089】

本発明の方法において使用するための、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の治療有効量は、約0.05mg~約600mg、たとえば、約0.05mg、約0.1mg、約1.0mg、約1.5mg、約2.0mg、約10mg、約20mg、約30mg、約40mg、約50mg、約60mg、約70mg、約80mg、約90mg、約100mg、約110mg、約120mg、約130mg、約140mg、約150mg、約160mg、約170mg、約180mg、約190mg、約200mg、約210mg、約220mg、約230mg、約240mg、約250mg、約260mg、約270mg、約280mg、約290mg、約300mg、約310mg、約320mg、約330mg、約340mg、約350mg、約360mg、約370mg、約380mg、約390mg、約400mg、約410mg、約420mg、約430mg、約440mg、約450mg、約460mg、約470mg、約480mg、約490mg、約500mg、約510mg、約520mg、約530mg、約540mg、約550mg、約560mg、約570mg、約580mg、約590mg、約600mg、約610mg、約620mg、約630mg、約640mg、約650mg、約660mg、約670mg、約680mg、約690mg、約700mg、約710mg、約720mg、約730mg、約740mg、約750mg、約760mg、約770mg、約780mg、約790mg、約800mg、約810mg、約820mg、約830mg、約840mg、約850mg、約860mg、約870mg、約880mg、約890mg、約900mg、約910mg、約920mg、約930mg、約940mg、約950mg、約960mg、約970mg、約980mg、約990mg、または約1000mgのそれぞれの抗体であり得る。

20

30

40

## 【0090】

個々の用量に含まれる抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の量は、患者の体重1キログラム当たりの抗体のミリグラムという単位(すなわち、mg/kg)で表すことができる。たとえば、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片は、約0.0001~約50mg/患者の体重1kg(たとえば、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg、5.0mg/kg、5.5mg/kg、6.0mg/kg、6.5mg/kg、7.0mg/kg、7.5mg/kg、8.0mg/kg、8.5mg/kg、9.0mg/kg、9.5mg/kg、10.0mg/kg、10.5mg/kg、11.0mg/kg、11.5mg/kg、

50

12.0 mg/kg、12.5 mg/kg、13.0 mg/kg、13.5 mg/kg、14.0 mg/kg、14.5 mg/kg、15.0 mg/kg、15.5 mg/kg、16.0 mg/kg、16.5 mg/kg、17.0 mg/kg、17.5 mg/kg、18.0 mg/kg、18.5 mg/kg、19.0 mg/kg、19.5 mg/kg、20.0 mg/kg など) の用量で、患者に投与され得る。

#### 【0091】

複数回の用量の抗GREM1抗体もしくはその抗原結合性断片、または抗GREM1抗体もしくはその抗原結合性断片を含む医薬組成物は、既定の時間過程にわたって、対象に投与され得る。本発明のこの態様による方法は、対象に、複数回の用量の本発明の活性成分を、逐次的に投与することを含む。本明細書において使用されるとき、「逐次的に投与すること」とは、それぞれの用量の活性成分が、異なる時点で、たとえば、所定の間隔（たとえば、数時間、数日間、数週間、または数ヶ月間）で離間した異なる日に、対象に投与されることを意味する。本発明は、患者に、単一の初回用量の活性成分、その後1回または複数回の二次用量の活性成分、その後任意選択で1回または複数回の三次用量の活性成分を逐次的に投与することを含む方法を含む。

#### 【0092】

「初回用量」、「二次用量」、および「三次用量」という用語は、本発明の抗GREM1抗体もしくはその抗原結合性断片または組合せ療法の投与の時間的な順序を指す。したがって、「初回用量」は、処置レジメンの開始時に投与される用量（「ベースライン用量」とも称される）であり、「二次用量」は、初回用量の後に投与される用量であり、「三次用量」は、二次用量の後に投与される用量である。初回用量、二次用量、および三次用量は、すべて、同じ量の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を含んでもよいが、投与の頻度に関して、互いに異なってもよい。ある特定の実施形態では、しかしながら、初回用量、二次用量、および/または三次用量に含まれる抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の量は、処置の過程中、互いに変動する（たとえば、適宜、上方または下方調節される）。ある特定の実施形態では、2回またはそれよりも多い（たとえば、2回、3回、4回、または5回）用量が、「負荷用量」として、処置レジメンの開始時に投与され、続いて、より低い頻度基準で投与される後続用量（たとえば、「維持用量」）が投与される。

#### 【0093】

本発明のある特定の例示的な実施形態では、それぞれの二次用量および/または三次用量は、直前の用量の1~26（たとえば、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、またはそれよりも長い）週間後に投与される。「直前の用量」という語句は、本明細書において使用されるとき、複数回投与の順序において、他の用量を挟むことなく、順序における直後の用量の投与の前に患者に投与される、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の用量を意味する。

#### 【0094】

本発明のこの態様による方法は、患者に、任意の回数の二次用量および/または三次用量を投与することを含み得る。たとえば、ある特定の実施形態では、単回の二次用量のみが、患者に投与される。他の実施形態では、2回またはそれよりも多い（たとえば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、またはそれよりも多い）二次用量が、患者に投与される。同様に、ある特定の実施形態では、単回の三次用量のみが、患者に投与される。他の実施形態では、2回またはそれよりも多い（たとえば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、またはそれよりも多い）三次用量が、患者に投与される。

#### 【0095】

複数回の二次用量を含む実施形態では、それぞれの二次用量は、他の二次用量と同じ頻

10

20

30

40

50



度で投与され得る。たとえば、それぞれの二次用量は、直前の用量の 1 ~ 2 週間後、または 1 ~ 2 ヶ月後に患者に投与され得る。同様に、複数回の三次用量を含む実施形態では、それぞれの三次用量は、他の三次用量と同じ頻度で投与され得る。たとえば、それぞれの三次用量は、直前の用量の 2 ~ 12 週間後に患者に投与され得る。本発明のある特定の実施形態では、二次用量および / または三次用量が患者に投与される頻度は、処置レジメンの過程にわたって変動し得る。投与の頻度はまた、処置の過程に、臨床検査後の個々の患者の必要性に応じて、医師によって調節され得る。

【0096】

本発明の一部の実施形態では、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合性断片は、単剤療法として（すなわち、唯一の治療剤として）投与され得る。本発明の他の実施形態では、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合性断片は、1 つまたは複数の追加の治療剤と組み合わせて投与されてもよい。

10

【0097】

対象に、抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合性断片、および少なくとも 1 つの追加の治療剤を投与することを含む、本発明の組合せ方法では、抗体および追加の治療剤は、たとえば、単一の治療的剤形（dosage）で、または同時もしくは互いに約 5 分未満以内に投与される 2 つの別個の剤形で、同時または実質的に同時に対象に投与されてもよい。あるいは、抗体および追加の治療剤は、たとえば、約 5 分を上回って、互いに時間的に離間した別個の治療的剤形で、逐次的に対象に投与されてもよい。

【0098】

20

したがって、一実施形態では、本発明の方法は、抗凝血剤、利尿剤、強心性配糖体、カルシウムチャネル遮断剤、血管拡張剤、プロスタサイクリン類似体、内皮アンタゴニスト、ホスホジエステラーゼ阻害剤、エンドペプチダーゼ阻害剤、脂質降下剤、およびトロンボキサン阻害剤からなる群から選択される、治療有効量の少なくとも 1 つの治療剤を投与することをさらに含む。一実施形態では、本発明の方法は、治療有効量の、少なくとも 1 つまたは複数の追加の治療抗体（単数または複数）またはその抗原結合性断片（単数または複数）を投与することをさらに含む。一実施形態では、1 つまたは複数の追加の抗体（単数または複数）は、抗 G r e m 1 抗体（単数または複数）、抗 P D G F R 抗体（単数または複数）、抗 T L R 4 抗体（単数または複数）、抗 T L R 2 抗体（単数または複数）、抗 E D N 1 抗体（単数または複数）、および抗 A S I C 1 抗体（単数または複数）からなる群から選択される。

30

【0099】

好適な抗凝血剤の例としては、たとえば、増加した血栓症および血栓塞栓症の危険性を有する肺高血圧を有する患者の処置において有用なワルファリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

好適なカルシウムチャネル遮断剤の例としては、ジルチアゼム、フェロジピン、アムロジピン、およびニフェジピンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0101】

40

好適な血管拡張剤としては、たとえば、プロスタサイクリン、エボprostenoール、トレプロスチニル、および一酸化窒素（NO）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

好適な例示的なホスホジエステラーゼ阻害剤としては、特に、ホスホ - ジエステラーゼ V 阻害剤、たとえば、例として、タダラフィル、シルデナフィル、およびバルデナフィルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0103】

好適なエンドセリンアンタゴニストの例としては、たとえば、ボセンタンおよびシタキセンタンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0104】

50

好適なプロスタサイクリン類似体としては、たとえば、イロメジン、トレプロスチニル

、およびエポプロステノールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0105】

好適な脂質降下剤としては、たとえば、HMG CoA還元酵素阻害剤、たとえば、シンバスタチン、プラバスタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、イタバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、ZD-4522、およびセリバスタチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

本発明の組合せ療法において使用するのに好適な利尿剤としては、たとえば、クロルサリドン、インダパミド、ベンドロフルメチアジド、メトラゾン、シクロペンチアジド、ポリチアジド、メフルシド、キシマピド(ximapid)、クロロチアジド、およびヒドロクロロチアジドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0107】

他の治療剤の例としては、たとえば、ACE阻害剤、たとえば、エナラプリル、ラミプリル、カプトプリル、シラザプリル、トランドラプリル、フォシノプリル、キナプリル、モエキシプリル、リシノプリル、およびペリンドプリル、またはATII阻害剤、たとえば、ロサルタン、カンデサルタン、イルベサルタン、エンブサルタン(embusartan)、バルサルタン、およびテルミサルタン、またはイロブロスト、ベタブロスト(betaprost)、L-アルギニン、オマパトリラト、酸素、ならびに/またはジゴキシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0108】

本発明の方法はまた、キナーゼ阻害剤(たとえば、BMS-354825、カネルチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レスタウルチニブ、ロナファーンニブ、ペガプタニブ、ペリチニブ、セマキサニブ、タンデュチニブ、チピファルニブ、パタラニブ、ロニダミン、ファスジル、レフルノミド、ボルテゾミブ、イマチニブ、エルロチニブ、およびグリベック)、ならびに/またはエラスターゼ阻害剤の組合せ使用を含み得る。

20

【0109】

追加の治療上活性な成分は、本発明の抗GREM1抗体の投与の前に、対象に投与され得る。たとえば、第1の成分が、第2の成分の投与の1週間前、72時間前、60時間前、48時間前、36時間前、24時間前、12時間前、6時間前、5時間前、4時間前、3時間前、2時間前、1時間前、30分前、15分前、10分前、5分前、または1分未満前に投与される場合、第1の成分は、第2の成分の「前に」投与されると考えることができる。他の実施形態では、追加の治療上活性な成分は、抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与の後に、対象に投与され得る。たとえば、第1の成分が、第2の成分の投与の1分後、5分後、10分後、15分後、30分後、1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後、60時間後、72時間後に投与される場合、第1の成分は、第2の成分の「後に」投与されると考えることができる。

30

【0110】

さらに他の実施形態では、追加の治療上活性な成分は、本発明の抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片の投与と同時に、対象に投与され得る。本発明の目的で、「同時の」投与には、たとえば、単一剤形または互いに約30分以内もしくはそれよりも短い時間で対象に投与される別個の剤形での、対象への抗GREM1抗体および追加の治療上活性な成分の投与が含まれる。別個の剤形で投与される場合、それぞれの剤形は、同じ経路を介して投与されてもよく(たとえば、抗GREM1抗体および追加の治療上活性な成分の両方が、静脈内、皮下、硝子体内などに投与され得る)、あるいは、それぞれの剤形が、異なる経路を介して投与されてもよい(たとえば、抗GREM1抗体は、局所的に(たとえば、硝子体内に)投与され得、追加の治療上活性な成分は、全身的に投与され得る)。いずれの事象においても、単一の剤形、同じ経路による別個の剤形、または異なる経路による別個の剤形で成分を投与することは、すべてが、本開示の目的で、「同時投与」と考

40

50

えられる。本開示の目的で、追加の治療上活性な成分の投与の「前」、「それと同時」、または「その後」（これらの用語は本明細書において上記に定義されている）の抗 G R E M 1 抗体の投与は、追加の治療上活性な成分「と組み合わせた」抗 G R E M 1 抗体またはその抗原結合性断片の投与と考えられる）。

【 0 1 1 1 】

I I I . 本発明の方法において使用するのに好適な結合性タンパク質

本発明の方法において使用するのに好適な抗グレムリン - 1 ( G R E M 1 ) 結合性タンパク質は、たとえば、米国特許公開第 2 0 1 6 / 0 0 2 4 1 9 5 号に記載されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 1 2 】

一実施形態では、本発明において使用するのに好適な G R E M 1 結合性タンパク質は、抗原特異的結合性タンパク質である。

【 0 1 1 3 】

本明細書において使用されるとき、「抗原特異的結合性タンパク質」という表現は、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも 1 つのドメインを含むタンパク質を意味する。抗原特異的結合性タンパク質の例示的なカテゴリとしては、抗体、抗体の抗原結合性部分、特定の抗原と特異的に相互作用するペプチド（たとえば、ペプチボディ）、特定の抗原と特異的に相互作用する受容体分子、および特定の抗原に特異的に結合する受容体のリガンド結合性部分を含むタンパク質が挙げられる。

【 0 1 1 4 】

したがって、本発明は、G R E M 1 に特異的に結合する抗原特異的結合性タンパク質、すなわち、「G R E M 1 特異的結合性タンパク質」の使用を含む。

【 0 1 1 5 】

一実施形態では、本発明の方法において使用するための抗原特異的結合性タンパク質は、抗体または抗体の抗原結合性断片を含み得るかまたはそれからなり得る。

【 0 1 1 6 】

一実施形態では、本発明において使用するための G R E M 1 特異的結合性タンパク質は、配列番号 5 9 4 または配列番号 5 9 5 の G R E M 1 に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体である。

【 0 1 1 7 】

「抗体」という用語は、本明細書において使用されるとき、4 つのポリペプチド鎖、すなわち、2 つの重鎖 ( H ) および 2 つの軽鎖 ( L ) がジスルフィド結合によって相互接続されたものから構成される免疫グロブリン分子（すなわち、「完全抗体分子」）、ならびにその多量体（たとえば、I g M）、またはその抗原結合性断片を指すことが意図される。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（「H C V R」または「V<sub>H</sub>」）ならびに重鎖定常領域（C<sub>H</sub> 1、C<sub>H</sub> 2、および C<sub>H</sub> 3 ドメインから構成される）から構成される。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（「L C V R」または「V<sub>L</sub>」）および軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）から構成される。V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 領域は、相補性決定領域（C D R）と称される超可変性の領域にさらに分割することができ、そこには、フレームワーク領域（F R）と称される保存性の高い領域が点在している。V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> は、それぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端に、次の順序で配置される 3 つの C D R および 4 つの F R から構成される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。本発明のある特定の実施形態では、抗体（またはその抗原結合性断片）の F R は、ヒト生殖細胞系列配列と同一であってもよく、または天然もしくは人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸のコンセンサス配列は、2 つまたはそれよりも多くの C D R を並べた分析に基づいて定義され得る。

【 0 1 1 8 】

H C V R および L C V R アミノ酸配列内の C D R を特定する方法および技法は、当該技術分野において周知であり、本明細書において開示される指定された重鎖可変領域（H C V R）および / または軽鎖可変領域（L C V R）アミノ酸配列内の C D R を特定するために使用することができる。C D R の境界部を特定するために使用することができる例示的

10

20

30

40

50

な従来方法としては、たとえば、K a b a t の定義、C h o t h i a の定義、および A b M の定義が挙げられる。一般的に述べると、K a b a t の定義は、配列の変動性に基づき、C h o t h i a の定義は、構造的ループ領域の位置に基づき、A b M の定義は、K a b a t および C h o t h i a のアプローチの間の折衷案である。たとえば、Kabat、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、National Institutes of Health, Bethesda, Md.、( 1 9 9 1 年 )、Al-Lazikaniら ( 1 9 9 7 年 )、J. Mol. Biol.、2 7 3 巻 : 9 2 7 ~ 9 4 8 頁 ; および Martinら ( 1 9 8 9 年 )、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、8 6 巻 : 9 2 6 8 ~ 9 2 7 2 頁を参照されたい。公的データベースもまた、抗体内の C D R 配列を特定するために利用可能である。

#### 【 0 1 1 9 】

1 つもしくは複数の C D R の残基の置換または 1 つもしくは複数の C D R の省略もまた、可能である。結合のために 1 つまたは 2 つの C D R を省略することができる抗体が、科学文献に記載されている。Padlanら ( FASEB J.、1 9 9 5 年、9 巻 : 1 3 3 ~ 1 3 9 頁 ) では、公開されている結晶構造に基づいて抗体とそれらの抗原との間の接触領域を分析しており、C D R 残基のうちの約 5 分の 1 から 3 分の 1 のみが、実際に抗原と接触すると結論付けている。Padlan はまた、1 つまたは 2 つの C D R が抗原と接触するアミノ酸を有さなかった抗体を多数発見している ( Vajdosら、2 0 0 2 年、J Mol Biol、3 2 0 巻 : 4 1 5 ~ 4 2 8 頁もまた参照されたい )。

#### 【 0 1 2 0 】

抗原と接触しない C D R 残基は、これまでの研究に基づいて、分子モデリングによって、および / または経験的に、C h o t h i a の C D R には含まれない K a b a t の C D R の領域から、特定され得る ( たとえば、C D R H 2 の残基 H 6 0 ~ H 6 5 は、必要でないことが多い )。C D R またはその残基が省略される場合、それは、通常、別のヒト抗体配列またはそのような配列のコンセンサスにおいて対応する位置を占有しているアミノ酸と置換される。C D R 内の置換の位置および置換するアミノ酸もまた、経験的に選択することができる。経験的な置換は、保存的置換であっても非保存的置換であってもよい。

#### 【 0 1 2 1 】

本明細書において開示される方法において使用するための完全ヒト抗 G R E M 1 モノクローナル抗体は、対応する生殖細胞系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域および / または C D R 領域に、1 つまたは複数のアミノ酸の置換、挿入、および / または欠失を含み得る。そのような変異は、本明細書において開示されるアミノ酸配列を、たとえば、公的な抗体配列のデータベースから入手可能な生殖細胞系列配列と比較することによって、容易に確認することができる。本発明は、本明細書において開示されるアミノ酸配列のうちのいずれかに由来する、抗体およびその抗原結合性断片を含み、ここで、1 つまたは複数のフレームワーク領域および / または C D R 領域内の 1 つまたは複数のアミノ酸が、抗体が由来する生殖細胞系列配列の対応する残基、または別のヒト生殖細胞系列配列の対応する残基、または対応する生殖細胞系列の残基の保存的アミノ酸置換に、変異されている ( そのような配列の変化は、本明細書において集合的に「生殖細胞系列変異」と称される )。当業者であれば、本明細書において開示される重鎖および軽鎖可変領域配列から出発して、1 つまたは複数の個々の生殖細胞系列変異またはその組合せを含む多数の抗体および抗原結合性断片を容易に産生することができる。ある特定の実施形態では、V<sub>H</sub> および / または V<sub>L</sub> ドメイン内のフレームワークおよび / または C D R 残基は、すべてが、抗体が由来するもともとの生殖細胞系列配列において見出される残基に逆変異されている。他の実施形態では、ある特定の残基のみが、もともとの生殖細胞系列配列に逆変異され、たとえば、F R 1 の最初の 8 個のアミノ酸内もしくは F R 4 の最後の 8 個のアミノ酸内には、変異した残基しか見出されないか、または C D R 1、C D R 2、もしくは C D R 3 内には、変異した残基しか見出されない。他の実施形態では、フレームワークおよび / または C D R の残基のうちの 1 つまたは複数は、異なる生殖細胞系列配列 ( すなわち、抗体がもともと由来する生殖細胞系列配列とは異なる生殖細胞系列配列 ) の対応する残基に変異されている。さらに、本発明の抗体は、フレームワークおよび

10

20

30

40

50

／またはCDR領域内に2つまたはそれよりも多い生殖細胞系列変異の任意の組合せを含み得、ここで、たとえば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖細胞系列配列の対応する残基に変異されているが、もともとの生殖細胞系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持されるか、または異なる生殖細胞系列配列の対応する残基に変異されている。1つまたは複数の生殖細胞系列変異を含む抗体および抗原結合性断片は、得られた後、1つまたは複数の所望される特性、たとえば、結合特異性の改善、結合親和性の増加、アンタゴニスト性またはアゴニスト性の生物学的特性の改善または強化（事例に応じて）、免疫原性の低減などに関して、容易に試験することができる。この一般的な様式で得られた抗体および抗原結合性断片は、本発明に包含される。

【0122】

本発明はまた、1つまたは複数の保存的置換を有する本明細書において開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかのバリエーションを含む、完全ヒト抗GREM1モノクローナル抗体の使用も含む。たとえば、本発明は、本明細書において開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のうちのいずれかと比べて、たとえば、10個またはそれよりも少ない、8個またはそれよりも少ない、6個またはそれよりも少ない、4個またはそれよりも少ないなどの保存的アミノ酸置換を有するHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列を有する抗GREM1抗体を含む。

【0123】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書において使用されるとき、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のmAbは、たとえば、CDRおよび具体的にはCDR3に、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（たとえば、*in vitro*でのランダムもしくは部位特異的変異生成によって、または*in vivo*での体細胞変異によって、変異が導入されている）。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書において使用されるとき、別の哺乳動物種（たとえば、マウス）の生殖細胞系列に由来するCDR配列が、ヒトFR配列にグラフトされているmAbを含むことは意図されない。

【0124】

「特異的に結合する」または「に特異的に結合する」などの用語は、抗体またはその抗原結合性断片が、生理学的条件下において比較的安定である、抗原との複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも約 $1 \times 10^{-6}$  Mまたはそれよりも低い平衡解離定数によって特徴付けることができる（たとえば、より低い $K_D$ は、より強固な結合を表す）。2つの分子が特異的に結合するかどうかを判定するための方法は、当該技術分野において周知であり、たとえば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが含まれる。本明細書において使用するのに好適なヒトGREM1に特異的に結合する抗体は、表面プラズモン共鳴、たとえば、BIACORE（商標）によって特定されている。さらに、GREM1における1つのドメインおよび1つもしくは複数の追加の抗原に結合する多重特異性抗体、またはGREM1の2つの異なる領域に結合する二重特異性抗体もなお、本明細書において使用されるとき、「特異的に結合する」抗体と考えられる。

【0125】

「高親和性抗体」という用語は、表面プラズモン共鳴、たとえば、BIACORE（商標）または溶液親和性ELISAによって測定される場合、GREM1に対して、少なくとも $10^{-7}$  M、好ましくは $10^{-8}$  M、より好ましくは $10^{-9}$  M、さらにより好ましくは $10^{-10}$  M、さらにより好ましくは $10^{-11}$  Mの $K_D$ として表される結合親和性を有するmAbを指す。

【0126】

「遅い解離速度」、「Koff」、または「kd」という用語は、表面プラズモン共鳴、たとえば、BIACORE（商標）によって判定される場合、 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ またはそれよりも低い、好ましくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ またはそれよりも低い速度定数で

10

20

30

40

50

、GREM1から解離する抗体を意味する。

【0127】

抗体の「抗原結合性部分」、抗体の「抗原結合性断片」などの用語は、本明細書において使用されるとき、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然に存在する、酵素反応により得ることができる、合成または遺伝子工学的操作を加えたポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の「抗原結合性断片」または「抗体断片」という用語は、本明細書において使用されるとき、GREM1に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片を指す。

【0128】

本発明の方法の特定の実施形態では、抗体または抗体断片は、治療的部分にコンジュゲートされ得（「イムノコンジュゲート」）、たとえば、抗生物質、第2の抗GREM1抗体、またはサイトカイン、たとえば、IL-1、IL-6、もしくはTGF- $\alpha$ に対する抗体、またはPAHを処置するための任意の他の治療的部分に、コンジュゲートされ得る。

10

【0129】

「単離された抗体」とは、本明細書において使用されるとき、異なる抗原特異性を有する他の抗体（Ab）を実質的に含まない抗体を指すことが意図され、たとえば、ヒトGREM1に特異的に結合する単離された抗体またはその断片は、GREM1以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない。

【0130】

本明細書において使用されるとき、「遮断抗体」または「中和抗体」（または「GREM1活性を中和する抗体」）は、GREM1への結合により、GREM1の少なくとも1つの生物学的活性の阻害をもたらす、抗体を指すことが意図される。GREM1の生物学的活性のこの阻害は、当該技術分野において公知の複数の標準的なin vitroアッセイ（たとえば、本明細書において記載される中和アッセイ）またはin vivoアッセイ（たとえば、本明細書において記載される抗体のうちの1つもしくは複数を経口投与した後のGREM1活性からの保護を考察する動物モデル）の1つまたは複数により、GREM1の生物学的活性の1つまたは複数の指標を測定することによって評価することができる。

20

【0131】

「表面プラズモン共鳴」という用語は、本明細書において使用されるとき、たとえば、BIACORE（商標）システム（Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、SwedenおよびPiscataway、N.J.）を使用して、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することにより、リアルタイムでの生体分子の相互作用の分析を可能にする、光学的現象を指す。

30

【0132】

「 $K_D$ 」という用語は、本明細書において使用されるとき、特定の抗体-抗原の相互作用の平衡解離定数を指すことが意図される。

【0133】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして公知の抗体分子の可変領域内の特定の抗原結合部位と相互作用する、抗原性決定基を指す。単一の抗原は、1つを上回るエピトープを有し得る。したがって、異なる抗体が、抗原上の異なる領域に結合し得、異なる生物学的作用を有し得る。「エピトープ」という用語はまた、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位も指す。これは、抗体が結合する抗原の領域も指す。エピトープは、構造的または機能的として定義され得る。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的に寄与する残基を有する。エピトープはまた、立体構造的であってもよく、すなわち、非線形のアミノ酸から構成されてもよい。ある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、またはスルホニル基など、分子の化学的に活性な表面分類（surface grouping）である決定基を含んでもよく、ある特定の実施形態では、特定の三次元構造特徴および/または特定

40

50

の電荷特徴を有し得る。

【0134】

核酸またはその断片に言及する場合の「実質的な同一性」または「実質的に同一」という用語は、適切なヌクレオチドの挿入または欠失を用いて、別の核酸（またはその相補鎖）と最適にアライメントしたときに、配列同一性に関する任意の周知のアルゴリズム、たとえば、以下に考察されるFASTA、BLAST、またはGAPによって測定される場合、ヌクレオチド塩基の少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%に、ヌクレオチド配列同一性が存在することを示す。参照核酸分子に対して実質的な同一性を有する核酸分子は、ある特定の事例では、参照核酸分子によってコードされるポリペプチドと同じかまたは実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

10

【0135】

ポリペプチドに適用されるとき、「実質的な類似性」または「実質的に類似」という用語は、2つのペプチド配列が、たとえば、デフォルトのギャップ加重を使用してGAPまたはBESTFITプログラムによって最適にアライメントした場合に、少なくとも90%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%、98%、または99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基の位置は、保存的アミノ酸置換により異なっている。

【0136】

「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸残基が、化学的特性（たとえば、電荷または疎水性）が類似の側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されるものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。2つまたはそれよりも多くのアミノ酸配列が、保存的置換により互いに異なっている場合には、類似性のパーセントまたは程度は、置換の保存的性質に関して補正するように、上方調節され得る。この調節を行うための手段は、当業者に周知である。たとえば、Pearson、（1994年）、Methods Mol. Biol.、24巻：307～331頁を参照されたく、これは、参照により本明細書に組み込まれる。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例としては、1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、2）脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリンおよびスレオニン、3）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、5）塩基性側鎖：リシン、アルギニン、およびヒスチジン、6）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに7）硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換の群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、およびアスパラギン-グルタミンである。あるいは、保存的置換は、参照により本明細書に組み込まれるGonnetら、（1992年）、Science、256巻：1443～45頁に開示されている、PAM250対数尤度行列において正の値を有する任意の変化である。「中等度に保存的な」置換は、PAM250対数尤度行列において負ではない値を有する任意の変化である。

20

30

【0137】

ポリペプチドの配列類似性は、典型的に、配列分析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含め、様々な置換、欠失、および他の修飾に割り当てられた類似性の尺度を使用して、類似の配列を対応させる。たとえば、GCGソフトウェアは、GAPおよびBESTFITなどのプログラムを含み、これらのプログラムをデフォルトのパラメーターでを使用して、緊密に関連するポリペプチド、たとえば、異なる生物種に由来する同種ポリペプチド間または野生型タンパク質とその変異型タンパク質との間の配列相同性または配列同一性を判定することができる。たとえば、GCGバージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列はまた、GCGバージョン6.1中のプログラムであるFASTAを、デフォルトまたは推奨されるパラメーターでを使用して、比較することができる。FASTA（たとえば、FASTA2およびFAST

40

50

A 3) により、問い合わせ配列と検索配列との間で最も良好にオーバーラップする領域のアライメントおよび配列同一性パーセントが得られる (Pearson、(2000年)、上記)。本発明の配列を、異なる生物に由来する多数の配列を含むデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、コンピュータプログラム BLAST、特に、BLASTP または TBLASTN をデフォルトパラメーターで使用するものである。たとえば、Altschulら、(1990年)、J. Mol. Biol.、215巻: 403~410頁および(1997年)、Nucleic Acids Res.、25巻: 3389~3402頁を参照されたく、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0138】

特定の実施形態では、本発明の方法において使用するための抗体または抗体断片は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であってもよく、または1つを上回る標的ポリペプチドのエピトープに特異的な抗原結合ドメインを含んでもよい。本発明の状況において使用することができる例示的な二重特異性抗体の形式は、第1の免疫グロブリン(Ig) C<sub>H</sub>3ドメインおよび第2のIg C<sub>H</sub>3ドメインの使用を伴い、ここで、第1および第2のIg C<sub>H</sub>3ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸が互いに異なり、少なくとも1つのアミノ酸の相違により、この二重特異性抗体の、プロテインAへの結合は、アミノ酸の相違が欠如している二重特異性抗体と比較して、低減される。一実施形態では、第1のIg C<sub>H</sub>3ドメインは、プロテインAに結合し、第2のIg C<sub>H</sub>3ドメインは、プロテインAへの結合を低減または無効にする変異、たとえば、H95R修飾(IMGTEクソン番号付けによるものであり、EU番号付けではH435R)を含む。第2のC<sub>H</sub>3は、Y96F修飾(IMGTEによるものであり、EUではY436F)をさらに含み得る。第2のC<sub>H</sub>3内に見出され得るさらなる修飾としては、IgG1 mAbの事例ではD16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I(IMGTEによるものであり、EUではD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I)、IgG2 mAbの事例ではN44S、K52N、およびV82I(IMGTE、EUではN384S、K392N、およびV422I)、ならびにIgG4 mAbの事例ではQ15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I(IMGTEによるものであり、EUではQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I)が挙げられる。上述の二重特異性抗体の形式における変化形は、本発明の範囲内であることが企図される。

#### 【0139】

別途具体的に示されない限り、「抗体」という用語は、本明細書において使用されるとき、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖を含む抗体分子(すなわち、「完全抗体分子」)、ならびにその抗原結合性断片を包含することを理解されたい。抗体の「抗原結合性部分」、抗体の「抗原結合性断片」などの用語は、本明細書において使用されるとき、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然に存在する、酵素反応により得ることができる、合成または遺伝子工学的操作を加えたポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の「抗原結合性断片」または「抗体断片」という用語は、本明細書において使用されるとき、ヒトGREM1に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体断片としては、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、dAb断片、CDRを含む断片、または単離されたCDRを挙げることができる。抗体の抗原結合性断片は、任意の好適な標準的技法、たとえば、タンパク質分解消化または抗体の可変ドメインおよび(任意選択で)定常ドメインをコードするDNAの操作および発現を伴う組換え遺伝子工学的操作技法を使用して、たとえば、完全抗体分子から導出され得る。そのようなDNAは、公知であり、かつ/またはたとえば商業的供給源、DNAライブラリー(たとえば、ファージ-抗体ライブラリーを含む)から容易に入手することができるか、もしくは合成することができる。DNAを、シークエンシングし、化学的にかまたは分子生物学的技法を使用して操作して、たとえば、1つまたは複数の可変ドメインおよび/または定常ドメインを、好適な構成に配置するか、またはコドンを導入



し、システイン残基を作成し、アミノ酸を修飾、付加、もしくは欠失するなどしてもよい。

#### 【0140】

抗原結合性断片の非限定的な例としては、(i) Fab断片、(ii) F(ab')<sub>2</sub>断片、(iii) Fd断片、(iv) Fv断片、(v) 一本鎖Fv(scFv)分子、(vi) dAb断片、および(vii) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小限の認識単位(たとえば、単離された相補性決定領域(CDR)、たとえば、CDR3ペプチド)または構造制限(constrained)FR3 - CDR3 - FR4ペプチドが挙げられる。他の工学的操作を加えた分子、たとえば、ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ(たとえば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど)、小モジュラー免疫薬(SMIP)、およびサメ可変IgNARDメインもまた、本明細書において使用されるとき、「抗原結合性断片」という表現に包含される。

10

#### 【0141】

抗体の抗原結合性断片は、典型的に、少なくとも1つの可変ドメインを含むであろう。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成のものであってよく、一般に、1つまたは複数のフレームワーク配列に隣接するかまたはそれとインフレームである少なくとも1つのCDRを含むであろう。V<sub>L</sub>ドメインと会合したV<sub>H</sub>ドメインを有する抗原結合性断片では、V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインは、互いに対して、任意の好適な配置に位置され得る。たとえば、可変領域は、二量体であり得、V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>、またはV<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>の二量体を含み得る。あるいは、抗体の抗原結合性断片は、単量体のV<sub>H</sub>ドメインまたはV<sub>L</sub>ドメインを含んでもよい。

20

#### 【0142】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合性断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合で連結された少なくとも1つの可変ドメインを含み得る。本発明の抗体の抗原結合性断片内に見出され得る可変ドメインおよび定常ドメインの非限定的で例示的な構成としては、(i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1、(ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2、(iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3、(iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2、(v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3、(vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3、(vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>、(viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1、(ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2、(x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3、(xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2、(xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3、(xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3、および(xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>が挙げられる。上記に列挙された例示的な構成のうちのいずれかを含め、可変ドメインおよび定常ドメインのいずれの構成においても、可変ドメインおよび定常ドメインは、互いに直接的に連結され得るか、または完全もしくは部分的なヒンジもしくはリンカー領域によって連結され得る。ヒンジ領域は、少なくとも2個(たとえば、5個、10個、15個、20個、40個、60個、またはそれよりも多い)アミノ酸からなり得、これにより、単一のポリペプチド分子において隣接する可変ドメインおよび/または定常ドメインの間に可動性または半可動性の連結がもたらされる。さらに、本発明の抗体の抗原結合性断片は、互いにおよび/または1つもしくは複数の単量体V<sub>H</sub>もしくはV<sub>L</sub>ドメインと非共有結合により会合した(たとえば、ジスルフィド結合による)、上記に列挙された可変ドメインおよび定常ドメインの構成のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体(または他の多量体)を含み得る。

30

40

#### 【0143】

完全抗体分子と同様に、抗原結合性断片は、単一特異性または多重特異性(たとえば、二重特異性)であり得る。抗体の多重特異性抗原結合性断片は、典型的に、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含むことになり、ここで、それぞれの可変ドメインは、別個の抗原、または同じ抗原上の異なるエピトープに、特異的に結合することができる。本明細書において開示される例示的な二重特異性抗体形式を含め、いずれの多重特異性抗体形式も、当該技術分野において利用可能な日常的な技法を使用して、本発明の抗体の抗原結合性断片の状況において使用するために適合され得る。

50

## 【0144】

本発明において使用するための抗ヒトGREM1抗体および抗体断片は、記載される抗体のアミノ酸配列とは異なるが、ヒトGREM1に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。そのようなパリアント抗体および抗体断片は、親配列と比較した場合に、1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含むが、記載される抗体のものと本質的に同等な生物学的活性を呈する。同様に、本発明の抗体をコードするDNA配列は、開示される配列と比較した場合に、1つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失、または置換を含むが、本発明の抗体または抗体断片と本質的に生物学的に同等である抗体または抗体断片をコードする、配列を包含する。

## 【0145】

2つの抗原結合性タンパク質または抗体は、たとえば、単回用量または複数回用量のいずれかで、類似の実験条件下において、同じモル用量で投与された場合に、吸収の速度および程度に有意差を示さない薬学的同等物または薬学的代替物であれば、生物学的に同等であると考えられる。一部の抗体は、吸収の程度は同等であるが吸収の速度は同等ではなく、それでも、吸収の速度におけるそのような差が意図したものであり、表示に反映されており、たとえば、慢性的な使用時に、有効な体内薬物濃度の達成にとって必須ではなく、研究される特定の薬物製品にとって医薬上重要でないと考えられるために、依然として生物学的に同等であると考えられることができる場合に、同等物または薬学的代替物と考えられるであろう。

## 【0146】

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質は、それらの安全性、純度、および効力に臨床的に意味のある差がない場合に、生物学的に同等である。

## 【0147】

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質は、参照製品と生物学的製品との間で1回または複数回の切り替えを行わずに継続される治療法と比較して、免疫原性における臨床上有意味な変化を含め、悪影響の危険性の増加または有効性の減少が予測されることなく、患者にそのような切り替えを行うことができる場合、生物学的に同等である。

## 【0148】

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質は、両方が、使用の条件（単数または複数）に対して、共通の作用機序（単数または複数）によって、そのような作用機序が公知である程度で作用する場合、生物学的に同等である。

## 【0149】

生物学的同等性は、*in vivo*および/または*in vitro*の方法によって実証され得る。生物学的同等性の尺度としては、たとえば、(a)血液、血漿、血清、または他の体液中の抗体またはその代謝産物の濃度を時間の関数として測定する、ヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験、(b)ヒト*in vivo*バイオアベイラビリティデータと相関付けられており、それを妥当に予測する、*in vitro*試験、(c)抗体（またはその標的）の適切な急性薬理学的作用を時間の関数として測定する、ヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験ならびに(d)抗体の安全性、有効性、またはバイオアベイラビリティもしくは生物学的同等性を構築する、十分に管理された臨床試験が挙げられる。

## 【0150】

本発明の抗体の生物学的に同等なパリアントは、たとえば、残基もしくは配列の様々な置換を行うこと、または生物学的活性に必要な末端もしくは内部の残基もしくは配列を欠失させることによって、構築することができる。たとえば、生物学的活性に必須ではないシステイン残基を、欠失させるか、または他のアミノ酸と置き換えて、再生時の不必要または不正な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することができる。別の状況では、生物学的に同等な抗体には、抗体のグリコシル化特徴を修飾するアミノ酸変化、たとえば、グリコシル化を排除または除去する変異を含む抗体パリアントが含まれ得る。

## 【0151】

本発明のある特定の実施形態によると、本発明の方法において使用するための抗GREM1抗体は、たとえば、中性pHと比較して酸性pHにおいて、抗体のFcRn受容体への結合を強化または減少させる、1つまたは複数の変異を含むFcドメインを含む。たとえば、本発明は、FcドメインのCH2またはCH3領域に変異を含む抗GREM1抗体を含み、ここで、この変異は、酸性環境において（たとえば、pHが、約5.5～約6.0の範囲であるエンドソームにおいて）、FcドメインのFcRnに対する親和性を増加させる。そのような変異は、動物に投与される場合、抗体の血清半減期の増加をもたらし得る。そのようなFc修飾の非限定的な例としては、たとえば、250位（たとえば、EもしくはQ）における修飾；250位および428位（たとえば、LもしくはF）；252位（たとえば、L/Y/F/WもしくはT）、254位（たとえば、SもしくはT）、および256位（たとえば、S/R/Q/E/DもしくはT）；または428位および/もしくは433位（たとえば、H/L/R/S/P/QもしくはK）および/もしくは434位（たとえば、A、W、H、F、もしくはY[N434A、N434W、N434H、N434F、もしくはN434Y]）における修飾；または250位および/もしくは428位における修飾；または307位もしくは308位（たとえば、308F、V308F）、および434位における修飾が挙げられる。一実施形態では、修飾は、428L（たとえば、M428L）および434S（たとえば、N434S）修飾；428L、2591（たとえば、V259I）、および308F（たとえば、V308F）修飾；433K（たとえば、H433K）および434（たとえば、434Y）修飾；252、254、および256（たとえば、252Y、254T、および256E）修飾；250Qおよび428L修飾（たとえば、T250QおよびM428L）；ならびに307および/または308修飾（たとえば、308Fまたは308P）を含む。さらに別の実施形態では、修飾は、265A（たとえば、D265A）および/または297A（たとえば、N297A）修飾を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0152】

たとえば、本発明は、250Qおよび248L（たとえば、T250QおよびM248L）；252Y、254T、および256E（たとえば、M252Y、S254T、およびT256E）；428Lおよび434S（たとえば、M428LおよびN434S）；257Iおよび3111（たとえば、P257IおよびQ3111）；2571および434H（たとえば、P257IおよびN434H）；376Vおよび434H（たとえば、D376VおよびN434H）；307A、380A、および434A（たとえば、T307A、E380A、およびN434A）；ならびに433Kおよび434F（たとえば、H433KおよびN434F）からなる群から選択される変異の1つまたは複数のペアまたは群を含むFcドメインを含む、抗GREM1抗体を含む。前述のFcドメイン変異のすべての可能性のある組合せおよび本明細書において開示される抗体可変ドメイン内の他の変異は、本発明の範囲内に含まれることが企図される。

#### 【0153】

本発明はまた、キメラ重鎖定常（CH）領域を含む抗GREM1抗体を含み、ここで、キメラCH領域は、1つを上回る免疫グロブリンアイソタイプのCH領域に由来するセグメントを含む。たとえば、本発明の抗体は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4分子に由来するCH2ドメインの一部またはすべてを、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4分子に由来するCH3ドメインの一部またはすべてと組み合わせたものを含む、キメラCH領域を含み得る。ある特定の実施形態によると、本発明の抗体は、キメラヒンジ領域を有するキメラCH領域を含む。たとえば、キメラヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」アミノ酸配列（EU番号付けによる216位～227位のアミノ酸残基）が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列（EU番号付けによる228位～236位のアミノ酸残基）と組み合わせられたものを含み得る。

#### 【0154】

ある特定の実施形態によると、キメラヒンジ領域は、ヒトIgG1またはヒトIgG4

上部ヒンジに由来するアミノ酸残基、ならびにヒト 1 g G 2 下部ヒンジに由来するアミノ酸残基を含む。本明細書において記載されるキメラ C<sub>H</sub> 領域を含む抗体は、ある特定の実施形態では、抗体の治療的特性または薬物動態特性に悪影響を及ぼすことなく、修飾された Fc エフェクター機能を呈し得る。(たとえば、2013 年 2 月 1 日に出願された米国仮出願第 61/759,578 号を参照されたく、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0155】

一般に、本発明の方法において使用するための抗体は、ヒト GREM1 に結合することによって機能し得る。一部の実施形態では、本発明の抗体は、ヒト GREM1 の触媒ドメインまたはその断片に結合し得る。一部の実施形態では、本発明の抗体は、ヒト GREM1 の分泌形態またはヒト GREM1 の膜結合形態に結合し得る。一部の実施形態では、本発明の抗体は、1 つを上回るドメインに結合し得る(交差反応性抗体)。

10

【0156】

本発明のある特定の実施形態では、抗体は、配列番号 594 または配列番号 595 のアミノ酸残基 25 ~ 184 の間の領域に位置するエピトープに結合し得る。

【0157】

ある特定の実施形態では、本発明の方法において使用するための抗体は、全長天然タンパク質の任意の他の領域または断片に結合することにより BMP シグナル伝達を遮断または阻害することによって機能し得、このタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 594 に示されており、これは、配列番号 593 に示される核酸配列によってコードされる。一実施形態では、本発明の抗体は、全長 GREM1 またはその断片に結合することにより BMP 2、BMP 4、または BMP 7 の阻害を好転させることによって、機能し得る。一部の実施形態では、本発明の抗体は、BMP シグナル伝達を促進することによって機能し得るか、または GREM1 と、BMP 2、BMP 4、もしくは BMP 7 を含む BMP との間の結合を遮断し得る。

20

【0158】

ある特定の実施形態では、本発明の方法において使用するための抗体は、GREM1 のヘパリンへの結合を遮断することによって、および/またはヘパリンにより媒介される VEGFR-2 の活性化を阻害することによって、機能し得る。

【0159】

ある特定の実施形態では、本発明の方法において使用するための抗体は、二重特異性抗体であり得る。本発明の二重特異性抗体は、1 つのドメイン内の 1 つのエピトープに結合し得、ヒト GREM1 の第 2 のドメイン内の 1 つのエピトープにも結合し得る。ある特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、同じドメイン内の 2 つの異なるエピトープに結合し得る。

30

【0160】

一実施形態では、ヒト GREM1 に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片は、本発明の方法において使用することができ、ここで、この抗体またはその断片は、以下の特徴のうちの 1 つまたは複数を呈する：(i) 配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466、482、498、514、530、546、562、および 578 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する HCV R を含むこと、(ii) 配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474、490、506、522、538、554、570、および 586 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも

40

50

も 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C V R を含むこと、( i i i ) 配列番号 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344、360、376、392、408、424、440、456、472、488、504、520、536、552、568、および 584 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 3 ドメイン、ならびに配列番号 16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352、368、384、400、416、432、448、464、480、496、512、528、544、560、576、および 592 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 3 ドメインを含むこと、( i v ) 配列番号 4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340、356、372、388、404、420、436、452、468、484、500、516、532、548、564、および 580 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 1 ドメイン、配列番号 6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342、358、374、390、406、422、438、454、470、486、502、518、534、550、566、および 582 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 2 ドメイン、配列番号 12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348、364、380、396、412、428、444、460、476、492、508、524、540、556、572、および 588 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 1 ドメイン、ならびに配列番号 14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350、366、382、398、414、430、446、462、478、494、510、526、542、558、574、および 590 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 2 ドメインを含むこと、( v )  $10^{-7}$  またはそれよりも低い  $K_D$  で、G R E M 1 に結合すること、( v i ) G R E M 1 の、B M P 2、B M P 4、または B M P 7 のうちの 1 つへの結合を遮断すること、( v i i ) G R E M 1 による B M P シグナル伝達の阻害を遮断し、細胞分化を促進すること、ならびに ( v i i i ) G R E M 1 のヘパリンへの結合を遮断すること。

#### 【0161】

本発明の方法において使用するためのある特定の抗 G R E M 1 抗体は、i n v i t r o または i n v i v o アッセイによって判定される場合、G R E M 1 に結合し、その活性を中和することができる。本発明の抗体が G R E M 1 に結合し、その活性を中和する能力は、本明細書において記載される結合アッセイまたは活性アッセイを含む、当業者に公知の任意の標準的な方法を使用して、測定することができる。

#### 【0162】

10

20

30

40

50

結合活性を測定するための非限定的で例示的な *in vitro* アッセイとしては、たとえば、T200 Biacore 機器において実行される表面プラズモン共鳴が挙げられる。遮断アッセイは、抗 GREM1 抗体が、*in vitro* で GREM1 の BMP4 結合能力を遮断する能力を判定するために使用することができる。BMP4 シグナル伝達および BMP4 シグナル伝達に応答した骨芽細胞前駆細胞の細胞分化を促進することにおける抗 GREM1 抗体の活性は、本明細書において記載される抗 GREM1 抗体を使用して、GREM1 - ヘパリンの結合相互作用の阻害として評価することができる。

#### 【0163】

本発明はまた、本発明の方法において使用するための、以下のタンパク質またはペプチドのうちのいずれかの少なくとも1つの生物学的に活性な断片に結合する、抗 GREM1 抗体およびその抗原結合性断片を含む：配列番号594（全長天然ヒト GREM1）または配列番号595（ヒト GREM1 の組換え形態）。本明細書において記載される GREM1 ペプチドまたはそれらの断片のいずれも、抗 GREM1 抗体を生成するために使用することができる。

10

#### 【0164】

ペプチドは、担体分子、たとえば、KLH のタグ付けまたはそれらへのコンジュゲーションの目的で、ある特定の残基の付加または置換を含むように修飾され得る。たとえば、システインが、ペプチドの N 末端もしくは C 末端のいずれかに付加され得るか、またはたとえば、免疫処置のために KLH にコンジュゲーションするように、ペプチドを調製するために、リンカー配列が付加され得る。

20

#### 【0165】

GREM1 に特異的な抗体は、追加の標識もしくは部分を含まなくてもよく、または N 末端もしくは C 末端の標識もしくは部分を含んでもよい。一実施形態では、標識または部分は、ビオチンである。結合アッセイでは、標識の位置により（存在する場合）、ペプチドが結合する表面に対するペプチドの配向が決定され得る。たとえば、表面がアビジンでコーティングされている場合、N 末端のビオチンを含むペプチドは、ペプチドの C 末端部分が表面に対して遠位となるように配向されるであろう。一実施形態では、標識は、放射性核種、蛍光色素、または MRI で検出可能な標識であり得る。ある特定の実施形態では、そのような標識化された抗体は、イメージングアッセイを含む、診断アッセイにおいて使用され得る。

30

#### 【0166】

本発明は、GREM1 の1つまたは複数の領域内に見出される1つまたは複数のアミノ酸と相互作用する、抗 GREM1 抗体の使用を含む。抗体が結合するエピトープは、GREM1 分子の前述の領域のうちのいずれか内に位置する3個またはそれよりも多い（たとえば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、またはそれよりも多い）アミノ酸の単一の連続した配列からなり得る（たとえば、あるドメイン内の線形エピトープ）。あるいは、エピトープは、GREM1 分子の前述の領域のうちのいずれかまたは両方に位置する複数の非連続的なアミノ酸（またはアミノ酸配列）からなってもよい（たとえば、立体構造エピトープ）。

40

#### 【0167】

当業者に公知の様々な技法を使用して、抗体が、ポリペプチドまたはタンパク質内の「1つまたは複数のアミノ酸と相互作用する」かどうかを判定することができる。例示的な技法としては、たとえば、日常的な交差遮断アッセイ、たとえば、Antibodies、Harlow および Lane（Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、NY）に記載されているものが挙げられる。他の方法としては、アラニンスキャニング変異分析、ペプチドプロット分析（Reineke、（2004年）、Methods Mol Biol、248巻：443～63頁）、ペプチド切断分析、結晶学的研究、および NMR 分析が挙げられる。加えて、エピトープ切除、エピトープ抽出、および抗原の化学修飾といった方法を、用いることができる（Tomer、（2000年）、Protein Science、9巻：487～496頁）。抗体が相互

50

作用するポリペプチド内のアミノ酸を特定するために使用することができる別の方法は、質量分析法によって検出される水素/重水素交換である。一般的に述べると、水素/重水素交換法は、目的のタンパク質を重水素で標識した後、抗体を、重水素標識したタンパク質に結合させることを伴う。次いで、タンパク質/抗体の複合体を、水中に移し、抗体複合体によって保護されているアミノ酸内の交換可能なプロトンが、接合部の一部ではないアミノ酸内の交換可能なプロトンよりも遅い速度で、重水素から水素への逆交換を受ける。結果として、タンパク質/抗体の接合部の一部を形成しているアミノ酸は、重水素を保持することができ、したがって、接合部に含まれないアミノ酸と比べると、比較的高い質量を呈する。抗体の解離後に、標的タンパク質を、プロテアーゼ切断および質量分析法に供し、それによって、抗体が相互作用する特定のアミノ酸に対応する重水素標識した残基が判明する。たとえば、Ehring、(1999年)、Analytical Biochemistry、267巻(2号): 252~259頁、EngenおよびSmith、(2001年)、Anal. Chem.、73巻: 256A~265A頁を参照されたい。

10

#### 【0168】

「エピトープ」という用語は、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、連続的なアミノ酸またはタンパク質の三次元フォールディングによって並置される非連続的なアミノ酸の両方から形成され得る。連続的なアミノ酸から形成されるエピトープは、典型的に、変性溶媒に曝露された際に保持されるが、三次元フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的に、変性溶媒での処置の際に失われる。エピトープは、固有の空間立体構造において、典型的には少なくとも3個のアミノ酸を含み、より通例的には少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。

20

#### 【0169】

抗原構造に基づく抗体プロファイリング(A S A P)としても公知の、修飾支援型プロファイリング(M A P)は、同じ抗原を対象とする多数のモノクローナル抗体(m A b)を、化学的または酵素的に修飾した抗原表面に対するそれぞれの抗体の結合プロファイルの類似性によって類別する方法である(たとえば、米国特許公開第2004/0101920号を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる)。それぞれのカテゴリーは、別のカテゴリーによって示されるエピトープとははっきりと異なるかまたはそれと部分的にオーバーラップするかのいずれかである固有のエピトープを反映し得る。この技術は、特徴付けの焦点を遺伝子的に異なる抗体に当てることができるように、遺伝子的に同一な抗体を迅速にフィルタリングすることが可能である。ハイブリドーマのスクリーニングに適用する場合、M A Pは、所望される特徴を有するm A bを産生する希少なハイブリドーマクローンの特定を容易にすることができる。M A Pを使用して、本発明の抗体を、異なるエピトープに結合する複数の抗体群に分類することができる。

30

#### 【0170】

ある特定の実施形態では、本発明の方法において使用するための抗G R E M 1抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号594において例証される天然の形態、または配列番号595において例証される組換え産生されたもののいずれかであるG R E M 1において例証される領域のうちのいずれか1つまたは複数内のエピトープまたはその断片に結合する。ある特定の実施形態では、表1に示されるような、本発明の方法において使用するための抗体は、配列番号594の約1位~約24位の範囲のアミノ酸残基、または配列番号594の約25位~約184位の範囲のアミノ酸残基からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列と相互作用する。これらの領域は、配列番号595にさらに例証されている。

40

#### 【0171】

本発明は、本明細書において表1に記載されている特定の例示的な抗体のうちのいずれか、または表1に記載されている例示的な抗体のうちのいずれかのC D R配列を有する抗体と、同じエピトープまたはエピトープの一部分に結合する、抗ヒトG R E M 1抗体の使用を含む。同様に、本発明はまた、G R E M 1またはG R E M 1断片への結合に関して、

50

本明細書において表 1 に記載される特定の例示的な抗体のうちのいずれか、または表 1 に記載される例示的な抗体のうちのいずれかの C D R 配列を有する抗体と競合する、抗ヒト G R E M 1 抗体を含む。

#### 【 0 1 7 2 】

当該技術分野において公知の日常的な方法を使用することによって、ある抗体が、参照抗 G R E M 1 抗体と同じエピトープに結合するかどうか、または結合に関してそれと競合するかどうかを、容易に判定することができる。たとえば、試験抗体が、本発明の参照抗 G R E M 1 抗体と同じエピトープに結合するかどうかを判定するために、参照抗体を、飽和条件下において、G R E M 1 タンパク質またはペプチドに結合させる。次いで、試験抗体が、G R E M 1 分子に結合する能力を、評価する。試験抗体が、参照抗 G R E M 1 抗体による結合が飽和した後に G R E M 1 に結合することができる場合、それは、試験抗体が、参照抗 G R E M 1 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。一方で、試験抗体が、参照抗 G R E M 1 抗体による結合が飽和した後に G R E M 1 タンパク質に結合できない場合、試験抗体は、本発明の参照抗 G R E M 1 抗体が結合したエピトープと同じエピトープに結合し得る。

10

#### 【 0 1 7 3 】

ある抗体が、結合に関して、参照抗 G R E M 1 抗体と競合するかどうかを判定するために、上述の結合手法を、2つの方向で行う。第1の方向では、参照抗体を、飽和条件下において G R E M 1 タンパク質に結合させた後、試験抗体の G R E M 1 分子への結合の評価を行う。第2の方向では、試験抗体を、飽和条件下において G R E M 1 分子に結合させた後、参照抗体の G R E M 1 分子への結合の評価を行う。いずれの方向においても、第1の（飽和している）抗体のみが、G R E M 1 分子に結合することができる場合は、試験抗体および参照抗体が、G R E M 1 への結合に関して競合すると結論付けられる。当業者には理解されるように、結合に関して参照抗体と競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープに結合し得るわけではないが、オーバーラップするかまたは隣接するエピトープに結合することによって、参照抗体の結合を空間的に遮断する場合がある。

20

#### 【 0 1 7 4 】

2つの抗体は、それぞれが、他方が抗原に結合するのを競合的に阻害（遮断）する場合、同じかまたはオーバーラップするエピトープに結合する。すなわち、1倍、5倍、10倍、20倍、または100倍過剰量の一方の抗体は、競合的結合アッセイにおいて測定される場合、他方の結合を、少なくとも50%阻害するが、好ましくは、75%、90%、またはさらには99%阻害する（たとえば、Junghansら、Cancer Res.、1990年、50巻：1495～1502頁を参照されたい）。あるいは、2つの抗体は、一方の抗体の結合を低減または排除する抗原における本質的にすべてのアミノ酸変異が、他方の結合を低減または排除する場合に、同じエピトープを有する。2つの抗体は、一方の抗体の結合を低減または排除する一部のアミノ酸変異が、他方の結合を低減または排除する場合に、オーバーラップするエピトープを有する。

30

#### 【 0 1 7 5 】

次いで、追加の日常的な実験（たとえば、ペプチド変異および結合分析）を行って、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起因するかどうか、または立体的遮断（もしくは別の現象）が、観察された結合の欠如の原因であるかどうかを確認することができる。この種類の実験は、E L I S A、R I A、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当該技術分野において利用可能な任意の他の定量的もしくは定性的な抗体結合アッセイを使用して、行うことができる。

40

#### 【 0 1 7 6 】

本発明は、治療的部分にコンジュゲートしたヒト抗 G R E M 1 モノクローナル抗体（「イムノコンジュゲート」）の使用を包含する。本明細書において使用されるとき、「イムノコンジュゲート」という用語は、放射性薬剤、サイトカイン、インターフェロン、標的もしくはレポーター部分、酵素、毒素、または治療剤に化学的または生物学的に連結された抗体を指す。抗体は、その標的に結合することができる限り、分子上の任意の位置にお

50



いて、放射性薬剤、サイトカイン、インターフェロン、標的もしくはレポーター部分、酵素、毒素、または治療剤に連結され得る。イムノコンジュゲートの例は、抗体薬物コンジュゲートである。一部の実施形態では、薬剤は、ヒト G R E M 1、またはサイトカイン、たとえば、I L - 1、I L - 6、またはケモカイン、たとえば、T G F - に対する第 2 の別の抗体であってもよい。抗 G R E M 1 抗体にコンジュゲートされ得る治療的部分の種類は、処置しようとする状態および達成しようとする所望される治療的效果を考慮したものである。イムノコンジュゲートを形成するのに好適な薬剤の例は、当該技術分野において公知であり、たとえば、国際公開第 0 5 / 1 0 3 0 8 1 号を参照されたい。イムノコンジュゲートおよびイムノトキシンの調製は、概して、当該技術分野において周知である（たとえば、米国特許第 4 , 3 4 0 , 5 3 5 号を参照されたい）。イムノコンジュゲートは、たとえば、米国特許第 7 , 2 5 0 , 4 9 2 号、同第 7 , 4 2 0 , 0 4 0 号、および同第 7 , 4 1 1 , 0 4 6 号に詳細に記載されており、これらのそれぞれは、その全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 7 7 】

本発明の方法において使用するための抗体は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性であり得る。多重特異的抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であってもよく、または1つを上回る標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含んでもよい。たとえば、Tuttら、1991年、J. Immunol.、147巻：60～69頁、Kuferら、2004年、Trends Biotechnol.、22巻：238～244頁を参照されたい。本発明の抗体は、別の機能的分子、たとえば、別のペプチドまたはタンパク質に連結され得るか、またはそれと共発現され得る。たとえば、抗体またはその断片は、1つまたは複数の他の分子実体、たとえば、別の抗体または抗体断片に機能的に連結されて（たとえば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合による会合、またはその他の方法によって）、第2の結合特異性を有する二重特異性または多重特異性抗体が産生され得る。たとえば、本発明は、免疫グロブリンの一方のアームが、G R E M 1 の N 末端領域またはその断片に特異的であり、免疫グロブリンの他方のアームが、G R E M 1 の C 末端領域もしくは第2の治療標的に特異的であるか、または治療的部分にコンジュゲートされている、二重特異性抗体を含む。本発明の状況において使用することができる例示的な二重特異性抗体の形式は、第1の免疫グロブリン（I g）C<sub>H</sub>3ドメインおよび第2のI g C<sub>H</sub>3ドメインの使用を伴い、ここで、第1および第2のI g C<sub>H</sub>3ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸が互いに異なり、少なくとも1つのアミノ酸の相違により、この二重特異性抗体の、プロテインAへの結合は、アミノ酸の相違が欠如している二重特異性抗体と比較して、低減される。一実施形態では、第1のI g C<sub>H</sub>3ドメインは、プロテインAに結合し、第2のI g C<sub>H</sub>3ドメインは、プロテインAへの結合を低減または無効にする変異、たとえば、H95R修飾（I M G T エクソン番号付けによるものであり、E U 番号付けではH435R）を含む。第2のC<sub>H</sub>3は、Y96F修飾（I M G T によるものであり、E U ではY436F）をさらに含み得る。第2のC<sub>H</sub>3内に見出され得るさらなる修飾としては、I g G 1 抗体の事例ではD16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I（I M G T によるものであり、E U ではD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I）、I g G 2 抗体の事例ではN44S、K52N、およびV82I（I M G T のものであり、E U ではN384S、K392N、およびV422I）、ならびにI g G 4 抗体の事例ではQ15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I（I M G T によるものであり、E U ではQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I）が挙げられる。上述の二重特異性抗体の形式における変化形は、本発明の範囲内であることが企図される。

#### 【 0 1 7 8 】

本発明の状況において使用することができる他の例示的な二重特異性の形式としては、限定することなく、たとえば、s c F v に基づくものもしくはダイアボディ二重特異性形式、I g G - s c F v 融合体、二重可変ドメイン（D V D）- I g、クアドローマ、ノブ

・イントゥ・ホール (knobs-into-holes)、共通軽鎖 (たとえば、ノブ・イントゥ・ホールを有する共通軽鎖など)、Cross Mab、Cross Fab、(シード) ボディ、ロイシンジッパー、デュオボディ、lg G 1 / lg G 2、二重作用 Fab (DAF) - lg G、および Mab<sup>2</sup> 二重特異性形式が挙げられる (上述の形式の考察については、たとえば、Kleinら、2012 年、mAbs、4 巻: 6 号、1 ~ 11 頁、およびそこに引用されている参考文献を参照されたい)。二重特異性抗体はまた、ペプチド / 核酸コンジュゲーションを使用して構築することもでき、たとえば、直交的化学反応性を有する非天然のアミノ酸を使用して、部位特異的抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを生成し、これを、次いで、自己アセンブリして、既定の組成、価数、および幾何を有する多量体複合体にする。(たとえば、Kazaneら、J. Am. Chem. Soc.、[電子出版: 2012 年 12 月 4 日]を参照されたい)。

10

#### 【0179】

本発明の方法において使用するのに好適な完全ヒトモノクローナル抗 GREM1 抗体またはその抗原結合性断片を含め、モノクローナル抗体を生成するための方法は、当該技術分野において公知である。任意のそのような公知の方法を、本発明の状況において使用して、ヒト GREM1 に特異的に結合するヒト抗体を作製することができる。

#### 【0180】

ある特定の実施形態では、本発明において使用するための抗体またはその抗原結合性断片は、一次免疫原、たとえば、天然の全長ヒト GREM1 (たとえば、GenBank 受託番号 NP\_037504 (配列番号 594) を参照されたい) または GREM1 の組換え形態 (配列番号 595) もしくは GREM1 断片で免疫処置し、続いて、二次免疫原または GREM1 の免疫原的に活性な断片で免疫処置したマウスから得られる。

20

#### 【0181】

免疫原は、ヒト GREM1 の免疫原性断片またはその断片をコードする DNA であり得る。免疫原は、ヒスチジntag および / または抗体の Fc 領域の断片にカップリングされた GREM1 であってもよい。

#### 【0182】

全長ヒト GREM1 のアミノ酸配列 (GenBank 受託番号 NP\_037504 としても公知) は、配列番号 594 として示されている。組換え GREM1 の全長アミノ酸配列 (GREM1 のアミノ酸残基 25 ~ 184 が、Fc 領域およびヒスチジntag にカップリングされたもの) は、配列番号 595 として示されている。

30

#### 【0183】

GREM1 の全長 DNA 配列は、配列番号 593 として示されている。

#### 【0184】

ある特定の実施形態では、ヒト GREM1 に特異的に結合する抗体は、上述の領域の断片、または指定された領域を本明細書において記載される領域の N 末端もしくは C 末端のいずれかもしくは両方から約 5 ~ 約 20 個のアミノ酸残基分超えて伸長したペプチドを使用して、調製することができる。ある特定の実施形態では、上述の領域またはその断片の任意の組合せを、ヒト GREM1 特異的抗体の調製に使用することができる。ある特定の実施形態では、ヒト GREM1 の上述の領域またはその断片のうちの任意の 1 つまたは複数

40

#### 【0185】

トランスジェニックマウスにおいてヒト抗体を生成するための方法もまた、当該技術分野において公知である。任意のそのような公知の方法を、本発明の状況において使用して、ヒト GREM1 に特異的に結合するヒト抗体を作製することができる。

#### 【0186】

VELOCIMMUNE (商標) 技術 (たとえば、米国特許第 6,596,541 号、Regeneron Pharmaceuticals、VELOCIMMUNE (登録商標) を参照されたい) またはモノクローナル抗体を生成するための任意の他の公知の方

50

法を使用して、ヒト GREM1 に対する高い親和性の、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有するキメラ抗体を、まず、単離する。VELOCIIMMUNE（登録商標）技術は、マウスが、抗原刺激に応答して、ヒト可変領域およびマウス定常領域を含む抗体を産生するように、ヒト重鎖および軽鎖可変領域が内在性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたものを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスの生成を伴う。抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をコードする DNA を、単離し、ヒト重鎖および軽鎖の定常領域をコードする DNA に作動可能に連結させる。DNA を、次いで、完全ヒト抗体を発現することができる細胞において発現させる。

#### 【0187】

一般に、VELOCIIMMUNE（登録商標）マウスを、目的の抗原でチャレンジし、リンパ系細胞（たとえば、B 細胞）を、抗体を発現するマウスから回収する。リンパ系細胞を、骨髄腫細胞株と融合させて、不死化ハイブリドーマ細胞株を調製し、このようなハイブリドーマ細胞株を、スクリーニングおよび選択して目的の抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を特定することができる。重鎖および軽鎖の可変領域をコードする DNA を単離し、所望されるアイソタイプの重鎖および軽鎖の定常領域に連結させることができる。そのような抗体タンパク質を、細胞、たとえば、CHO 細胞において産生させることができる。あるいは、抗原特異的キメラ抗体または軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードする DNA を、抗原特異的リンパ球から直接的に単離してもよい。

#### 【0188】

まず、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高い親和性のキメラ抗体を単離する。下記の実験の節にあるように、抗体を、親和性、選択性、エピトープなどを含む、所望される特徴に関して特徴付け、選択する。マウス定常領域を、所望されるヒト定常領域と置き換えて、本発明の完全ヒト抗体、たとえば、野生型または修飾された IgG1 または IgG4 を生成する。選択される定常領域は、具体的な使用に応じて変動し得るが、高い親和性の抗原結合性および標的特異性の特徴は、可変領域に存在する。

#### 【0189】

一般に、本発明の方法において使用するための抗 GREM1 抗体は、非常に高い親和性を有し、典型的に、固相または液相のいずれかに固定化された抗原への結合によって測定される場合、約  $10^{-12}$  から約  $10^{-7}$  M の  $K_D$  を有する。抗体の定常領域は、具体的な使用に応じて変動し得るが、高い親和性の抗原結合性および標的特異性の特徴は、可変領域に存在する。

#### 【0190】

本発明の方法において使用するための抗 GREM1 抗体またはその抗原結合性断片は、医薬組成物において存在してもよい。そのような医薬組成物は、好適な担体、賦形剤、および改善された輸送、送達、耐容性などを提供する他の薬剤とともに製剤化される。多数の適切な製剤を、すべての薬剤師に公知の処方書において見出すことができる：Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、PA。これらの製剤としては、たとえば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー剤、ワックス、油、脂質、脂質（カチオン性またはアニオン性）含有小胞（たとえば、LIPOFECTIN（商標）、Life Technologies、Carlsbad、CA）、DNA コンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油型および油中水型エマルジョン、エマルジョンカーボワックス（様々な分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、およびカーボワックスを含む半固体混合物が挙げられる。Powellら、「Compendium of excipients for parenteral formulations」、PDA、J Pharm Sci Technol、52 巻：238～311 頁（1998 年）も参照されたい。

#### 【0191】

様々な送達システム、たとえば、リポソームへのカプセル封入、マイクロ粒子、マイクロカプセル、抗体を発現することができる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシスが公知であり、抗 GREM1 抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物を投与するために使用することができる（たとえば、Wuら、J Biol Chem、262 巻：4429～

10

20

30

40

50

4432頁(1987年)を参照されたい)。抗体はまた、遺伝子療法技法によって送達することもできる。導入の方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口の経路が挙げられるが、これらに限定されない。組成物は、任意の便宜的な経路によって、たとえば、注入またはボラス注射によって、上皮内層もしくは皮膚粘膜の内側(たとえば、口腔粘膜、直腸、および腸管粘膜など)からの吸収によって投与することができ、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与されてもよい。投与は、全身的であっても局所的であってもよい。

#### 【0192】

抗GREM1抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物は、標準的なニードルおよびシリンジを用いて、皮下または静脈内に送達され得る。加えて、皮下送達に関しては、ペン型送達デバイスが、容易に、本発明の医薬組成物の送達において適用性を有する。そのようなペン型送達デバイスは、再使用可能であっても使い捨てであってもよい。再使用可能なペン型送達デバイスは、一般に、医薬組成物を格納した交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内の医薬組成物のすべてが投与され、カートリッジが空になると、空のカートリッジを、容易に破棄し、医薬組成物を格納した新しいカートリッジと交換することができる。そうすると、ペン型送達デバイスは、再使用することができる。使い捨てのペン型送達デバイスの場合、交換可能なカートリッジは存在しない。むしろ、使い捨てのペン型送達デバイスは、デバイス内のリザーバに保持される医薬組成物が事前充填された状態になっている。リザーバの医薬組成物が空になると、デバイス全体が破棄される。

10

20

#### 【0193】

多数の再使用可能なペン型送達デバイスおよび自動注入型送達デバイスが、本発明の医薬組成物の皮下送達において、適用性を有する。例としては、いくつか列挙すると、AUTOPEN(商標)(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC(商標)ペン(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25(商標)ペン、HUMALOG(商標)ペン、HUMALIN 70/30(商標)ペン(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN(商標)I、II、およびIII(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR(商標)(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD(商標)ペン(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN(商標)、OPTIPEN PRO(商標)、OPTIPEN STARLET(商標)、ならびにOPTICLIK(商標)(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物の皮下送達において適用性を有する使い捨てのペン型送達デバイスの例としては、いくつか列挙すると、SOLOSTAR(商標)ペン(sanofi-aventis)、FLEXPEN(商標)(Novo Nordisk)、およびKWIKPEN(商標)(Eli Lilly)、SURECLICK(商標)自動注入装置(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET(商標)(Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN(Dey, L.P.)、ならびにHUMIRA(商標)ペン(Abbott Labs, Abbott Park IL)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0194】

ある特定の状況では、医薬組成物は、制御放出システムにおいて送達され得る。一実施形態では、ポンプが使用され得る(Langer、上記; Sefton、CRC Crit. Ref. Biomed.

Eng.、14巻:201頁(1987年)を参照されたい)。別の実施形態では、ポリマー材料が使用され得る。Medical Applications of Controlled Release、LangerおよびWise(編)、1974年、CRC Pres.、Boca Raton、Floridaを参照されたい。さらに別の実施形態では、制御放出システムは、組成物の標的の近くに設置することができ、し

50

たがって、必要とされるのは全身用量の一部のみである（たとえば、Goodson、1984年、Medical Applications of Controlled Release、上記、2巻、115～138頁を参照されたい）。他の制御放出システムは、Langer、Science、249巻：1527～1533頁（1990年）による考察に記載されている。

#### 【0195】

注射用調製物としては、静脈内、皮下、皮内、および筋肉内への注射、点滴注射などのための剤形を挙げることができる。これらの注射用調製物は、公的に公知の方法によって調製することができる。たとえば、注射用調製物は、たとえば、上述の抗体またはその塩を、注射に従来的に使用されている滅菌水性媒体または油性媒体中に溶解、懸濁、または乳化させることによって、調製することができる。注射用の水性媒体としては、たとえば、生理食塩水、グルコースおよび他の補助剤を含有する等張溶液などがあり、これらは、適切な可溶化剤、たとえば、アルコール（たとえば、エタノール）、多価アルコール（たとえば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤〔たとえば、ポリソルベート80、HCO-50（水素化ヒマシ油のポリオキシエチレン（50mol）付加物）〕などと組み合わせて使用することができる。用いられる油性媒体としては、たとえば、ゴマ油、ダイズ油などがあり、これらは、可溶化剤、たとえば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと組み合わせて使用することができる。このようにして調製された注射剤は、好ましくは、適切なアンプルに充填される。

10

#### 【0196】

有利なことに、上述の経口または非経口での使用のための医薬組成物は、活性成分の用量に合うように調整された単位用量の剤形に調製される。そのような単位用量の剤形としては、たとえば、錠剤、丸剤、カプセル、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。含まれる前述の抗体の量は、一般に、単位用量の剤形当たり約5～約500mg、特に、注射の形態では、前述の抗体が、約5～約100mgで含まれ、他の剤形では約10～約250mgで含まれることが好ましい。

20

#### 【0197】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証されるが、これは、制限と解釈されるものではない。本出願全体を通じて引用されたすべての参考文献、特許、および特許出願公開のすべての内容、ならびに図面および配列表は、ここに参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【実施例】

#### 【0198】

##### （実施例1）

#### グレムリン1結合性タンパク質

参照によりその全内容が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2016/0024195号は、本発明において使用するのに好適なキメラ抗GREM1抗体ならびに完全ヒト抗GREM1抗体（すなわち、ヒト可変ドメインおよびヒト定常ドメインを有する抗体）の生成および特徴付けについて記載している。たとえば、交差反応性抗体ならびにキメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを有する抗体）を含む、いくつかの抗GREM1抗体が得られており、それには、H1M2907N、H2M2780N、H2M2782N、H2M2783N、H4H2783N2、H2M2784N、H2M2785N、H2M2786N、H2M2889N、H2M2890N、H2M2891N、H2M2892N、H2M2895N、H2M2897N、H2M2898N、H2M2899N、H2M2901N、H2M2906N、H2M2926N、H3M2788N、およびH3M2929Nとして表される抗体が含まれる。

40

#### 【0199】

さらなる完全ヒト抗GREM1抗体も得られており、それには、次のように、H4H6232P、H4H6233P、H4H6236P、H4H6238P、H4H6240P、H4H6243P、H4H6245P、H4H6246P、H4H6248P、H4H6250P、H4H6251P、H4H6252S、H4H6256P、H4H6260

50

P、H 4 H 6 2 6 9 P、および H 4 H 6 2 7 0 Pとして表される抗体が含まれる。

【 0 2 0 0 】

表 1 は、本発明の方法において使用するのに好適な、選択されたヒト G R E M 1 に特異的な抗体の重鎖および軽鎖の可変領域アミノ酸配列ペア、ならびにそれらの対応する抗体識別子について記載している。抗体は、典型的に、本明細書では以下の命名法に従って参照される：Fc 接頭辞（たとえば、「H 4 H」、「H 1 M」、「H 2 M」）に続いて、数字の識別子（たとえば、表 1 に示される「2 9 0 7」）に続いて、「P」または「N」の接尾辞。したがって、この命名法に従って、抗体は、たとえば、「H 1 H 2 9 0 7」と称され得る。本明細書において使用される抗体表記の H 4 H、H 1 M、および H 2 M の接頭辞は、抗体の特定の Fc 領域を示す。たとえば、「H 2 M」抗体は、マウス I g G 2 Fc を有し、一方で「H 4 H」抗体は、ヒト I g G 4 Fc を有する。当業者には理解されるように、H 1 M または H 2 M 抗体は、H 4 H 抗体に変換することができ、逆もまた同様であるが、いずれの事象においても、表 1 に示される数字の識別子によって示される可変ドメイン（CDR を含む）は、同じままである。同じ数字の抗体表記を有するが、接尾辞の文字 N、B、または P が異なる抗体は、同一の CDR 配列を有するが、CDR 配列以外の領域（すなわち、フレームワーク領域）に配列の変動がある重鎖および軽鎖を有する抗体を指す。したがって、特定の抗体の N、B、および P バリエントは、それらの重鎖および軽鎖可変領域内では同一の CDR 配列を有するが、それらのフレームワーク領域内では互いに異なる。

【表 1 - 1】

表 1

	配列番号							
抗体表記	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
2907N	2	4	6	8	10	12	14	16
2780N	18	20	22	24	26	28	30	32
2782N	34	36	38	40	42	44	46	48
2783N	50	52	54	56	58	60	62	64
2783N2	66	68	70	72	74	76	78	80
2784N	82	84	86	88	90	92	94	96
2785N	98	100	102	104	106	108	110	112
2786N	114	116	118	120	122	124	126	128
2889N	130	132	134	136	138	140	142	144
2890N	146	148	150	152	154	156	158	160
2891N	162	164	166	168	170	172	174	176
2892N	178	180	182	184	186	188	190	192
2895N	194	196	198	200	202	204	206	208
2897N	210	212	214	216	218	220	222	224
2898N	226	228	230	232	234	236	238	240
2899N	242	244	246	248	250	252	254	256
2901N	258	260	262	264	266	268	270	272
2906N	274	276	278	280	282	284	286	288
2926N	290	292	294	296	298	300	302	304

10

20

30

40

【表 1 - 2】

2788N	306	308	310	312	314	316	318	320
2929N	322	324	326	328	330	332	334	336
6232P	338	340	342	344	346	348	350	352
6233P	354	356	358	360	362	364	366	368
6236P	370	372	374	376	378	380	382	384
6238P	386	388	390	392	394	396	398	400
6240P	402	404	406	408	410	412	414	416
6243P	418	420	422	424	426	428	430	432
6245P	434	436	438	440	442	444	446	448
6246P	450	452	454	456	458	460	462	464
6248P	466	468	470	472	474	476	478	480
6250P	482	484	486	488	490	492	494	496
6251P	498	500	502	504	506	508	510	512
6252P	514	516	518	520	522	524	526	528
6256P	530	532	534	536	538	540	542	544
6260P	546	548	550	552	554	556	558	560
6269P	562	564	566	568	570	572	574	576
6270P	578	580	582	584	586	588	590	592

10

20

30

## 【0201】

(実施例2)

抗グレムリン - 1 抗体での処置は、慢性低酸素マウスモデルにおいて、肺動脈の直径を回復させ、右心室心機能を回復させる

肺動脈性肺高血圧における抗グレムリン - 1 抗体、H 4 H 6 2 4 5 P 2 の作用を評価するために、慢性低酸素状態によって誘導される肺動脈性肺高血圧のマウスモデルを使用して、2つの別個の研究を行った。

40

## 【0202】

以下の材料および方法を、これらの研究に使用した。

## 【0203】

材料および方法

マウス

両方の研究に関して、11～13週齢のTaconicのC57BL/6マウスを使用した。マウスを、開始時の体重が、異なる群間で類似となるように、体重を基準に処置群に分けた。ケージは、約21% O<sub>2</sub> (常圧正常酸素状態)のままか、または室内の空気

50



の安定な取込みに対して $N_2$ 流を調節することにより低い $O_2$ レベルを維持した10% $O_2$ （常圧低酸素状態）チャンバ（改変型3'半硬質アイソレーター装置、Charles River）に入れるかのいずれかを選択した。

#### 【0204】

第1の研究（研究1）については、マウスは、14日目に、薬物または生理食塩水の投与を開始した。常圧正常酸素状態のケージに収容したマウスの群（ $n = 10$ 匹）には、1週間に2回、2週間にわたって5 mL / kgの生理食塩水を皮下投与し、一方で、常圧低酸素状態のケージに収容したマウスは、1週間に2回、2週間にわたって5 mL / kgの生理食塩水で皮下処置を受けるマウスの群（ $n = 10$ 匹）、1週間に2回、2週間にわたって25 mg / kgのアイソタイプ対照抗体を皮下投与するマウスの群（ $n = 10$ 匹）、および1週間に2回、2週間にわたって25 mg / kgの抗グレムリン-1抗体、H4H6245P2で皮下処置を受けるマウスの群（ $n = 10$ 匹）を含む、3つの処置群に分けた。

10

#### 【0205】

第2の研究（研究2）については、マウスは、14日目に、薬物または生理食塩水の投与を開始した。常圧正常酸素状態のケージに収容したマウスの群（ $n = 10$ 匹）には、1週間に2回、4週間にわたって5 mL / kgの生理食塩水を皮下投与し、一方で、常圧低酸素状態のケージに収容したマウスは、1週間に2回、4週間にわたって5 mL / kgの生理食塩水で皮下処置を受けるマウスの群（ $n = 10$ 匹）、1週間に2回、4週間にわたって25 mg / kgのアイソタイプ対照抗体を皮下投与するマウスの群（ $n = 10$ 匹）、1週間に2回、4週間にわたって10 mg / kgの抗グレムリン-1抗体、H4H6245P2で皮下処置を受けるマウスの群（ $n = 10$ 匹）、1週間に2回、4週間にわたって25 mg / kgの抗グレムリン-1抗体、H4H6245P2で皮下処置を受けるマウスの群（ $n = 9$ 匹）、および1週間に2回、4週間にわたって40 mg / kgの抗グレムリン-1抗体、H4H6245P2で皮下処置を受けるマウスの群（ $n = 10$ 匹）を含む、5つの処置群に分けた。

20

#### 【0206】

研究1および研究2の投薬スケジュールを、表2に提供する。

## 【表 2】

表 2.慢性低酸素マウスモデル研究におけるそれぞれの群の治療的投薬および処置  
プロトコール

研究 1:4 週間の慢性低酸素状態、薬物の投薬は、低酸素状態にして 14 日後に開始						
群	条件	処置	投薬量	頻度	経路	マウスの数/群 「n」のサイズ
1	常圧正常酸素状態	生理食塩水	5 mL/kg	2 回/週	SC	10
2	常圧低酸素状態	生理食塩水	5 mL/kg	2 回/週	SC	10
3	常圧低酸素状態	アイソタイプ 対照抗体	25 mg/kg	2 回/週	SC	10
4	常圧低酸素状態	抗グレムリン- 1 抗体	25 mg/kg	2 回/週	SC	10
研究 2:6 週間の慢性低酸素状態、薬物の投薬は、低酸素状態にして 14 日後に開始						
群	条件	処置	投薬量	頻度	経路	「n」のサイズ
1	常圧正常酸素状態	生理食塩水	5 mL/kg	2 回/週	SC	10
2	常圧低酸素状態	生理食塩水	5 mL/kg	2 回/週	SC	10
3	常圧低酸素状態	アイソタイプ 対照抗体	25 mg/kg	2 回/週	SC	10
4	常圧低酸素状態	抗グレムリン- 1 抗体	10 mg/kg	2 回/週	SC	10
5	常圧低酸素状態	抗グレムリン- 1 抗体	25 mg/kg	2 回/週	SC	9
6	常圧低酸素状態	抗グレムリン- 1 抗体	40 mg/kg	2 回/週	SC	10

SC=皮下

## 【 0 2 0 7 】

## 超音波検査による評価および分析

それぞれの研究の最終日に、肺動脈のサイズならびに右心室の機能およびサイズを、高周波数超音波システム（Vevo 2100、VisualSonics）を使用して、それぞれのマウスにおいて評価した。評価のために、マウスに麻酔を行い（1.5%イソフルランを、1.0cc/医薬品グレードの空気mLの速度で用いて）、マウスの体温を、直腸温度プローブを用いてモニタリングし、加熱プラットフォーム（MouseMonitorS、Indus Instruments）および加温ランプを用いておよそ37℃に保った。明るさモード（B-モード）および動きモード（M-モード）の両方のイ

メージングを使用した。B - モードでのマウスの心臓断面のイメージングを使用して、肺動脈の断面積 (P A C S A) を、肺動脈弁のレベルで判定した。M - モードでのイメージングを使用して、パルス波の速度時間積分 (V T I) を判定したが、これは、肺動脈を流れる血流の代表的なドプラートレーシングの曲線下面積から導出される。右心室の一回拍出量 (R V S V) を、P A C S A および V T I の積から計算した。右心室の心拍出量 (R V C O) を、S V および心拍数 (H R) の積から計算した。M - モードでのイメージングを使用して、拡張期および収縮期の間の右心室自由壁 (R V F W) の厚さを判定した。動物は、右心室圧の評価の前に、ホームケージに戻した。

#### 【0208】

##### 右心室圧の評価

続いて、右心室圧を、すべての処置群に関して、評価した。マウスを、イソフルランで麻酔し、加熱プラットフォーム (Heated Hard Pad 1, Braintree Scientific) および循環加熱ウォーターポンプ (T/Pump Classic, Gaymar Industries) を使用して、およそ 37 °C に保った。それぞれのマウスの首の領域を、右総頸動脈および右頸静脈の上を脱毛することによって、外科手術のために準備した。切開部を作製し、右頸静脈を、頸動脈および / または迷走神経を損傷しないように注意しながら単離した。一本の 5 - 0 絹縫合糸を、単離した頸静脈の下に入れて、頭蓋的な血管の取り出しを可能にし、次いで、30 ゲージのニードルを使用して、頸静脈に穴を作製した。加圧カテーテル (マイクロチップカテーテルトランスデューサー SPR - 1000, Millar Instruments, Inc.) を、頸静脈の開口部に挿入し、右心房を越えて右心室へと進めた。カテーテルを、圧力 / 容積機器 (MPVS - 300, Millar Instruments, Inc.) に接続し、心拍数、ならびに拡張期および収縮期の両方の右心室圧を測定した。これらのパラメーターは、データ取得システム (PowerLab 4/35, ADInstruments) を使用して、デジタルで取得した。LabChart Pro 7.0 ソフトウェア (ADInstruments) を使用して、右心室圧を分析した。読み取り値を、60 秒間隔の圧カトレースから定量化した (圧力の安定化を可能にするため、2 分間の記録期間の後に)。分析したパラメーターは、右心室の収縮期圧 (R V S P)、心拍数 (H R)、および右心室圧の上昇速度 ( $dP/dt_{max}$ ) であった。

#### 【0209】

##### 血清 / 組織の採取および右心室肥大に関する評価

右心室圧の測定の完了後に、カテーテルを取り出し、それぞれの動物を殺処分した。腹部を開き、ヘマトクリットの評価および血清の採取のために、血液を大静脈から採取した。次いで、胸腔を開き、右肺の中葉を、5 - 0 絹縫合糸で結紮し、切除し、RNA later (Sigma - Aldrich、カタログ番号 R0901) に入れ、24 時間後に - 80 °C で凍結させた。心臓を、それぞれの動物から切除し、右心室 (R V) を、左心室および中隔 (L V + S) から注意深く切り離した。心臓組織の両片を、微量てんびん (AJ000, Mettler) で別個に計量して、R V 肥大指数 [ $R V / (L V + S)$ ]、Fulton 指数] を計算した。

#### 【0210】

それぞれの処置群の半数の動物には、肺に、リン酸緩衝溶液 (P B S、p H 7.4) を用いて 20 ~ 25 mm H g で灌流を受けさせ、次いで、10 % 中性緩衝ホルマリン (N B F) で固定した。肺を、24 時間、10 % N B F 中に置いた後、70 % エタノールに少なくとも 48 時間入れ、その後に、組織の処理およびパラフィン包埋を行った。肺の灌流 - 固定を受けなかった動物については、右肺の下葉を、5 - 0 絹縫合糸で結紮した後に切除し、計量し、液体 N<sub>2</sub> 中で凍結させた。

#### 【0211】

##### 結果

グレムリン - 1 阻害により、慢性低酸素状態における肺動脈の直径が回復した

研究 1 において、B - モードでのマウス心臓の断面の超音波イメージングによって、低

10

20

30

40

50

酸素状態への4週間の曝露により、生理食塩水で処置したマウスでは、 $PA-CSA$ が、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスと比較して、約28%低減されたことが判明した(表3)。アイソタイプ対照抗体での処置により、 $PA-CSA$ 値が、低酸素状態において生理食塩水で処置したマウスで観察されたマウスのものから、有意に影響を受けることはなかった。抗グレムリン-1抗体での処置により、 $PA-CSA$ のサイズが、低酸素状態においてアイソタイプ対照抗体で処置したマウスで測定されたものよりも約46%大きなサイズとなり、低酸素状態において抗グレムリン-1で処置した群からのこの計算 $PA-CSA$ は、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスの群のものと類似していた。したがって、抗グレムリン-1抗体は、低酸素状態において、肺動脈の直径を回復させることができた。

10

#### 【0212】

研究2において、B-モードでのマウス心臓の断面の超音波イメージングによって、低酸素状態への6週間の曝露により、生理食塩水で処置したマウスでは、 $PA-CSA$ が、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスと比べて、約32%低減されたことが判明した(表3)。アイソタイプ対照抗体で処置した動物の $PA-CSA$ 値は、低酸素状態において生理食塩水で処置したものと類似していた。10mg/kgの低い濃度の抗グレムリン-1抗体での処置は、アイソタイプ対照抗体での処置の計算値よりも、21%高い(有意な)計算 $PA-CSA$ 値をもたらした。より高い濃度、すなわち、25および40mg/kgの抗グレムリン-1は、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスで測定されたものと類似の $PA-CSA$ 値をもたらし、アイソタイプ対照抗体での処置よりも有意に高かった。これらの結果は、慢性低酸素状態によって誘導される肺動脈の直径の変化を解決することに対する、抗グレムリン-1抗体の用量依存性作用を示す。

20

#### 【0213】

グレムリン-1の障害は、右心室の心機能を回復させた

研究1において、M-モードでのパルス波VTIの超音波イメージングにより、慢性低酸素状態に曝露された動物において、肺動脈を通る血流の速度には、有意ではない差(最大で5%の増加)が示された(データは示されない)。表3に示されるように、生理食塩水で処置したマウスおよびアイソタイプ対照で処置したマウスの両方について、計算された右心室の一回拍出量(VTIおよび $PA-CSA$ の積)は、低酸素状態への曝露により、23~30%、有意に低減された。抗グレムリン-1抗体での処置により、右心室の一回拍出量の低減の、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスのものに類似の値への好転をもたらされた。これは、グレムリン-1の障害が、低酸素状態において、一回拍出量を回復させ得ることを意味するであろう。測定したところ群間で有意差がないことが見出された心拍数を、右心室の心拍出量を判定するために使用した。右心室の心拍出量は、慢性低酸素状態に曝露した動物では、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスと比べて、21%、有意に低いことが見出された。低酸素状態におけるアイソタイプ対照抗体での処置と比較して、低酸素状態において抗グレムリン-1で処置したマウスからの測定された心拍出量は、約48%高く、この値は、正常酸素状態において生理食塩水で処置した群において測定された値よりも7%高く、グレムリン-1の障害が、低酸素状態において心拍出量を回復させたことを示す。まとめると、これらの超音波検査の結果は、慢性低酸素状態における抗グレムリン-1抗体での処置が、心臓の一回拍出量および心拍出量を改善し、心拍数に対する変化は最小限であることを示す。

30

40

#### 【0214】

研究2において、M-モードでのパルス波VTIの超音波イメージングにより、正常酸素状態と低酸素状態の条件を対比して、生理食塩水で処置した動物の肺動脈を通る血流の速度には、有意差がない(最大で11%の増加)ことが判明した。表3に示されるように、生理食塩水で処置した動物では、低酸素状態により、正常酸素状態のマウスと比較した場合に、一回拍出量が32%低減された。低酸素状態において生理食塩水で処置した群と比較して、アイソタイプ対照で処置した群の計算一回拍出量は、16%高かった(有意ではなかった)ため、10または40mg/kgのいずれかの抗グレムリン-1抗体で処置

50

した動物から得られた値の比較は、値が、低酸素状態において生理食塩水で処置した群の値よりも26～41%高く、正常酸素状態において生理食塩水で処置した群の値に匹敵していたとはいえ、統計学的に有意性はなかった。25 mg/kgの抗グレルリン-1抗体での処置は、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスの計算値に類似する平均一回拍出量をもたらし、これらの値は、アイソタイプ対照抗体での処置の計算値よりも、38%、有意に高かった(表3)。心拍数を測定すると、異なる条件間で同等であることが見出された。6週間の慢性的な低酸素状態により、右心室の心拍出量が、生理食塩水で処置した群では35%下降し、アイソタイプ対照抗体の使用は、心拍出量の回復に対する作用を有さなかった(正常酸素状態における生理食塩水と比較して27%の低減)。10 mg/kgの抗グレルリン-1抗体の使用により、低酸素状態における心拍出量が増加した(アイソタイプ対照抗体での処置で測定された値よりも15%高い)が、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスで見出された値よりも16%低かった。25または40 mg/kgの抗グレルリン-1抗体の使用は、心拍出量をアイソタイプ対照抗体での処置よりも30～35%増加させることによる利益を示し、正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスで見出された値と同等であった。まとめると、これらのデータは、慢性低酸素状態における高用量(25または40 mg/kg)での抗グレルリン-1抗体の使用により、慢性低酸素状態において心機能が改善されることを示す。

【表 3】

表 3:それぞれの研究の終了時に測定した平均肺動脈断面積(PA CSA)、一回拍出量、心拍数、および右心室の心拍出量

研究 1						
群	条件	処置	PA CSA (mm <sup>2</sup> ) (平均±SEM)	一回拍出量 (uL) (平均±SEM)	心拍数(拍数/ 分) (平均±SEM)	右心室の心拍出 量(mL/分) (平均 ±SEM)
1	常圧正常酸素状態	生理食塩水	1.817±0.085	40.64±1.69	464.2±9.5	18.84±0.83
2	常圧低酸素状態	生理食塩水	1.315±0.052 ****	31.26±1.09 *	475.1±16.7	14.89±0.82 *
3	常圧低酸素状態	アイソタイプ ブ対照抗体	1.213±0.039	28.55±2.14	481.7±20.5	13.53±0.84
4	常圧低酸素状態	抗グレムリン-1 抗体	1.770±0.058 ####	40.24±3.51 ##	500.6±12.7	20.09±1.68 ###
研究 2						
群	条件	処置	PA CSA (mm <sup>2</sup> ) (平均±標準偏差)	一回拍出量 (uL) (平均±標準 偏差)	心拍数(拍数/ 分) (平均±標準 偏差)	右心室の心拍出 量(mL/分) (平均 ±標準偏差)
1	常圧正常酸素状態	生理食塩水	1.711±0.0392	34.86±2.66	632.9±7.3	22.06±1.68
2	常圧低酸素状態	生理食塩水	1.169±0.0269**	23.80±1.89 **	612.9±27.1	14.25±0.86 ***
3	常圧低酸素状態	アイソタイプ ブ対照抗体	1.205±0.0281	27.51±1.93	588.4±18.7	16.07±1.06
4	常圧低酸素状態	抗グレムリン-1 抗体 (10 mg/kg)	1.459±0.0536###	30.57±1.63	610.3±23.8	18.59±1.18
5	常圧低酸素状態	抗グレムリン-1 抗体 (25 mg/kg)	1.718±0.0863#### #	38.09±1.89 ##	572.7±24.9	21.68±1.21 <sup>#</sup>
6	常圧低酸素状態	抗グレムリン-1 抗体 (40 mg/kg)	1.727±0.0640####	33.61±2.76	631.4±14.4	21.01±1.51 <sup>#</sup>

Sidakの多重比較検定を用いた一方向ANOVA: \*、\*\*、\*\*\*、\*\*\*\*は、常圧正常酸素状態において生理食塩水で処置したものと対比してP<0.05、0.01、0.001、0.0001であり、#、##、###、####は、常圧低酸素状態においてアイソタイプ対照抗体で処置したものと対比してP<0.01、0.001、0.0001である。

【 0 2 1 5 】

( 実施例 3 )

抗グレムリン - 1 抗体での処置は、肺高血圧の S u g e n 5 4 1 6 / 慢性低酸素マウス

モデルにおいて、肺動脈の直径を回復させる

肺動脈性肺高血圧の処置における抗GREM1抗体、H4H6245P2の有効性をさらに評価するために、血管内皮増殖因子受容体アンタゴニストSugen 5416 / 慢性低酸素マウスモデルを使用した。

【0216】

以下の材料および方法を、この研究に使用した。

【0217】

材料および方法

マウス

11～13週齢のTaconicのC57BL/6マウスを使用した。マウスを、開始時の体重が、異なる群間で類似となるように、体重を基準に処置群に分けた。ケージは、約21% O<sub>2</sub> (常圧正常酸素状態)のままか、または室内の空気の安定な取込みに対してN<sub>2</sub>流を調節することにより低いO<sub>2</sub>レベルを維持した10% O<sub>2</sub> (常圧低酸素状態)チャンバ(改変型3'半硬質アイソレーター装置、Charles River)に入れるかのいずれかを選択した。マウスは、21日目に、Sugen 5416 (Sigma、カタログ番号S8442、VEGFR阻害剤、皮下、1週間に1回で6週間、20mg/kg)および薬物または生理食塩水の投与を開始した。常圧正常酸素状態のケージに収容したマウスの群(n=10匹)には、1週間に2回、3週間にわたって5mL/kgの生理食塩水を皮下投与し、一方で、常圧低酸素状態のケージに収容したマウスは、1週間に2回、3週間にわたって5mL/kgの生理食塩水で皮下処置を受けるマウスの群(n=10匹)、3週間にわたって毎日、300mg/kgのボセンタン(Sequoia Research Products、カタログSRP02325b)を経口投与するマウスの群(n=9匹)、1週間に2回、3週間にわたって25mg/kgのアイソタイプ対照抗体を皮下投与するマウスの群(n=10匹)、1週間に2回、3週間にわたって25mg/kgの抗グレムリン-1抗体で皮下処置を受けるマウスの群(n=10匹)、1週間に2回、3週間にわたって25mg/kgの抗グレムリン-1抗体で皮下処置を受け、3週間にわたって毎日、300mg/kgのボセンタンを経口投与するマウスの群(n=9匹)を含む、5つの処置群に分けた。マウスの群の実験的投薬および処置プロトコルは、表4に示される。

10

20

## 【表 4】

表 4.Sugen5416/慢性低酸素マウスモデル研究におけるそれぞれの群の治療的投薬  
および処置プロトコール

研究 3:6 週間の Sugen5416/低酸素状態、薬物の投薬は、低酸素状態にして 21 日後に開始						
群	条件	処置	投薬量	頻度	経路	「n」の サイズ
1	常圧正常酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	生理食塩水	5 mL/kg	2 回/週	SC	10
2	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	生理食塩水	5 mL/kg	2 回/週	SC	10
3	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	ボセンタン	300 mg/kg	毎日	PO	9
4	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	アイソタイプ ブ対照抗体	25 mg/kg	2 回/週	SC	10
5	Sugen5416 20mg/kg SC、週 1 回 常圧低酸素状態	抗グレムリ ン-1 抗体	25 mg/kg	2 回/週	SC	10
6	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	抗グレムリ ン-1 抗体+ ボセンタン	抗体:25mg/kg、 ボセンタン: 300mg/kg	抗体:2 回/ 週、ボセン タン:毎日	抗体:SC、 ボセンタ ン:PO	9

SC=皮下

PO=経口

## 【0218】

## 超音波検査による評価および分析

研究の最終日に、肺動脈のサイズならびに右心室の機能およびサイズを、高周波数超音波システム (Vevo 2100、Visual Sonics) を使用して、それぞれのマウスにおいて評価した。評価のために、マウスに麻酔を行い (1.5% イソフルランを、1.0 cc / 医薬品グレードの空気 mL の速度で用いて)、マウスの体温を、直腸温度プローブを用いてモニタリングし、加熱プラットフォーム (Mouse Monitor S、Indus Instruments) および加温ランプを用いておよそ 37℃ に保った。明るさモード (B - モード) および動きモード (M - モード) の両方のイメージングを使用した。B - モードでのマウスの心臓断面のイメージングを使用して、肺動脈の断面積 (PACSA) を、肺動脈弁のレベルで判定した。M - モードでのイメージングを使用して、パルス波の速度時間積分 (VTI) を判定したが、これは、肺動脈を流れる血流の代表的なドプラートレーシングの曲線下面積から導出される。右心室の一回拍出量 (RVSV) を、PACSA および VTI の積から計算した。右心室の心拍出量 (RVCO) を、SV および心拍数 (HR) の積から計算した。M - モードでのイメージングを使用して、拡張期および収縮期の間の右心室自由壁 (RVFW) の厚さを判定した。動物は、右心室圧の評価の前に、ホームケージに戻した。

## 【0219】

## 右心室圧の評価

続いて、右心室圧を、すべての処置群に関して、評価した。マウスに、イソフルランで麻酔を行い、加熱プラットフォーム (Heated Hard Pad 1、Brain tree Scientific) および循環加熱ウォーターポンプ (T/Pump Classic、Gaymar Industries) を使用して、およそ 37℃ に保った。それぞれのマウスの首の部分に、右総頸動脈および右頸静脈の上を脱毛することによって、外科手術の準備をした。切開部を作製し、右頸静脈を、頸動脈および / または迷走



神経を損傷しないように注意しながら単離した。一本の 5 - 0 絹縫合糸を、単離した頸静脈の下に入れて、頭蓋的な血管の取り出しを可能にし、次いで、30 ゲージのニードルを使用して、頸静脈に穴を作製した。加圧カテーテル（マイクロチップカテーテルトランスデューサー S P R - 1000、M i l l a r I n s t r u m e n t s , I n c . ）を、頸静脈の開口部に挿入し、右心房を越えて右心室へと進めた。カテーテルを、圧力 / 容積機器（M P V S - 300、M i l l a r I n s t r u m e n t s , I n c . ）に接続し、心拍数、ならびに拡張期および収縮期の両方の右心室圧を測定した。これらのパラメータは、データ取得システム（P o w e r L a b 4 / 35、A D I n s t r u m e n t s ）を使用して、デジタルで取得した。L a b C h a r t P r o 7 . 0 ソフトウェア（A D I n s t r u m e n t s ）を使用して、右心室圧を分析した。読み取り値を、60 秒間隔の圧力トレースから定量化した（圧力の安定化を可能にするため、2 分間の記録期間の後に）。分析したパラメータは、右心室の収縮期圧（R V S P）、心拍数（H R）、および右心室圧の上昇速度（ $dP/dt_{max}$ ）であった。

10

20

30

40

#### 【0220】

血清 / 組織の採取および右心室肥大に関する評価

右心室圧の測定の完了後に、カテーテルを取り出し、それぞれの動物を殺処分した。腹部を開き、ヘマトクリットの評価および血清の採取のために、血液を大静脈から採取した。次いで、胸腔を開き、右肺の中葉を、5 - 0 絹縫合糸で結紮し、切除し、R N A l a t e r（S i g m a - A l d r i c h、カタログ番号 R 0901）に入れ、24 時間後に - 80 で凍結させた。心臓を、それぞれの動物から切除し、右心室（R V）を、左心室および中隔（L V + S）から注意深く切り離した。心臓組織の両片を、微量てんびん（A J 000、M e t t l e r）で別個に計量して、R V 肥大指数 [  $R V / (L V + S)$  ]、F u l t o n 指数 ] を計算した。

#### 【0221】

それぞれの処置群の半数の動物には、肺に、リン酸緩衝溶液（P B S、p H 7 . 4）を用いて 20 ~ 25 m m H g で灌流を受けさせ、次いで、10 % 中性緩衝ホルマリン（N B F）で固定した。肺を、24 時間、10 % N B F 中に置いた後、70 % エタノールに少なくとも 48 時間入れ、その後に、組織の処理およびパラフィン包埋を行った。肺の灌流 - 固定を受けなかった動物については、右肺の下葉を、5 - 0 絹縫合糸で結紮した後に切除し、計量し、液体 N<sub>2</sub> 中で凍結させた。

#### 【0222】

結果

グレムリン - 1 阻害により、S u g e n 5416 / 低酸素状態における肺動脈の直径が回復した。

表 5 に示されるように、B - モードでのマウス心臓の断面の超音波イメージングによって、S u g e n 5416 / 低酸素状態への 6 週間の曝露により、生理食塩水で処置したマウスでは、P A C S A が 29 % 低減された（正常酸素状態のマウスと比べて）ことが判明した。低酸素状態では、アイソタイプ対照抗体で処置した動物の P A C S A 値は、生理食塩水で処置したものと類似していた。エンドセリン受容体アンタゴニストであるボセンタンの使用により、低酸素状態において生理食塩水で処置した群よりも約 43 % 高く（有意である）、それでいて正常酸素状態において測定されたものに類似する P A C S A 値が得られた。同様に、抗グレムリン - 1 抗体の使用により、アイソタイプ対照抗体で処置した群で測定された値よりも有意に高く（28 %）、それでいて正常酸素状態において生理食塩水で処置したマウスで観察されたものと類似する P A C S A 値が得られた。しかしながら、ボセンタンおよび抗グレムリン - 1 抗体の使用は、P A C S A にはわずかな作用しか有さず、低酸素状態において生理食塩水またはアイソタイプ対照抗体での処置で見出される値に類似していた。

【表 5】

表 5:研究の終了時における、処置群の平均肺動脈断面積(PA CSA)、一回拍出量、および右心室の心拍出量

群	条件	処置	PA CSA (mm <sup>2</sup> ) (平均±SEM)	一回拍出量(ul) (平均±SEM)	心拍数(拍数/ 分)(平均± SEM)	右心室の心拍 出量(ml/分)(平 均±SEM)
1	常圧正常酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	生理食塩水	1.683±0.063	32.31±2.20	443.0±11.7	14.20±0.93
2	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	生理食塩水	1.202±0.062 **	23.09±1.61	501.7±22.4	11.43±0.71
3	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	ボセンタン	1.724±0.074 %%%	35.51±3.22 %%	509.7±18.9	17.81±1.46 %%
4	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	アイソタイプ対照抗体	1.226±0.051	21.71±2.39	553.7±19.6	11.81±1.16
5	Sugen5416 20mg/kg SC、週 1 回 常圧低酸素状態	抗グレムリン-1 抗体	1.565±0.147 #	30.23±3.71	524.7±18.3	16.19±2.22
6	常圧低酸素状態 +Sugen5416(20mg/kg SC、週 1 回)	抗グレムリン-1 抗体+ボセンタン	1.227±0.075	23.14±1.62	511.0±14.8	11.92±01.00

Sidakの多重比較検定を用いた一方向ANOVA:\*\*は、常圧正常酸素状態において生理食塩水で処置したものと対比してP<0.01であり、%%、%%%は、常圧低酸素状態において生理食塩水で処置したものと対比してP<0.01、0.001であり、#は、常圧低酸素状態においてアイソタイプ対照抗体で処置したものと対比してP<0.05である。

## 【 0 2 2 3 】

均等物

当業者であれば、本明細書において記載される具体的な実施形態および方法に対する多数の均等物を認識するであろうし、または単に日常的な実験を使用すれば確かめることができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲の範囲によって包含されるものとする。

【図 1】

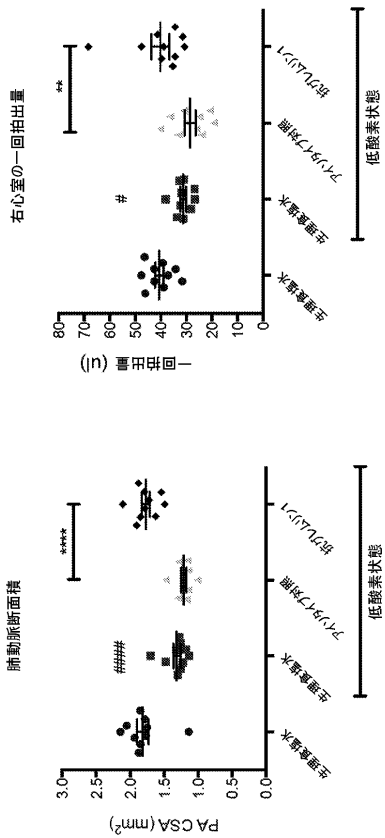


Figure 1A

\*\*\*\* P < 0.0001  
##### P < 0.0001  
\*\* P < 0.01  
# P < 0.05

Figure 1B

【配列表】

2019529371000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2017/048137

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/24 A61K39/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOREDANA CIUCLAN ET AL: "Treatment with Anti-Gremlin 1 Antibody Ameliorates Chronic Hypoxia/SU5416-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Mice", THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 183, no. 5, 1 November 2013 (2013-11-01), pages 1461-1473, XP055205055, ISSN: 0002-9440, DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.07.017	1,3,7
Y	See e.g. the abstract, conclusion section on page 1472; Figure 3A ----- -/--	2,4,5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 2017

Date of mailing of the international search report

17/01/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/048137

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MCLAUGHLIN VALLERIE V ET AL: "Management of Pulmonary Arterial Hypertension", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 65, no. 18, 4 May 2015 (2015-05-04), pages 1976-1997, XP029219646, ISSN: 0735-1097, DOI: 10.1016/J.JACC.2015.03.540 See e.g. page 1987, right column, third paragraph -----	2,4,5
A	MCLAUGHLIN V V ET AL: "ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 53, no. 17, 28 April 2009 (2009-04-28), pages 1573-1619, XP026019313, ISSN: 0735-1097 [retrieved on 2009-04-21] See Table 1 on page 1576 -----	3
A,P	Wikipedia: "Pulmonary hypertension", Internet  4 October 2017 (2017-10-04), XP002774891, Retrieved from the Internet: URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Pulmonary_hypertension [retrieved on 2017-10-17] See e.g. on page 3, Classification of WHO Group I -----	3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/048137

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2017/048137**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 6, 8-14, 16(completely); 7(partially)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-5, 7(all partially)

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/ US2017/ 048137

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5, 7(all partially)

A method of treating a subject as defined in claim 1 referring to any possible anti-GREM1 antibody, wherein the anti-GREM1 antibody is not defined by a particular sequence (i.e. excluding the particular 37 antibodies defined in present claim 15).  
---

2-38. claims: 1-5, 7, 15(all partially)

As subject 1 but for each of the particular 37 anti-gremlin1 antibodies defined in claim 15: e.g. the anti-gremlin1 antibody comprising SEQ ID NO: 2 as HCVR and SEQ ID NO: 10 as LCVR corresponding to invention 2.  
---



International Application No. PCT/ US2017/ 048137

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 6, 8-14, 16(completely); 7(partially)

Claims 6, 8-14 and 16 have not been searched since they are unclear, not sufficiently disclosed and lack support. Claim 7 could be only partially searched.

Claims 6 and 7 define the antibody by functional features which are result to be achieved definitions but without indicating how to achieve the effects. In the present case, it is possible to define the antibodies by their specific sequences, so that these definitions are not allowed.

In the case of Claim 6, the functional feature is furthermore unclear. Claim 6 refers to "wherein the antibody, or antigen-binding fragment thereof, blocks GREM1 binding to one of BMP2, BMP4, BMP7 or heparin". This is a result to be achieved definition but it is not indicated how to achieve said effect/effects.

The same argument applies to claim 7, the antibody is defined by results to be achieved. features (a) to (g). In the case of claim 7 at least feature (a) could be considered as a clear assay, and an assay than can be expected to be carried for any anti GREM1 antibody. Thus, Claim 7 could be partially searched. This however does not render claim 7 clear: an antibody should not be defined exclusively by functional features.

In the case of claims 8-14 and 16 the antibodies are defined by comprising CDRs disclosed in certain HCVRs or LCVRs or even by referring to entire HCVRs or LCVRs. Said definitions are not clear and lack support and sufficient disclosure. An antibody should be defined by at least 6 CDRs or by one HCVR AND one LCVR. Particular antibodies are disclosed in the present application, such as an antibody comprising the HCVR of SEQ ID NO: 2 and the LCVR of SEQ ID NO: 10. Said particular antibody comprises a particular combination of 3CDRs of the HCVR of SEQ ID NO: 2 and a particular combination of 3CDRs of the LCVR of SEQ ID NO: 10. It is unclear to define antibodies by just comprising one of these 6 CDRs and there is neither support nor sufficient disclosure for antibodies comprising the CDR1 of SEQ ID NO: 2 and e.g. the CDR2 of SEQ ID NO: 578 (just to give an example).

It would be an undue burden to provide antibodies having these two CDRs (e.g. the CDR1 of SEQ ID NO: 2 and e.g. the CDR2 of SEQ ID NO: 578, just to give an example) and the other 4 CDRs being undefined. The same applies for other possible combinations of CDRs of the many of the many other listed sequences.

This type of definition is unclear, lacks sufficiency of disclosure and is not supported by the description, so that claims 8-14 and 16 could not be

International Application No. PCT/ US2017/ 048137

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

searched.

In contrast, claim 15 referring to particular pairs of HCVRs and LCVRs defined by particular SEQ ID NOs can be searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
<b>A 6 1 K 31/5585 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/5585	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
	C 0 7 K 16/46	

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

(72)発明者 チャロソーン, ダン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 7 7 7

(72)発明者 モートン, ローリ シー.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 7 7 7

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 MA17 MA66 NA05 NA14 ZA362 ZA422 ZA452  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB36 BB41 BB42 BB43 EE01 GG04  
4C086 AA01 AA02 DA06 MA01 MA04 MA17 MA66 NA05 NA14 ZA36  
ZA42 ZA45  
4H045 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20