

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0004733
(43) 공개일자 2025년01월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 31/4184** (2006.01)
A61K 31/4365 (2006.01) **A61K 31/4439** (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) **C12Q 1/6886** (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7037223
(22) 출원일자(국제) 2023년04월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/059270
(87) 국제공개번호 WO 2023/194583
국제공개일자 2023년10월12일
(30) 우선권주장
2205203.9 2022년04월08일 영국(GB)
- (71) 출원인
유씨비 바이오파마 에스알엘
벨기에 브뤼셀 1070 알레 더 라 러쉴르쉴 60
- (72) 발명자
데이비스 가레스 찰스 글린드워
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드 208 아이피디 유씨비 바이오파마 유케이 내
존스 폴
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드 208 아이피디 유씨비 바이오파마 유케이 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

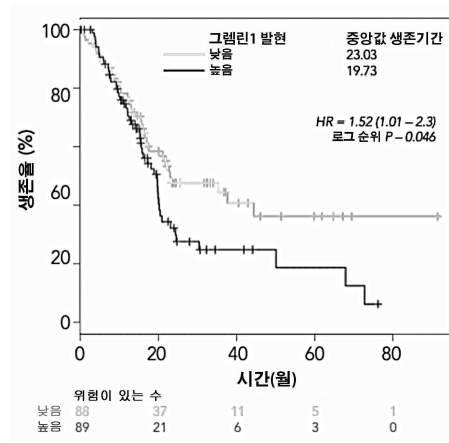
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **그렐린-1 길항제와 RAS-RAF-MEK-ERK 신호전달 억제제의 조합**

(57) 요약

본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 항-GREM1 길항제에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/4365 (2013.01)
A61K 31/4439 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57496 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

반 데 산데 브람 제로엔

벨기에 비-1070 브뤼셀 알레 더 라 러쉐르쉐 60 유
씨비 바이오파마 에스알엘 내

모턴 제니퍼 패트리샤

영국 지61 1비디 글래스고 스위치백 로드 가스큐브
에스테이트 센터 리서치 유케이 비트슨 인스티튜트
내

명세서

청구범위

청구항 1

암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 항-GREM1 길항제로서, 상기 방법은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 항-GREM1 길항제.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 암이 고형 암이고/이거나;
- (b) 암이 간질 GREM1 과발현을 갖고/갖거나;
- (c) 암이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절과 관련된 암이고/이거나;
- (d) 암이 항-GREM1 길항제에 노출된 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내고/내거나;
- (e) 암이 Ras 유전자, 임의로 KRAS, NRAS 및/또는 HRAS의 돌연변이를 함유하고/하거나;
- (f) 암이 Raf 유전자, 임의로 ARAF, BRAF 및/또는 CRAF의 돌연변이를 함유하고/하거나;
- (g) 암이 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 암이고/이거나;
- (h) 암이 결장직장암, 다발성 골수종, 췌장암, 방광암, 유방암, 폐암, 위암, 십이지장암, 식도암, 두경부암, 전립선암, 신경교종, 자궁내막암, 간암, 비장암, 골 상주 암, 흑색종 및 골육종으로부터 선택되는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 3

제2항의 (h)에 있어서,

- (a) 암이 췌장암이고; 임의로
 - (i) 췌장암이 외분비 췌장암이고/이거나;
 - (ii) 췌장암이 췌장관 선암종(PDAC)이거나;
- (b) 암이 다발성 골수종 또는 결장직장암, 임의로 KRAS/BRAF 돌연변이된 결장직장암이거나;
- (c) 암이 폐암이고; 임의로 암이 비-소세포 폐암(NSCLC)이거나;
- (d) 암이 흑색종, 임의로 BRAF 돌연변이된 흑색종인 항-GREM1 길항제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 암이 상피 GREM1 과발현을 갖고; 임의로 암이 GREM1-유발 암이고/이거나;
- (b) 암이 파종성 암이고/이거나;
- (c) 암이 확립된 암인 항-GREM1 길항제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스 RNA, 작은 간섭 RNA(siRNA), 작은 분자 억제제 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)인 항-GREM1 길항제.

청구항 6

제5항에 있어서,

(a) 길항제가 Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175로부터 선택된 적어도 하나의 잔기를 포함하는 그래핀-1의 에피토프에 결합하는 항체이고, 여기서 잔기 넘버링이 서열번호 1에 따르고; 임의로

(i) 항체가 Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175를 모두 포함하는 에피토프에 결합하고/하거나;

(ii) Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175가 동일한 그래핀-1 단량체에 위치하고 Ile131이 제2 그래핀-1 단량체에 위치하거나;

(b) 길항제가 서열번호 10 또는 12의 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 서열 및/또는 서열번호 11 또는 13의 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 서열을 포함하는 항-그래핀-1 항체이거나;

(c) 길항제가 서열번호 3, 4, 5 및 6으로부터 선택된 적어도 하나의 HCDR 서열 및/또는 서열번호 7, 8 및 9로부터 선택된 적어도 하나의 LCDR 서열을 포함하는 항-그래핀-1 항체이고; 임의로

(i) 항-그래핀-1 항체가 서열번호 6의 HCDR3 서열을 포함하고/하거나;

(ii) 항-그래핀-1 항체가 서열번호 4/5/6 또는 서열번호 3/5/6으로부터 선택된 HCDR1/HCDR2/HCDR3 서열 조합 및/또는 서열번호 7/8/9로부터 선택된 LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열 조합을 포함하고/하거나;

(iii) 항-그래핀-1 항체가 서열번호 4/5/6/7/8/9 또는 서열번호 3/5/6/7/8/9의 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열 조합을 포함하고/하거나;

(iv) 항-그래핀-1 항체가 서열번호 10 또는 12의 중쇄 가변 영역(HCVR) 서열 및/또는 서열번호 11 또는 13의 경쇄 가변 영역(LCVR) 서열, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 7

제6항의 (c)(iv)에 있어서,

(a) 항-그래핀-1 항체가 서열번호 10/11 또는 12/13의 HCVR 및 LCVR 서열 쌍 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고; 임의로 항-그래핀-1 항체가 서열번호 4/5/6/7/8/9 또는 서열번호 3/5/6/7/8/9로 구성된 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열을 포함하고 HCVR 및 LCVR의 나머지가 각각 서열번호 10, 11, 12 및/또는 13과 적어도 95% 동일성을 포함하고/하거나;

(b) 항-그래핀-1 항체가 서열번호 14, 16, 18, 22, 28, 30, 32 또는 34의 중쇄 및/또는 서열번호 15, 17, 19, 23, 29, 31, 33 또는 35의 경쇄, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 8

제7항의 (b)에 있어서, 항-그래핀-1 항체가 서열번호 14/15, 16/17, 18/19, 22/23, 28/29 또는 30/31, 32/33, 34/35의 중쇄와 경쇄 쌍, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고; 임의로 항체의 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열이 서열번호 4/5/6/7/8/9 또는 서열번호 3/5/6/7/8/9로 구성되고, 중쇄 및 경쇄의 나머지가 각각 서열번호 14, 15, 16 및/또는 17과 적어도 95% 동일성을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 9

제5항에 있어서,

(a) 길항제가 제6항의 (a)(i) 내지 제7항 중 어느 하나에 정의된 항체와 그래핀-1에의 결합에 대해 경쟁하는 항체이거나;

(b) 길항제가 제6항의 (a)(i) 내지 제7항 중 어느 하나에 정의된 항체와 동일한 그래핀-1의 에피토프에 결합하는 항체인 항-GREM1 길항제.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 길항제 항체가 키메라, 인간 또는 인간화 항체이고/이거나;
- (b) 길항제 항체가 Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')₂, Fv, 단일 도메인 항체 또는 scFv인 항-GREM1 길항제.

청구항 11

제5항에 있어서, 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 운반하는 발현 벡터인 항-GREM1 길항제.

청구항 12

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 길항제 항체가 약학적으로 허용되는 보조제 및/또는 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물에 포함되는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 Mapk1, Nras, Kras 및/또는 Myc 신호전달을 하향조절하고/하거나;
- (b) Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 MEK 억제제, 임의로 알로스테릭 MEK 억제제인 항-GREM1 길항제.

청구항 14

제13항의 (b)에 있어서,

- (a) MEK 억제제가 MEK1 및/또는 MEK2 억제제이고/이거나;
- (b) MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244), 트라메티닙(GSK-1120212), 코비메티닙(GDC-0973), 비니메티닙(MEK162), CI-1040(PD184352), 미르다메티닙(PD0325901), TAK733, 레파메티닙(RDEA119/Bay 86-9766), RO-5126766, RO5068760, 피마세르닙(AS703026), AZD8330, GDC-0623, RO-4987655, WX-554(UCB-554), HL-085, ARRY-300, ClnQ-03, G-573, PD184161, PD318088, PD98059, U0126 또는 SL327이고; 임의로
 - (i) MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244)이거나;
 - (ii) MEK 억제제가 트라메티닙(GSK-1120212)이거나;
 - (iii) MEK 억제제가 WX-554(UCB-554)이거나;
 - (iv) MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244)이고 암이 췌장암, 임의로 PDAC이거나;
 - (v) MEK 억제제가 트라메티닙(GSK-1120212)이고 암이 췌장암, 임의로 PDAC이거나;
 - (v) MEK 억제제가 WX-554(UCB-554)이고 암이 췌장암, 임의로 PDAC인 항-GREM1 길항제.

청구항 15

제13항의 (b)에 있어서, MEK 억제제가

- (a) N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-(모르폴린-4-일카르보닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- (b) N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-[(4-메틸피페라진-1-일)카르보닐]티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- (c) 2-[[[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일](피롤리딘-1-일)메탄은;
- (d) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}피페리딘-4-일)-카르bam산 *tert*-부틸 에스테르;
- (e) 2-[[[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르복실산 (4-아미노피페리딘-1-일)아미드 디하이드로-클로라이드];
- (f) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}아제티딘-3-일메틸)-카르bam산

tert-부틸 에스테르;

(g) [3-((아미노메틸)아제티딘-1-일)]-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;

(h) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)-(3*R*)-피롤리딘-3-일}카르바산 *tert*-부틸 에스테르;

(i) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)-(3*S*)-피롤리딘-3-일}카르바산 *tert*-부틸 에스테르;

(j) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)아제티딘-3-일}-카르바산 *tert*-부틸 에스테르;

(k) [(3*R*)-3-아미노피롤리딘-1-일]-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;

(l) [(3*S*)-3-아미노피롤리딘-1-일]-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;

(m) (3-아미노아제티딘-1-일)-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;

(n) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-(3-하이드록시아제티딘-1-일)-메타논;

(o) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*R*)-3-하이드록시피롤리딘-1-일]-메타논;

(p) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*S*)-3-하이드록시피롤리딘-1-일]-메타논;

(q) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[2-(하이드록시메틸)-피페리딘-1-일]-메타논;

(r) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*S*)-3-(하이드록시메틸)-모르폴린-4-일]-메타논;

(s) 4-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)-(3*R*)-3-(하이드록시메틸)피페라진-1-일}-카르복실산 *tert*-부틸 에스테르;

(t) 2-[4-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)피페라진-1-일]에탄올;

(u) 3-((1,4-디아제판-1-일)카르보닐)-*N*-(2-플루오로-4-요오도페닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;

(v) *N*-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-(피페라진-1-일)카르보닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;

(w) 에틸 [4-({2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)-피페라진-1-일]아세트이트;

(x) [4-({2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-카르보닐)피페라진-1-일]아세트산;

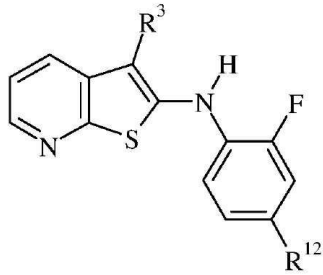
(y) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(2*R*)-2-(메톡시메틸)-피롤리딘-1-일]-메톤; 및

(z) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(2*R*)-2-(하이드록시메틸)-피페라진-1-일]-메타논

으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 16

제13항의 (b)에 있어서, MEK 억제제가 화학식 (II)로 표시되는 것, 및 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 및 *N*-산화물인 항-GREM1 길항제:



(II)

상기 식에서,

R^{12} 는 할로젠을 나타내고;

R^3 은 $CONR^bR^c$ 를 나타내고;

R^b 와 R^c 는 이들 둘 다에 부착된 질소 원자와 함께 아제티딘-1-일, 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 피페라진-1-일, 호모피페리딘-1-일, 호모-모르폴린-4-일 또는 호모피페라진-1-일을 나타내며, 이 기들 중 임의의 기는 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 하이드록시, 하이드록시(C_{1-6})알킬, 아미노-(C_{1-6})알킬, (아미노)(하이드록시)(C_{1-6})알킬, 할로젠, 옥소, C_{2-6} 알킬카르보닐, 카르복시, C_{2-6} 알콕시카르보닐, 디(C_{1-6})알킬하이드라지닐카르보닐, 아미노, C_{1-6} 알킬아미노, 디(C_{1-6})알킬-아미노, C_{2-6} 알킬카르보닐아미노, 아미노카르보닐아미노, 아미노카르보닐, C_{1-6} 알킬아미노카르보닐, 디(C_{1-6})알킬아미노카르보닐, 아미노설포닐, C_{1-6} 알킬설포닐, C_{1-6} 알킬아미노카르보닐 (C_{1-6})알킬, C_{1-6} 알콕시(C_{1-6})알킬, 카르복시(C_{1-6})알킬, C_{2-6} 알콕시카르보닐 (C_{1-6})알킬, C_{2-6} 알콕시카르보닐아미노 및 C_{2-6} 알콕시카르보닐아미노-(C_{1-6})알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환될 수 있고;

임의로, R^{12} 는 브로모 또는 요오드를 나타낸다.

청구항 17

제1항 내지 제13항의 (a) 중 어느 한 항에 있어서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 ERK 억제제이고; 임의로 (a) ERK 억제제가 울릭세르티닙, 테무테르킵, JSI-1187, 라복세르티닙 ASN007 또는 MK-8353이고/이거나;

(b) ERK 억제제가 울릭세르티닙이고; 추가로 임의로 ERK 억제제가 울릭세르티닙이고 암이 췌장암, 임의로 PDAC 인 항-GREM1 길항제.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 추가 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

청구항 19

암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제로서, 상기 방법은 항-GREM1 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 암, 상기 길항제 및/또는 상기 방법이 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 것인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서,

(a) Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 MEK 억제제이고; 임의로

(i) 상기 억제제가 셀루메티닙(AZD6244)이거나;

(ii) 상기 억제제가 트라메티닙(GSK-1120212)이거나;

(iii) 상기 억제제가 WX-554(UCB-554)이거나;

(b) Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 ERK 억제제이고; 임의로 상기 ERK 억제제가 올릭세르티닙인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.

청구항 22

치료 유효량의 항-GREM1 길항제를 치료 유효량의 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합하여, 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 암, 상기 길항제 및/또는 상기 방법이 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 24

항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조성물 또는 키트.

청구항 25

제24항에 있어서,

(a) 항-GREM1 길항제가 제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같고/같거나;

(b) Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 제13항의 (a) 내지 제17항 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 조성물 또는 키트.

청구항 26

이하의 (a) 또는 (b) 또는 (c)를 결정하는 방법:

(a) 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부, 여기서 방법은 상기 환자에서 GREM1의 간질 발현, GREM1의 상피 발현 및/또는 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함함; 또는

(b) 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부, 여기서 방법은 상기 환자에서 GREM1의 간질 발현 및/또는 GREM1의 상피 발현을 측정하고, 상기 환자가 RAS 유전자 또는 RAF 유전자의 돌연변이를 갖는지를 결정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함함; 또는

(c) 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부, 여기서 방법은 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 상기 환자에서 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함함.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 암의 치료 또는 예방을 위한 조합 요법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 항-GREM1 길항제, 및 관련 조성물과 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 간질 GREM1 과발현 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로 신호전달 또는 RAS 유

[0001]

전자 또는 RAF 유전자의 돌연변이를 기반으로 환자가 조합 요법에 반응할 가능성이 있는지를 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

미토젠-활성화 단백질 키나제(MAPK) 신호 전달도입 경로(예컨대, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로)는 세포 생존, 증식 및 분화에 결정적인 역할을 한다. 이러한 경로의 이상조절된 신호전달은 제어되지 않는 세포 증식으로 인해 암을 포함하는 다양한 질환과 관련되어 있다. 더욱이, MAPK 경로의 상향조절된 신호전달은 세포독성제, 면역조절제 및 EGFR 억제제를 포함하는 광범위한 항암 요법에 대한 반응으로 내성 기작으로서 보고되었다(Martinelli, E. et al., 2017; Kozar, I. et al., 2019; Kobayashi, Y. et al., 2020). MAPK 신호 전달도입 경로, 특히 Ras-Raf-MEK-ERK 신호 전달도입 경로의 억제제, 예컨대, MEK 및 ERK 억제제는 암 치료용으로 설명되었다. 예를 들어, MEK 억제제는 BRAF 돌연변이된 흑색종 및 KRAS/BRAF 돌연변이된 결장직장암의 치료에 사용하도록 승인되었다. 그러나, 획득된 내성은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호 전달도입 경로와 같은 MAPK 신호 전달도입 경로의 억제제로 치료를 받는 환자에서 흔하다. 따라서, 신규 암 치료 및 예방 요법을 개발할 필요가 있다. 기존 MAPK 경로 억제제의 효능을 개선할 수 있는 조합 요법도 필요하다.

[0003]

상당한 도전과제를 제시하는 암 중 하나는 췌장암이다. 췌장암은 최근 몇 년 동안 발병률이 증가한 치명적인 질환이다. 췌장암과 관련된 환경적 위험 요인은 흡연, 췌장염, 알코올, 비만, 감염 및 식단을 포함하는데, 이는 췌장암이 선진국에서 점점 더 흔해지고 있음을 의미한다. 화학요법과 조합된 수술적 절제(췌장-십이지장절제술)는 췌장암에 대한 유일한 장기적 생존을 제공한다. 그러나, 증상의 결여와 연관된 제한된 스크리닝은 환자가 전형적으로 후기 단계의 진행된 질환으로 진단되어, 수술적 절제 가능성이 제한됨을 의미한다. 결과적으로, 췌장암은 7% 미만의 5년 생존율 및 10년 이상에 걸쳐 5%의 좋지 않은 생존율을 가지므로, 모든 일반적인 암들 중에서 가장 낮은 생존율을 가진다. 지난 40년에 걸쳐, 생존율의 제한된 개선이 있었으므로, 췌장암에 대한 새로운 치료적 치료에 대한 시급한 필요성이 강화되었다. 절제 불가능한 종양에서, 표준 췌장암 치료는 화학요법이다. 그러나, 화학요법은 부작용과 관련되어 있고 암 재발은 흔하다. 췌장암에 대한 좋지 않은 예후 및 제한된 치료 전략과 조합된 늦은 진단으로 인해 개선된 요법이 필요하다.

발명의 내용

[0004]

본 발명자들은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달에 관여하는 유전자, 예컨대, NRas, Myc 및 Mapk1이 항-GREM1 길항제(예컨대, Ab7326)에 노출될 때 $LSL-Kras^{G12D/+}$; $LSL-Trp53^{R172H/+}$; $Pdx1-Cre(KPC)$ 마우스 모델에서 상향조절된다는 것을 입증하였다. 게다가, 본 발명자들은 놀랍게도 GREM1 길항제가 췌장암의 치료 또는 예방을 위해 MEK 억제제와 같은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 유리하게 투여될 수 있음을 보여주었다. 본 발명자들은 이러한 결과를 기반으로 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제, 예컨대, MEK 억제제 및 ERK 억제제를 포함하는 조합 요법이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 암의 치료 및 예방에 일반적으로 유용할 것이라고 예상한다. 나아가, 본 발명자들은 이러한 결과를 기반으로 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제, 예컨대, MEK 및 ERK 억제제를 포함하는 조합 요법이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절과 관련된 암, 또는 Ras 또는 Raf 유전자의 돌연변이를 함유하는 암의 치료 및 예방에 일반적으로 유용할 것이라고 예상한다. 본원에 제공된 생체내 결과는 MEK 억제제와의 조합으로 GREM1 길항제를 투여함으로써 $LSL-Kras^{G12D/+}$; $LSL-Trp53^{R172H/+}$; $Pdx1-Cre(KPC)$ 마우스 모델에서 유의미하게 증가된 생존뿐만 아니라, 더 느린 종양 성장 및 종양 수축도 예증한다. 본 발명자들의 발견은 암, 특히 췌장암의 예방 및 치료를 위한 개선된 접근법을 제공한다.

[0005]

따라서, 본 발명의 첫 번째 측면에서, 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 항-GREM1 길항제를 제공하고, 여기서 이 방법은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0006]

본 발명의 추가 측면에서, 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 제공하고, 여기서 이 방법은 항-GREM1 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0007]

본 발명의 또 다른 측면에서, 치료 유효량의 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 치료 유효량의 항-GREM1 길항제를, 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

[0008]

본 발명의 또 다른 측면에서, 항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조성물 또는 키트를 제공한다.

[0009] 본 발명의 추가 측면에서, 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 이 방법은 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 상기 환자에서 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다.

[0010] 본 발명의 추가 측면에서, 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 이 방법은 상기 환자에서 GREM1의 간질 발현, GREM1의 상피 발현 및/또는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면에서, 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 이 방법은 상기 환자에서 GREM1의 간질 발현 및/또는 GREM1의 상피 발현을 측정하고, 환자가 RAS 유전자 또는 RAF 유전자의 돌연변이를 갖는지를 결정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1 - 표시된 바와 같이 중앙값 초과 또는 미만의 그래핀-1 발현을 가진 PDAC 환자의 생존을 보여주는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 분석. 높은 수준의 그래핀 1을 발현하는 종양을 가진 환자는 낮은 발현을 가진 환자에 비해 유의미하게 더 좋지 않은 예후를 가진다. 케이애플롯터(KMplotter)로부터 생성됨.

도 2 - (a) 번식 전략 및 (b) 실험 설계를 보여주는 개략도.

도 3 - 나노스트링(NanoString) 기술을 통해 프로파일링된 46개 유전자의 KPC 마우스 모델에서의 유전자 발현. A. 화산 플롯으로 도시된 조절되지 않은 p-값. B. Nras 발현의 선형 모델. C. Myc 발현의 선형 모델. D. Mapk1 발현의 선형 모델.

도 4 - KRAS 경로에 대한 Ab7326 mIgG1 노출의 효과를 입증하는 경로 농후화.

도 5 - 약력학적 연구에서 (표시된 바와 같은) 치료 시 개별 마우스에서 고해상도 초음파에 의해 측정된, 종양 부담을 보여주는 그래프.

도 6 - 생존 연구 코호트에서, 고해상도 초음파에 의해 측정된, (표시된 바와 같이) 치료받는 개별 마우스의 종양 부담을 보여주는 그래프.

도 7 - 표시된 바와 같이, Ab7326 mIgG1(n = 9), 셀루메티닙(n = 8), 또는 셀루메티닙과 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 9)로 치료를 시작한 후부터 *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}* (KPC) 마우스의 생존을 보여주는 카플란-마이어 분석.

도 8 - 표시된 바와 같이 치료한 마우스에서 암 관련 섬유모세포의 마커(α SMA 및 포도플라닌)에 대한 항체를 사용한 IHC, 및 콜라겐 I과 III에 대한 피크로시리우스 레드(Picrosirius Red) 염색의 (HALO 소프트웨어 분석에 의한) 점수와 그래프.

도 9a - 표시된 바와 같이, 비히클 대조군(n = 10), Ab7326 mIgG1(n = 10), UCB-554(n = 10), 또는 UCB-554와 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 11)로 치료를 시작한 후부터 *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}* (KPC) 마우스의 생존을 보여주는 카플란-마이어 분석.

도 9b - 비히클 대조군(n = 10), Ab7326 mIgG1(n = 8), UCB-554(n = 10), 또는 UCB-554와 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 11)로 치료한 개별 KPC 마우스에서, 고해상도 초음파에 의해 측정될 때, 치료 시작 후 7일째 날 종양 부피를 보여주는 상자와 수염 플롯. 각각의 상자는 사분위간 범위를 도시하고, 수염은 최소 및 최대 관찰치를 도시한다. 실선 수평 막대는 중앙값을 나타내고 수평 점선은 평균 부피를 나타낸다.

도 9c - 비히클 대조군(n = 10), 또는 UCB-554와 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 11)을 사용한 치료 시 개별 KPC 마우스에서, 고해상도 초음파에 의해 측정될 때, 시간 경과에 따른 종양 부담을 보여주는 그래프.

도 10a - 표시된 바와 같이, 비히클 대조군(n = 10), Ab7326 mIgG1(n = 19), 셀루메티닙(n = 17), 또는 셀루메티닙과 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 19)로 치료를 시작한 후부터 *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}* (KPC) 마우스의 생존을 보여주는 카플란-마이어 분석. 데이터는 도 7에 표시된 데이터를 포함하는 조합된 데이터세트이다.

도 10b - 비히클 대조군(n = 10), Ab7326 mIgG1(n = 8), 셀루메티닙(n = 9), 또는 셀루메티닙과 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 10)로 치료한 개별 KPC 마우스에서, 고해상도 초음파에 의해 측정될 때, 치료 시작 후 7일째 날 중앙 부피를 보여주는 상자와 수염 플롯. 각각의 상자는 사분위간 범위를 도시하고, 수염은 최소 및 최대 관찰치를 도시한다. 실선 수평 막대는 중앙값을 나타내고 수평 점선은 평균 부피를 나타낸다.

도 10c - 비히클 대조군(n = 10), 또는 셀루메티닙과 조합된 Ab7326 mIgG1(n = 10)을 사용한 치료 시 개별 KPC 마우스에서, 고해상도 초음파에 의해 측정될 때, 시간 경과에 따른 중앙 부피를 보여주는 그래프.

표의 간단한 설명

표 1 - *Kras^{G12D+}* 마우스 체장관 세포에 비해 KPC 중앙 및 조합된 모든 체장 마우스 모델에서 상향조절된 *grem1*을 보여주는 표.

표 2 - 제공된 치료의 용량과 일정, 각각의 치료에 대한 마우스 수, 및 각각의 치료 코호트에서의 중앙값 생존 기간을 보여주는 표.

표 3 - 제공된 치료의 용량과 일정, 아암(arm)당 마우스 수, 및 샘플링 시점을 보여주는 표.

표 4 - 제공된 치료의 용량과 일정, 각각의 치료에 대한 마우스 수, 및 각각의 치료 코호트에서의 중앙값 생존 기간을 보여주는 표. * 사용된 과거 데이터를 나타낸다.

표 5 - 치료 코호트 사이의 생존 통계자료를 비교한 표(로그-순위 분석). Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합으로 치료한 마우스는 셀루메티닙 단독에 비해 생존의 유의미한 증가를 보인다.

표 6 - 치료 시 개별 마우스에 대한 생존 데이터와 검열을 보여주는 표.

표 7 - 분석된 개별 마우스 샘플을 보여주는 표.

표 8 - 제공된 치료의 용량과 일정, 각각의 치료에 대한 마우스 수, 및 각각의 치료 코호트에서의 중앙값 생존 기간을 보여주는 표.

표 9 - Ab7326과 UCB-554 조합으로 치료한 KPC 마우스에 대한 생존 통계자료의 요약.

표 10 - Ab7326과 셀루메티닙 조합으로 치료한 KPC 마우스에 대한 생존 통계자료의 요약.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 개시된 생성물 및 방법의 다양한 적용은 당분야의 구체적인 요건에 맞게 조정될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 오로지 본 발명의 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다.
- [0014] 추가로, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥이 명확히 달리 명시하지 않는 한, 단수형은 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "억제제"의 언급은 둘 이상의 이러한 억제제를 포함하거나, "올리고뉴클레오타이드"의 언급은 둘 이상의 이러한 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0015] 앞에서 또는 뒤에서 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 전체적으로 본원에 참고로 포함된다.
- [0016] 항-GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 요법
- [0017] 본 발명은 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한, MEK 또는 ERK 억제제와 같은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공한다. 암은 전형적으로 GREM1 과발현을 가진 암 및/또는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호 전달도입 경로 이상조절과 관련된 암이다. 암은 추가로 또는 대안적으로 항-GREM1 길항제에 노출되거나 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내는 암일 수 있다. 구체적으로, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달이 유도/상향조절되는 암일 수 있다. 이러한 암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는

기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다. 암은 추가로 또는 대안적으로 RAS 또는 RAF 유전자의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명은 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제도 제공하고, 여기서 이 방법은 항-GREM1 길항제의 별도, 순차적 또는 동시적 투여를 포함한다.

[0019] Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제

[0020] Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 세포 생존, 증식 및 분화에 관여하는 Ras-Raf-MEK-ERK 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK) 신호 전달도입 캐스케이드(본원에서 고전적 MAPK 경로, Raf/MEK/ERK, Raf-MEK-ERK, Ras-조절 Raf-MEK-ERK 경로, MAPK/ERK(MEK), Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK), Ras-Raf-MAPK 또는 Raf-MEK-ERK 경로로도 지칭될 수 있음)를 표적화하는 임의의 억제제일 수 있다. MAPK 캐스케이드는 여러 세포내 신호전달 경로로 구성된다. 전형적으로, 세포 표면에서 성장 인자와 그의 동족 수용체(예컨대, EGF/EGFR)의 결합은 작은 GTPase Ras의 동원을 유발하고, 이는 세린 트레오닌 키나제 RAF를 활성화하여, 미토겐-활성화 단백질 키나제 키나제(MEK) 효소인 MEK1 및 MEK2의 인산화와 활성화를 유발한다. MEK1 및 MEK2(각각 Map2k1 및 Map2k2로서도 알려짐)는 Erk1 및 Erk2를 인산화하여(MAPK), 핵으로의 이들의 전위 및 여러 전사 인자의 활성화를 유발하는 이중 특이성 키나제이다. 따라서, MEK 억제제는 통상적으로 Erk1/Erk2의 MEK1/MEK2 인산화 및 다운스트림 신호전달 경로를 차단한다. ERK 억제제는 또한 Erk1/Erk2의 인산화를 방지할 수 있고/있거나 Erk1/Erk2의 촉매 활성을 억제할 수 있다.

[0021] 본 발명자들은 항-GREM1 길항제에 노출된 후에 KPC 마우스 모델에서 KRAS 신호전달이 상향조절된다는 것을 확인하였다(도 4). 더욱이, Ras-Raf-MEK-ERK 경로에 관여하는 유전자, 예컨대, *Mapk1*, *Nras* 및 *Myc*는 KPC 마우스 모델에서 항-GREM1 항체 Ab7326에 노출될 때 상향조절된다(도 3). 본 발명자들은 항-GREM1 항체와 MEK 억제제의 조합이 이 모델에서 유의미한 항-종양 활성을 가진다는 것도 보여주었다. 따라서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 포함하는 조합 요법은 GREM1 과발현, Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras와 Raf 유전자의 돌연변이와 관련된 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0022] 또한, 본원에 정의된 항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제, 예컨대, MEK 억제제 또는 ERK 억제제를 포함하는 조합 요법은 항-GREM1 길항제에 사전노출시키거나 이 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 암의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 구체적으로, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달이 유도/상향조절되는 암일 수 있다. 이러한 암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0023] 이상조절은 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 기준 샘플 또는 기준 수준에 비해 상향조절되거나 하향조절된다는 것을 의미한다. Ras-Raf-MEK-ERK 경로는 mRNA 또는 단백질 수준에서 상향조절될 수 있거나 하향조절될 수 있다. 예를 들어, 암은 본 발명의 항-GREM1 길항제에 노출된 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로에서 유전자/단백질의 상향조절을 나타내는 암일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 암은 본 발명의 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 Map2k1, Map2k2, Erk1 및/또는 Erk2의 증가된 인산화를 나타내는 암일 수 있다. 암은 GREM1 길항제를 사용한 치료에 대해 앞에서 설명된 암 또는 종양일 수 있다. 이러한 암은 췌장암, 다발성 골수종, 결장직장암, 유방암 및 전립선암을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 암은 췌장암이다.

[0024] 본원에서 사용된 바와 같이, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 그의 약학적으로 허용되는 염 및 용매화물을 포함한다.

[0025] Ras-Raf-MEK-ERK 경로(고전적 MAPK 캐스케이드) 내의 임의의 단백질은 본 발명에 사용할 억제제에 의해 표적화될 수 있다. 따라서, 상기 억제제는 Ras-Raf-MEK-ERK 경로의 적어도 하나의 구성요소를 표적화하여 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달을 억제한다. Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달의 억제는 전형적으로 상기 경로의 적어도 하나의 구성요소의 활성을 감소시키는 것을 포함한다. 따라서, 상기 억제제는 Ras-Raf-MEK-ERK 경로(고전적 MAPK 캐스케이드)의 임의의 구성요소(전형적으로 임의의 단백질)의 직접적 또는 간접적 억제제일 수 있다. 예를 들어, Ras-Raf-MEK-ERK 경로의 억제제는 직접적 또는 간접적 RAS 억제제, 예컨대, KRAS 억제제(예를 들어, ARS-1620 또는 MRTX849)일 수 있다. 대안적으로, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 소라페닙, 베무라페닙, 다브라페닙 또는 엔코라페닙과 같은 RAF 억제제일 수 있다. 또 다른 측면에서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 MEK 억제제일 수 있다. 예시적인 MEK 억제제는 뒤에서 자세히 기재되어 있다. 추가 측면에서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 ERK 억제제, 예컨대, 울릭세르티닙(4-[5-클로로-2-[(1-메틸에틸)아미노]-4-피리디닐]-N-[(1S)-1-(3-클로로

페닐)-2-하이드록시에틸]-1H-피롤-2-카복스아미드, 모노하이드로클로라이드; (S)-4-(5-클로로-2-(이소프로필아미노)피리딘-4-일)-N-(1-(3-클로로페닐)-2-하이드록시에틸)-1H-피롤-2-카복스아미드; BVD-523; VRT-752271), 테무테르킵(LY3214996; 4H-티에노[2,3-c]피롤-4-온, 5,6-디하이드로-6,6-디메틸-2-[2-[(1-메틸-1H-피라졸-5-일)아미노]-4-피리미딘-5-일]-2-(4-모르폴리닐)에틸]; 6,6-디메틸-2-[2-[(2-메틸피라졸-3-일)아미노]피리미딘-4-일]-5-(2-모르폴린-4-일에틸)티에노[2,3-c]피롤-4-온), JSI-1187, 라복세르티닙(1-[(1S)-1-(4-클로로-3-플루오로페닐)-2-하이드록시에틸]-4-[2-[(2-메틸피라졸-3-일)아미노]피리미딘-4-일]피리딘-2-온; (S)-1-(1-(4-클로로-3-플루오로페닐)-2-하이드록시에틸)-4-(2-((1-메틸-1H-피라졸-5-일)아미노)피리미딘-4-일)피리딘-2(1H)-온); MK-8353((3S)-3-메틸설파닐-1-[2-[4-[4-(1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일)페닐]-3,6-디하이드로-2H-피리딘-1-일]-2-옥소에틸]-N-[3-(6-프로판-2-일옥시피리딘-3-일)-1H-인다졸-5-일]피롤리딘-3-카복스아미드; (S)-N-(3-(6-이소프로폭시피리딘-3-일)-1H-인다졸-5-일)-1-(2-(4-(4-(1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)페닐)-3,6-디하이드로피리딘-1(2H)-일)-2-옥소에틸)-3-(메틸티오)피롤리딘-3-카복스아미드), 또는 ASN007 ((S)-N-(2-아미노-1-(3-클로로-5-플루오로페닐)에틸)-1-(5-메틸-2-((테트라하이드로-2H-피란-4-일)아미노)피리미딘-4-일)-1H-이미다졸-4-카복스아미드)일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, ERK 억제제는 울릭세르티닙이다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, ERK 억제제 울릭세르티닙 및 치료할 암은 췌장암, 바람직하게는 췌장관 선암종(PDAC)이다. Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로의 다른 억제제는 당분야에 잘 알려져 있다.

[0026]

본 발명의 바람직한 측면에서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 MEK 억제제이다. 항-GREM1 길항제와의 조합으로 사용하기 위한 MEK 억제제는 알로스테릭 MEK 억제제 및/또는 MEK1 및/또는 MEK2 억제제일 수 있다. 용어 "알로스테릭 MEK 억제제"는 MEK의 ATP 결합 포켓 외부의 알로스테릭 부위에 결합하는 억제제를 지칭한다. 알로스테릭 MEK 억제제(III형 MEK 억제제로서도 알려짐)는 높은 선택성을 나타내고 전형적으로 MEK1/2의 활성화 루프에서 이동을 감소시킴으로써 작용한다. 다른 MEK 억제제는 ATP 결합에 대해 경쟁하고 MEK의 촉매 부위를 점유하거나(I형) ATP 결합 포켓 내의 인접 부위에 결합하는(II형) I형 MEK 억제제 및 II형 MEK 억제제를 포함한다. 세 가지 유형의 MEK 억제제 모두가 본 발명의 방법에 사용될 것으로 예상된다. 즉, I형, II형 또는 III형 MEK 억제제는 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

[0027]

예시적인 알로스테릭 MEK 억제제는 셀루메티닙(AZD6244; ARRY-142886; 6-(4-브로모-2-클로로아닐리노)-7-플루오로-N-(2-하이드록시에톡시)-3-메틸벤즈이미다졸-5-카복스아미드) 또는 트라메티닙(GSK-1120212; N-(3-{3-사이클로프로필-5-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일}페닐)아세트아미드를 포함한다. 본 발명에 사용할 다른 예시적인 MEK 억제제는 셀루메티닙(AZD6244), 트라메티닙(GSK-1120212), 코비메티닙(GDC-0973; (S)-[3,4-디플루오로-2-(2-플루오로-4-요오도페닐아미노)페닐][3-하이드록시-3-(피페리딘-2-일)아세트아미드-1-일]메탄올), 비니메티닙(MEK162; 5-((4-브로모-2-플루오로페닐)아미노)-4-플루오로-N-(2-하이드록시에톡시)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-6-카복스아미드), CI-1040(PD184352), 미르다메티닙(PD0325901; N-[(2R)-2,3-디하이드록시프로폭시]-3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]벤즈아미드), TAK733((R)-3-(2,3-디하이드록시프로필)-6-플루오로-5-(2-플루오로-4-요오도페닐아미노)-8-메틸피리도[2,3-d]피리미딘-4,7(3H,8H)-디온; 3-[(2R)-2,3-디하이드록시프로필]-6-플루오로-5-(2-플루오로-4-요오도아닐리노)-8-메틸피리도[2,3-d]피리미딘-4,7-디온), 레파메티닙(RDEA119/Bay 86-9766; N-[3,4-디플루오로-2-(2-플루오로-4-요오도아닐리노)-6-메톡시페닐]-1-[(2S)-2,3-디하이드록시프로필]사이클로프로판-1-설폰아미드), RO-5126766 (3-[[2-[(메틸아미노설폰)아미노]-3-플루오로피리딘-4-일]메틸]-4-메틸-7-[(피리미딘-2-일)옥시]-2H-1-벤조피란-2-온); N-[3-플루오로-4-[[4-메틸-2-옥소-7-(2-피리미디닐옥시)-2H-1-벤조피란-3-일]메틸]-2-피리디닐]-N'-메틸-설프아미드), RO5068760, 피마세르티닙(AS703026; N-[(2S)-2,3-디하이드록시프로필]-3-(2-플루오로-4-요오도아닐리노)피리딘-4-카복스아미드), AZD8330(2-(2-플루오로-4-요오도아닐리노)-N-(2-하이드록시에톡시)-1,5-디메틸-6-옥소피리딘-3-카복스아미드; 2-((2-플루오로-4-요오도페닐)아미노)-N-(2-하이드록시에톡시)-1,5-디메틸-6-옥소-1,6-디하이드로피리딘-3-카복스아미드), GDC-0623(5-(2-플루오로-4-요오도아닐리노)-N-(2-하이드록시에톡시)이미다조[1,5-a]피리딘-6-카복스아미드), RO-4987655(3,4-디플루오로-2-(2-플루오로-4-요오도아닐리노)-N-(2-하이드록시에톡시)-5-[(3-옥소옥사지난-2-일)메틸]벤즈아미드), WX-554(UCB-554; [3-(아미노메틸)아세트아미드-1-일]-[2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-b]피리딘-3-일]-메탄올), HL-085, ARRY-300, ClnQ-03, G-573, PD184161(5-브로모-2-[(2-클로로-4-요오도페닐)아미노]-N-(사이클로프로필메톡시)-3,4-디플루오로-벤즈아미드), PD318088(5-브로모-N-(2,3-디하이드록시프로폭시)-3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]-벤즈아미드), PD98059(2-(2-아미노-3-메톡시페닐)-4H-1-벤조피란-4-온), U0126(1,4-디아미노-2,3-디시아노-1,4-비스(2-아미노페닐티오)부타디엔; (2Z,3Z)-2,3-비스[아미노[(2-아미노페닐)티오]메틸렌]부탄디니트릴) 또는 SL327을 포함한다.

[0028]

본 발명의 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 셀루메티닙(AZD6244) 또는 트라메티닙(GSK-1120212)이다. 본

발명의 특히 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 셀루메티닙(AZD6244) 또는 트라메티닙(GSK-1120212)이고 치료할 암은 췌장암, 바람직하게는 췌장관 선암종(PDAC)이다.

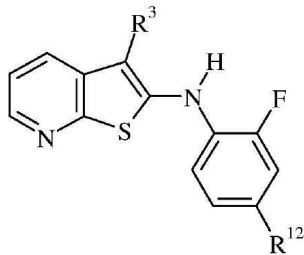
- [0029] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 치환된 아닐리노 모이어티로 2 위치에서 치환된 티에노[2,3-*b*]피리딘 유도체의 부류에 속한다. 이 부류에 속하는 예시적인 MEK 억제제는 다음을 포함한다:
- [0030] - N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-(모르폴린-4-일카르보닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- [0031] - N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-[(4-메틸피페라진-1-일)카르보닐]티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- [0032] - [2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일](피롤리딘-1-일)메타논;
- [0033] - (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}피페리딘-4-일)-카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0034] - 2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르복실산 (4-아미노피페리딘-1-일)아미드 디하이드로-클로라이드;
- [0035] - (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}아제티딘-3-일메틸)-카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0036] - [3-(아미노메틸)아제티딘-1-일]-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0037] - (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}-(3*R*)-피롤리딘-3-일)카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0038] - (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}-(3*S*)-피롤리딘-3-일)카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0039] - (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}아제티딘-3-일)-카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0040] - [(3*R*)-3-아미노피롤리딘-1-일]-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0041] - [(3*S*)-3-아미노피롤리딘-1-일]-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0042] - (3-아미노아제티딘-1-일)-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0043] - {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-(3-하이드록시아제티딘-1-일)-메타논;
- [0044] - {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*R*)-3-하이드록시피롤리딘-1-일]-메타논;
- [0045] - {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*S*)-3-하이드록시피롤리딘-1-일]-메타논;
- [0046] - {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[2-(하이드록시메틸)-피페리딘-1-일]-메타논;
- [0047] - {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*S*)-3-(하이드록시메틸)-모르폴린-4-일]-메타논;
- [0048] - 4-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}-(3*R*)-3-(하이드록시메틸)피페라진-1-카르복실산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0049] - 2-[4-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}카르보닐)피페라진-1-일]에탄올;
- [0050] - 3-[(1,4-디아제판-1-일카르보닐)-N-(2-플루오로-4-요오도페닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민];
- [0051] - N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-(피페라진-1-일카르보닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- [0052] - 에틸 [4-({2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}카르보닐)-피페라진-1-일]아세트레이트;
- [0053] - [4-({2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}카르보닐)피페라진-1-일]아세트산;

[0054] - {2-(((2-플루오로-4-요오도페닐)아미노)티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일)-[(2*R*)-2-(메톡시메틸)-피롤리딘-1-일]-메톤; 및

[0055] - {2-(((2-플루오로-4-요오도페닐)아미노)티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일)-[(2*R*)-2-(하이드록시메틸)-피페라진-1-일]-메타논.

[0056] 이러한 MEK 억제제를 제조하는 방법은 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 국제 특허 출원 공개 제WO 2007/088345호에 개시되어 있다.

[0057] 본 발명에 사용하기 위해 치환된 아닐리노 모이어티로 2 위치에서 치환된 티에노[2,3-*b*]피리딘 유도체의 부류에 속하는 바람직한 MEK 억제제는 화학식 (II)의 화합물로 표시되는 것, 및 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 및 *N*-산화물이다:



(II)

[0058]

[0059] 상기 식에서,

[0060] R¹²는 할로젠을 나타내고;

[0061] R³은 CONR^bR^c를 나타내고;

[0062] R^b와 R^c는 이들 둘 다에 부착된 질소 원자와 함께 아제티딘-1-일, 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 피페라진-1-일, 호모피페리딘-1-일, 호모-모르폴린-4-일 또는 호모피페라진-1-일을 나타내며, 이 기들 중 임의의 기는 C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, 하이드록시, 하이드록시(C₁₋₆)알킬, 아미노-(C₁₋₆)알킬, (아미노)(하이드록시)(C₁₋₆)알킬, 할로젠, 옥소, C₂₋₆ 알킬카르보닐, 카르복시, C₂₋₆ 알콕시카르보닐, 디(C₁₋₆)알킬하이드라지닐카르보닐, 아미노, C₁₋₆ 알킬아미노, 디(C₁₋₆)알킬-아미노, C₂₋₆ 알킬카르보닐아미노, 아미노카르보닐아미노, 아미노카르보닐, C₁₋₆ 알킬아미노카르보닐, 디(C₁₋₆)알킬아미노카르보닐, 아미노설포닐, C₁₋₆ 알킬설포닐, C₁₋₆ 알킬아미노카르보닐 (C₁₋₆)알킬, C₁₋₆ 알콕시(C₁₋₆)알킬, 카르복시(C₁₋₆)알킬, C₂₋₆ 알콕시카르보닐 (C₁₋₆)알킬, C₂₋₆ 알콕시카르보닐아미노 및 C₂₋₆ 알콕시카르보닐아미노-(C₁₋₆)알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환될 수 있다.

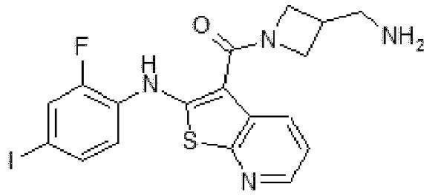
[0063] 한 실시양태에서, R¹²는 브로모이다. 또 다른 실시양태에서, R¹²는 요오도이다.

[0064] 화학식 (II)의 화합물을 제조하는 방법은 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 국제 특허 출원 공개 제WO 2007/088345호에 개시되어 있다.

[0065] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 화학식 (II)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 *N*-산화물이다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 화학식 (II)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 *N*-산화물이며, 치료할 암은 췌장암, 바람직하게는 췌장관 선암종(PDAC)이다.

[0066] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 WX-554(UCB-554)이다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 WX-554(UCB-554)이고, 치료할 암은 췌장암, 바람직하게는 췌장관 선암종(PDAC)이다.

[0067] WX-554(UCB-554); [3-(아미노메틸)아제티딘-1-일]-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논)의 구조는 여기에 도시되어 있다:



[0068]

[0069]

WX-554를 제조하는 방법은 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 국제 특허 출원 공개 제WO 2007/088345호에 개시되어 있다.

[0070]

치환된 아닐리노 모이어티로 2 위치에서 치환된 티에노[2,3-*b*]피리딘 유도체의 부류에 속하는 상기 MEK 억제제는 인간 MEK1 및/또는 MEK2 효소에 대해 50 μM 이하, 일반적으로 20 μM 이하, 통상적으로 5 μM 이하, 전형적으로 1 μM 이하, 적절하게는 500 nM 이하, 이상적으로는 100 nM 이하, 바람직하게는 20 nM 이하의 결합 친화성 (IC_{50})을 가진 강력한 선택적 MEK 억제제이다(숙련된 자는 더 낮은 IC_{50} 수치가 더 활성적인 화합물을 표시한다는 것을 이해할 것이다). 본 발명에 사용하기 위한 이러한 MEK 억제제는 다른 인간 키나제에 비해 인간 MEK1 및/또는 MEK2 효소에 대해 적어도 10배 선택적 친화성, 전형적으로 적어도 20배 선택적 친화성, 적절하게는 적어도 50배 선택적 친화성, 이상적으로는 적어도 100배 선택적 친화성을 가질 수 있다.

[0071]

다양한 방법을 이용하여 예컨대, 시험관내 MEK 어세이에서 MEK 억제제의 활성을 측정할 수 있다. 예시적인 시험관내 MEK 어세이는 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 국제 특허 출원 공개 제WO 2007/088345호에 설명되어 있다.

[0072]

본원에 정의된 GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제, 예컨대, MEK 억제제 또는 ERK 억제제를 포함하는 조합 요법은 전형적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 의해 표적화되는 암의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다는 것도 예상된다. 암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 대해 앞에서 설명된 암 또는 종양일 수 있다. 이러한 암은 췌장암, 다발성 골수종, 결장직장암, 폐암 및 흑색종을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0073]

암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 암, 및/또는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 의해 치료될 것으로 예상되는 암일 수 있다. 대안적으로, 암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 암일 수 있다. 암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로서 이전에 설명되어 있을 수 있다. 일부 경우, 암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 반응성은 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 치료에 대한 반응성은 X-선, CT 또는 MRI 스캔을 이용하여 치료 전과 후에 종양 크기를 측정하거나 종양 마커를 측정함으로써 평가될 수 있다. 장기 기능을 확인하기 위한 혈액 검사도 치료에 대한 반응성을 평가하는 데 이용될 수 있다. 췌장암에서 반응성을 모니터링하기 위한 예시적인 혈액 마커 중 하나는 CA19-9이다. 당분야에서 숙련된 자는 치료에 대한 암의 반응성을 측정하는 방법을 알고 있다.

[0074]

앞

[0075]

항-GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제, 예컨대, MEK 또는 ERK 억제제를 포함하는 조합 요법과 관련하여, 암은 임의의 암 또는 종양일 수 있다. 특히, 항-GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법과 관련하여, 암은 간질, 전형적으로 섬유조직형성 간질을 가진 임의의 암 또는 종양일 수 있다. 암은 GREM1에 의해 유발된 임의의 암 또는 종양일 수 있다. 암은 간질 및/또는 상피 GREM1 과발현이 관찰되는 임의의 암일 수 있다. 암 또는 종양은 간질 GREM1 과발현을 가질 수 있고 상피 GREM1 과발현을 갖지 않을 수 있다. 암 또는 종양은 상피 GREM1 과발현을 가질 수 있고 간질 GREM1 과발현을 갖지 않을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 암 또는 종양은 섬유조직형성 간질에서 GREM1의 과발현을 가진다. 암 또는 종양은 GREM1 길항제, MEK 억제제 및/또는 ERK 억제제로 표적화하기에 적합한 임의의 암 또는 종양일 수 있으며, 이러한 작용제(들)로 표적화하기에 적합한 것으로 당분야에 알려진 임의의 암 또는 종양, 및 이러한 작용제(들)로 치료하기에 적합한 것으로 당분야에 알려진 임의의 암 또는 종양을 포함할 수 있다.

[0076]

암 또는 종양은 고형 종양일 수 있다. 고형 종양은 섬유조직형성 간질을 가질 수 있다.

[0077]

항-GREM1 길항제는 2019년 6월 18일에 출원된 국제 특허 출원 공개 제WO 2019/243801호에서 다양한 암을 치료하

는 데 효과적인 것으로 이미 밝혀졌으며, 이 국제 특허 출원의 개시내용은 전체적으로 본원에 참고로 포함된다.

- [0078] 치료할 수 있는 특히 바람직한 암은 결장직장암, 다발성 골수종, 췌장암, 방광암, 유방암, 폐암, 위암, 십이지장암, 식도암, 두경부암, 전립선암, 신경교종, 자궁내막암, 난소암, 간암, 비장암, 골 상주 암, 흑색종 및 골육종을 포함한다. 치료할 수 있는 암은 장암, 결장암 또는 직장암일 수 있다. 치료할 암은 파종성 암, 예를 들어, 전이성 암일 수 있다. 파종성 암은 체내에서 그의 최초 기원 부위로부터 퍼진 암으로서 이해되어야 한다. 예를 들어, 파종성 암은 환자의 췌장, 골수, 결장, 전립선 또는 유방 조직으로부터 유래하였으나, 예를 들어, 환자의 간 또는 폐로 퍼진 암일 수 있다.
- [0079] GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법은 암의 파종을 예방하는 데 사용될 수도 있다.
- [0080] GREM 1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법은 암과 관련된 용종증을 예방하는 데 사용될 수 있다.
- [0081] 등급화 시스템은 암 생물학 및 의학에서 암 세포를 그의 세포 분화의 결여에 대해 분류하는 데 사용된다. 이것은 암 세포가 암 세포의 기원이 되는 조직에서 발견되는 건강한 세포와 형태학적으로 상이한 정도를 반영한다. 등급화 시스템은 특정 암이 얼마나 빨리 성장할 것으로 예상되는지에 대한 지표를 제공하는 데 사용될 수 있다. 전형적으로 사용되는 암 등급은 등급(G) X 및 1 내지 4이다. GX는 암 등급을 평가할 수 없음을 표시한다. G1(저등급) 암 세포는 정상적인 건강한 세포와 유사한 형태를 가지며(즉, 잘 분화됨) 느리게 성장할 것으로 예상되고, 퍼질 가능성이 적다. G2(중간 등급) 암 세포는 중간 정도로 분화된다, 즉 더 비정상적으로 보이며 G1 세포보다 약간 더 빨리 성장할 것으로 예상된다. G3(고등급) 암 세포는 정상 세포에 비해 매우 상이한 형태를 가지며(즉, 잘 분화되지 않음) G1 및 G2 세포보다 더 빨리 성장할 것으로 예상된다. G4(고등급) 암 세포는 미분화되고(역형성으로서도 지칭됨) 가장 높은 증식 능력을 가질 것으로 예상된다.
- [0082] 암 등급화는 암이 어떻게 퍼질 것인지에 대한 지표를 제공하는 암 병기분류와 상이하다. 일반적인 암 병기분류 시스템은 5 가지 병기를 가진다, 즉 0 기: 제자리 암 세포(즉, 그의 정상 조직에 위치함); I 기: 암이 신체의 한 부분에 국한됨; II 기: 암이 국소적으로 진행됨; III 기: 마찬가지로 암이 국소적으로 진행됨(암이 II 기로서 지정되는지 아니면 III 기로서 지정되는지는 구체적인 암 유형에 의해 좌우될 수 있음); 및 IV 기: 암이 종종 다른 장기 또는 신체 전체로 전이되거나 퍼짐.
- [0083] 당분야에서 숙련된 자는 암의 등급 및/또는 병기를 결정하는 방법을 알고 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 확립된 암의 치료 및/또는 예방을 위한, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합되는 항-GREM1 길항제의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 암은 확립된 암이다. 확립된 암은 고등급 암, 예를 들어, G3 또는 G4 암일 수 있다. 확립된 암은 II 기 이상의 암일 수 있다. 확립된 암은 III 기 또는 IV 기 암일 수 있다. 한 실시양태에서, 확립된 암은 전이된 IV 기 암이다. 한 실시양태에서, 확립된 암은 확립된 췌장암이다.
- [0084] 췌장암 치료 및 예방에의 구체적으로 예시된 적용 외에도, 본 발명자들은 실시예에 예증된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합된 GREM1 길항제의 치료 효능이 본원에 설명된 바와 같은 상응하는 특징을 가진 다른 암의 치료에도 적용될 수 있을 것이라고 예상한다.
- [0085] 구체적으로, GREM1 길항제를 포함하는 조합은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/이러한 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 암을 예방하거나 치료하는 데 유용할 것으로 예상된다. 구체적으로, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 암일 수 있다. 이러한 암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달을 나타낼 수 있다.
- [0086] GREM1 길항제를 포함하는 조합은 간질 및/또는 상피 GREM1 과발현이 있는 암을 예방하거나 치료하는 데 유용할 것이고, 이러한 과발현은 악성 세포 성장에 기여한다는 것도 예상된다. 이러한 암은 췌장암, 방광암, 폐암, 위암, 십이지장암, 식도암, 두경부암, 신경교종, 자궁내막암, 간암, 비장암, 골 상주 암, 및 골육종을 포함한다.
- [0087] 본 발명의 길항제는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제(예컨대, MEK 억제제 또는 ERK 억제제)와의 조합으로 암을 치료 또는 예방하는 데 사용된다. 암 예방은 대상체가 암 진단을 받는 것을 예방하거나 암 발병을 늦추는 것을 포함할 수 있다. 암 예방은 이전에 암으로 진단된 대상체에서 암 재발 또는 재발생을 예방하는 것도 포함할 수 있다. 암 예방은 암으로 진단되지 않았거나 이전에 암으로 진단된 대상체의 생존을 증가시키는 것을 추가로 포

함할 수 있다.

[0088] 암 치료는 암의 하나 이상의 증상을 호전시킬 수 있거나, 암으로부터의 관해를 유도하거나 연장할 수 있거나, 암의 재발 또는 재발생을 지연시킬 수 있다. 치료는 암을 치유할 수 있거나, 완화할 수 있거나 부분적으로 중단시킬 수 있다. 치료는 질병 증상의 중증도를 감소시킬 수 있거나, 무증상 기간의 빈도 또는 지속시간을 증가시킬 수 있다. 암 치료는 암(예를 들어, 확립된 암)이 환자 체내의 그의 최초 부위로부터 환자 체내의 하나 이상의 이차 부위로 퍼지는 것을 예방하는 것도 포함할 수 있다. 따라서, 암 치료는 기존 암의 파종 또는 전이의 예방을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 길항제는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제(예컨대, MEK 억제제 또는 ERK 억제제)와의 조합으로 췌장암을 치료하거나 예방하는 데 사용된다. 췌장암 치료는 예를 들어, CT 또는 내시경 초음파에 의해 어세이될 때, 원발성 종양 크기를 감소시킬 수 있다. 이러한 감소는 췌장의 머리로부터 종양을 제거하기 위한 휘플(Whipple) 수술(췌장십이지장절제술)을 용이하게 할 수 있다. 본 발명자들은 MEK 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 사용한 치료가 KPC 마우스 모델에서 생존을 증가시킬 수 있음을 입증하였다. 따라서, 항-GREM1 길항제 및 MEK 억제제를 사용한 췌장암 치료는 환자 생존도 개선할 수 있다. ERK 억제제를 사용한 암, 특히 췌장암 치료는 유사한 유리한 결과를 이끌어낼 것으로 예상된다.

[0089] 췌장암

[0090] 본 발명은 바람직하게는 췌장암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 실시예에 보다 자세히 설명된 바와 같이, 본 발명자들은 인간 췌장관 선암종 샘플에서 GREM1 과발현을 확인하였고, *Grem1* mRNA의 높은 발현이 좋지 않은 예후와 유의미하게 연관되어 있음을 입증하였다(도 1). 더욱이, 본 발명자들은 항-GREM1 길항제에 노출된 후에 KPC 마우스 모델에서 KRAS 신호전달이 상향조절되고(도 4), Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로에 관여하는 유전자, 예컨대, *Mapk1*, *Nras* 및 *Myc*가 KPC 마우스 모델에서 항-GREM1 항체 Ab7326에 노출될 때 상향조절됨(도 3)을 입증하였다. 본 발명자들은 항-GREM1 길항제와 MEK 억제제를 포함하는 조합 요법이 KPC 마우스 모델에서 생존을 유의미하게 증가시키고, 종양 성장을 늦추고, 종양 수축을 촉진한다는 것도 보여주었다. KPC 마우스는 조직학 및 병리학의 관점에서 인간 췌장 종양과 유사하고 인간 췌장암을 모방하는 종양을 발생시킨다.

[0091] 따라서, 한 실시양태에서, 췌장암은 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 췌장암이다. 또 다른 실시양태에서, 췌장암은 외분비 종양 또는 신경내분비 종양을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 췌장 신경내분비 암(췌도세포 종양으로서도 알려짐)은 췌장의 내분비선에서 발생한다. 특히 바람직한 형태의 췌장암은 외분비 췌장암, 예컨대, 췌장관 선암종(PDAC)이다. PDAC는 모든 췌장 암종의 90%를 차지하는 것으로 기재되어 있다(Feldmann *et al.* J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2007; 14(3): 224-32). 췌장암은 췌장관의 내벽에서 발생하는 임의의 암일 수 있다.

[0092] Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로는 췌장관 선암종에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Collisson EA. *et al.* (2012) A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Discov. 2012 2(8): 685-93). 예를 들어, *KRAS* 발암유전자의 돌연변이의 활성화는 세포 증식, 이동성 및 생존 향상을 촉진함으로써 PDAC 형성을 유도하는 것으로 알려져 있지만, *KRAS* 신호전달의 표적화는 어려운 과제로 남아있으며 MEK 억제제를 사용한 임상 시험은 대체로 환자에서 통계적으로 유의미한 결과를 달성하지 못하였다(Brauswetter *et al.* (2017) Molecular subtype specific efficacy of MEK inhibitors in pancreatic cancers. PLoS ONE 12(9): e0185687). 따라서, 한 실시양태에서, 치료할 췌장암은 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 췌장암이다. 예를 들어, 췌장암은 *KRAS*^{G12D} 또는 *KRAS*^{G12R} 돌연변이/치환을 가진 췌장암 종양일 수 있다. 대안적으로, 췌장암은 *BRAF*^{V600E} 돌연변이/치환을 가진 췌장암 종양일 수 있다.

[0093] 또 다른 실시양태에서, 췌장암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 췌장암이다. 구체적으로, 췌장암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 췌장암일 수 있다. 이러한 췌장암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 췌장암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0094] 다른 외분비 췌장암은 췌장관에서 형성되는 편평 세포 암종; 선편평 암종; 반지세포 암종; 및 전형적으로 관내 유두상 점액성 신생물로부터 발생하는 콜로이드 암종을 포함한다.

- [0095] 치료할 바람직한 유형의 췌장암은 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법)에 대한 내성을 나타낼 수 있다. 췌장암은 파종성 췌장암일 수 있다. 췌장암은 전이성 췌장암일 수 있다. 전이성 암은 체내에서 그의 최초 기원 부위로부터 퍼진 암으로서 이해되어야 한다. 따라서, 전이성 췌장암은 췌장에서 시작하여 폐, 간, 골 및 뇌와 같은 다른 장기로 퍼지는 암을 지칭한다. 전형적으로, 전이성 췌장암은 췌장에서 시작하여 폐 및/또는 간으로 퍼지는 암을 지칭한다. 췌장암은 재발성 췌장암일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 췌장암은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 췌장암을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 췌장암은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.
- [0096] 일부 측면에서, 췌장암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 췌장암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 췌장암일 수 있다. 췌장암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 췌장암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 췌장암일 수 있다. 췌장암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 췌장암일 수 있다. 일부 경우, 췌장암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 췌장암은 처음에는 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.
- [0097] 폐암
- [0098] 추가 측면에서, 본 발명은 폐암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 폐암은 가장 바람직하게는 비-소세포 폐암(NSCLC)이다. NSCLC는 III 기 또는 IV 기 NSCLC와 같은 진행성 NSCLC일 수 있다. NSCLC는 편평 세포 암종, 선암종 또는 대세포 암종일 수 있다. 암은 소세포 폐암일 수 있다. 폐암은 절제 불가능할 수 있다. 폐암은 비-혈관신생성일 수 있고/있거나 혈관 호선을 나타낼 수 있다. 폐암은 폐포 및/또는 간질성 종양 성장을 포함할 수 있다. 폐암은 원발성 폐암, 또는 폐로 퍼진 임의의 속발성 암, 예컨대, 유방암 또는 췌장암일 수 있다. 폐암은 파종성 폐암일 수 있다. 폐암은 전이성 폐암일 수 있다. 폐암은 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 폐암일 수 있다. 폐암은 재발성 폐암일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 폐암은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 폐암을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 폐암은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.
- [0099] 일부 측면에서, 폐암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 폐암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 폐암일 수 있다. 폐암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 폐암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 폐암일 수 있다. 폐암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 폐암일 수 있다. 일부 경우, 폐암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 폐암은 처음에는 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.
- [0100] 추가 측면에서, 치료할 폐암은 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 폐암이다. 예를 들어, 치료할 폐암은 본원에 설명된 바와 같이 MAPK/ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 비-소세포 폐암일 수 있다.
- [0101] 또 다른 실시양태에서, 폐암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로가 이상조절되는 폐암이다. 구체적으로, 폐암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 폐암일 수 있다. 이러한 폐암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 폐암은 본원

에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0102] 흑색종

[0103] 추가 측면에서, 본 발명은 흑색종의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 흑색종은 피부/살갗 흑색종, 예컨대, 표재성 확산성 흑색종, 결절성 흑색종, 흑자 악성 흑색종 또는 말단 흑자성 흑색종일 수 있다. 피부 흑색종은 무색소성 흑색종, 모반 흑색종, 스피즈오이드 흑색종 또는 섬유조직형성 흑색종일 수 있다. 일부 측면에서, 흑색종은 눈/안 흑색종, 예컨대, 결막 흑색종, 맥락막 흑색종 또는 홍채 흑색종일 수 있다. 다른 측면에서, 흑색종은 점막 흑색종일 수 있다.

[0104] 흑색종은 전이성 흑색종일 수 있다. 흑색종은 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 흑색종일 수 있다. 흑색종은 재발성 흑색종일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 흑색종은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 흑색종을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 흑색종은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.

[0105] 일부 측면에서, 흑색종은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 흑색종, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 흑색종일 수 있다. 흑색종은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 흑색종, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 흑색종일 수 있다. 흑색종은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 흑색종일 수 있다. 일부 경우, 흑색종은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 흑색종은 처음에는 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0106] 추가 측면에서, 치료할 흑색종은 본원에 설명된 바와 같이 MAPK/ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 흑색종이다.

[0107] 또 다른 실시양태에서, 흑색종은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 MAPK/ERK 경로가 이상조절되는 흑색종이다. 구체적으로, 흑색종은 항-GREM1 길항제를 사용한 치료 후에 MAPK/ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 흑색종일 수 있다. 이러한 흑색종은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 MAPK/ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 흑색종은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 MAPK/ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0108] 결장직장암

[0109] 한 측면에서, 본 발명은 결장직장암의 예방 또는 치료에 관한 것이다. 배경을 설명하자면, 장 점막은 복잡한 생태계이며, 상피는 그의 미세환경, 특히 기저 간질과 상호의존적인 관계를 가진다. 중간엽-상피 소통은 항상성을 조절하는 데 밀접하게 관여하고 장 재생과 암에서 동역학적으로 변경된다. 세포 신호전달 네트워크는 구획간 소통의 이펙터 경로이며 상피 세포 운명 결정을 제어하지만, 결장직장암에서 종양 미세환경에 의해 호전되고 변질될 수 있다.

[0110] 결장직장암의 현재 화학요법적 관리는 지난 20년 동안 실질적으로 바뀌지 않았고 주로 증식하는 종양 상피에 대한 조합 세포독성제(예컨대, FOLFOX 및 FOLFIRI 요법 <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs>)의 사용을 기반으로 하며, 이러한 상피 표적화 작용제에 대한 내성이 발생할 수 있다. 결장직장암에 사용할 새로운 요법을 찾는 것이 그 어느 때보다 지금 더 중요하다.

[0111] 따라서, 치료할 암 또는 종양은 결장직장암 또는 결장직장 종양이다. 치료할 특히 바람직한 형태의 결장직장암은 간질 세포에서 GREM1의 과발현, 즉 간질 GREM1 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 결장직장암이다. 간질 세포는 암 관련 섬유모세포일 수 있다. 간질 GREM1 과발현을 가진 결장직장암은 상피 GREM1 과발현을 나타내지 않을 수 있다. 간질 GREM1 과발현을 가진 결장직장암은 간질 Fox11 과발현을 포함할 수 있다. 치료할 특히 적합한 형태의 결장직장암은 CMS4로서도 기재된 중간엽 아형 결장직장암인 결장직장암이다(Guinney et al, Nat Med 2015). 상기 문헌[Guinney et al]에 설명된 바와 같이 임의의 CMS1, CMS2 및 CMS3을 포함하는 임의의 다른 아

형의 결장직장암도 치료될 수 있다. 본원에 설명된 바와 같이 결장직장암은 근위 결장직장암(또는 근위 결장직장 종양)일 수 있다. 근위 결장은 비장 굴곡부의 업스트림에 있는 대장 영역이고, 맹장, 상행 결장 및 횡행 결장을 의미한다. 이 영역 내의 암 또는 종양은 우측 암 또는 종양으로서도 지칭된다. 본 발명은 우측 결장직장암 또는 우측 결장직장 종양의 치료에 관한 것일 수 있다.

[0112] 결장직장암은 원위 결장직장암(또는 원위 결장직장 종양)일 수 있다. 원위 결장은 비장 굴곡부의 다운스트림에 있는 대장 영역이고, 하행 결장, S자형 결장 및 직장을 의미한다. 이 영역 내의 암 또는 종양은 좌측 암 또는 종양으로서도 지칭된다. 본 발명은 좌측 결장직장암 또는 좌측 결장직장 종양의 치료에 관한 것일 수 있다. GREM1의 간질 과발현을 가진 암은 바람직하게는 산발성 암일 수 있다. 산발성 암은 체세포 돌연변이에 의해 유발될 수 있다. 산발성 암은 발암제에 의해 유발될 수 있다. 산발성 암은 유전되는 유전적 돌연변이에 기인하지 않는다. 산발성 암은 GREM1의 간질 과발현을 유발할 수 있다. 산발성 암의 증식은 암에서 GREM1의 간질 과발현에 의해 좌우될 수 있다.

[0113] GREM1에 가까운 적어도 3개의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)은 백인 북유럽인, 및 아마도 다른 인종 군에서 결장직장암(CRC)의 위험과 독립적으로 관련되어 있다(Tomlinson et al, PLoS Genet, 2011). GREM1 발현과 직접적 연관성이 있으며, 다른 SNP가 유사한 효과를 가질 가능성이 있다. 또한, BMP2 근처의 2개의 공통 SNP, BMP4 근처의 2개의 공통 SNP, 및 BMP7 근처의 1개의 공통 SNP는 BMP 리간드의 발현에 영향을 미치고 CRC 위험에 영향을 미친다. 따라서, 암은 상기 SNP들 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명에 따라 치료할 추가 유형의 암 또는 종양은 상피 세포에서 GREM1의 과발현을 나타내는 암 또는 종양이다. 상피 세포에서 GREM1의 과발현은 암을 유발할 수 있다. 암의 증식은 GREM1의 상피 과발현에 의존할 수 있다. 따라서, 암은 상피 기원의 암일 수 있다. 암은 결장직장암 또는 십이지장암일 수 있다. 암은 GREM1에 의해 유발될 수 있다. GREM1에 의해 유발된다는 것은 GREM1의 활성화 또는 발현을 향상시키는 돌연변이 이벤트가 암의 원인임을 의미한다. 이러한 암은 유전되는 유전적 돌연변이에 기인할 수 있다. 따라서, 암은 가족성 암일 수 있다(이하 설명 참조).

[0115] 치료할 바람직한 유형의 결장직장암은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.

[0116] 결장직장암은 파종성 결장직장암일 수 있다. 결장직장암은 전이성 결장직장암일 수 있다. 결장직장암은 폐의 전이성 결장직장암일 수 있다. 결장직장암은 간의 전이성 결장직장암일 수 있다. 결장직장암은 골의 전이성 결장직장암일 수 있다.

[0117] 결장직장암은 *Foxl1*의 간질 과발현을 특징으로 할 수 있다. 결장직장암은 하나 이상의 *Wnt* 리간드의 간질 과발현을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 결장직장암은 *Wnt5A* 및/또는 *Wnt2B*의 간질 과발현을 특징으로 할 수 있다. 결장직장암이 *Foxl1* 및/또는 *Wnt* 리간드, 예를 들어, *Wnt5A* 또는 *Wnt2B*의 간질 과발현을 가진 경우, 상기 결장직장암은 GREM1 길항제를 사용한 예방 또는 치료에 특히 적합할 수 있다.

[0118] 일부 측면에서, 결장직장암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 결장직장암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 결장직장암일 수 있다. 결장직장암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 결장직장암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 결장직장암일 수 있다. 결장직장암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 결장직장암일 수 있다. 일부 경우, 결장직장암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 결장직장암은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0119] 추가 측면에서, 치료할 결장직장암은 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 결장직장암이다. 예를 들어, 결장직장암은 KRAS/BRAF 돌연변이된 결장직장암일 수 있다. KRAS 돌연변이된 결장직장암은 KRAS에서 다음 돌연변이 중 임의의 돌연변이를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다: G12D, G12V, G12C, G12A, G13D, Q61H, Q61L, Q61R, A146T 및/또는 A146V. BRAF 돌연변이된 결장직장암은 BRAF^{V600E} 돌연변이일 수 있다.

[0120] 또 다른 실시양태에서, 결장직장암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제

에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 결장직장암이다. 구체적으로, 결장직장암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 결장직장암일 수 있다. 이러한 결장직장암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 결장직장암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0121] 가족성 암

[0122] 가족성 암은 GREM1 인코딩 유전자의 돌연변이 또는 돌연변이들, 또는 GREM1 유전자의 발현에 영향을 미치는 임의의 다른 돌연변이로부터 비롯된 암을 포함한다. 상염색체 우성 질병인 유전성 혼합 용종증 증후군(HMPS)은 제한된 중간엽 구배로부터 상피 전체에 걸친 이소성 GREM1 유전자 발현으로의 병리학적 구획 발현 전환을 초래하는, GREM1의 업스트림에 있는 40 kb 중복에 의해 유발된다.

[0123] 항-GREM1 길항제로 치료할 대상체는 가족성 암을 발생시킬 위험이 있는 것으로서 이전에 확인되었을 수 있다. 예를 들어, 대상체는 그의 가족력을 기반으로 위험이 있는 것으로서 확인되었을 수 있고/있거나, 대상체가 가족성 암을 유발하거나 발생 위험을 증가시키는 것으로 알려진 유전자의 돌연변이를 보유하기 때문에 위험이 있는 것으로서 확인되었을 수 있다.

[0124] 가족성 암은 유전성 비용종증 결장직장암(HNPCC)으로서도 지칭되는 린치 증후군일 수 있다. 가족성 암은 가족성 선종성 용종증(FAP)일 수 있다.

[0125] 가족성 선종성 용종증(FAP)을 앓고 있는 환자 또는 대상체는 항-GREM1 길항제를 포함하는 조합 요법으로 치료하기에 특히 적합할 수 있다. 항-GREM1 길항제(예를 들어, 항-GREM1 항체)와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법으로 치료하거나 예방할 가족성 암은 FAP일 수 있다. 이전에 FAP를 앓은 대상체는 예를 들어, 재발을 예방하기 위해 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 예방적으로 투여받을 수 있다. 이전에 FAP를 앓은 적은 없지만 FAP를 발생시킬 위험이 있는 것으로 이전에 확인된 대상체는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 예방적으로 투여받을 수 있다. 대상체가 그의 *Apc* 유전자에서 유해한 돌연변이를 보유하는 것으로 밝혀졌기 때문에, 상기 대상체는 FAP를 발생시킬 위험이 있는 것으로 확인되었을 수 있다.

[0126] 일부 측면에서, 가족성 암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 가족성 암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 가족성 암일 수 있다. 가족성 암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 가족성 암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 가족성 암일 수 있다. 가족성 암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 가족성 암은 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주되었을 수 있다. 일부 경우, 가족성 암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 가족성 암은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0127] 추가 측면에서, 치료할 가족성 암은 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 가족성 암이다.

[0128] 또 다른 실시양태에서, 가족성 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 가족성 암이다. 구체적으로, 가족성 암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 가족성 암일 수 있다. 이러한 가족성 암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 가족성 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0129] 다발성 골수종

[0130] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다발성 골수종의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 다발성 골수종(MM)은 골수(BM) 내에서 형질 세포(PC)의 클론 증식을 특징으로 하는 혈액학적 악성 종양이다. BM이 MM에서 종양 성장을 뒷받침한다는 것은 잘 알려져 있으며, 이때 종양 세포와 BM 사이의 양방향 신호전달은 MM PC의 지속된 성장, 확산 및

생존에 중요하다. 세포 및 비-세포 BM 구성요소는 MM PC의 성장 및 확산에 대한 상이한 효과를 발휘한다. 최근 연구는 질환 진행에서 역할을 하는 BM의 구성요소를 식별하였고, 이를 표적화하는 요법이 개발되었지만, MM의 표준 치료는 여전히 주로 종양 세포 자체를 표적화하는 것에 의존한다. BM이 MM 세포의 성장, 확산, 생존 및 약물 내성에서 큰 역할을 하기 때문에, 이러한 요법은 환자 생존을 연장하는 데 효과적이지만, 질환의 이 중요한 측면을 표적화하는 더 효과적인 요법이 필요하다. 실제로, MM은 이 질환을 효과적으로 치료하는 데 있어서 대면하는 핵심적인 문제인 질환 재발로 인해 대체로 치유 불가능한 질환이다.

[0131] 따라서, 본 발명은 또한 다발성 골수종의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 다발성 골수종은 전형적으로 하나 초과 의 형질 세포 덩어리가 골수 내부에 존재하는 것을 포함한다. 따라서, 다발성 골수종은 전형적으로 골수에서 의 형질 세포의 비정상적인 증식과 관련되어 있다. 치료할 특히 바람직한 형태의 다발성 골수종은 골수에서 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 한다. 따라서, 다발성 골수종은 간질 GREM1 과발현을 포함할 수 있다. 간질 GREM1 과발현은 골의 치밀한 골 구축에 존재할 수 있다. 간질 GREM1 과발현은 간질 세포의 증가된 수, 또는 기존 GREM1 발현 간질 세포 내에서의 GREM1의 발현 수준 증가를 반영할 수 있다. 골수는 골연골망상(OCR) 줄기 세포를 포함할 수 있다. GREM1을 과발현하는 간질 세포는 OCR 줄기 세포를 포함할 수 있다. 치료할 바람직한 유형의 다발성 골수종은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.

[0132] 일부 측면에서, 다발성 골수종은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 다발성 골수종, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 다발성 골수종일 수 있다. 다발성 골수종은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 다발성 골수종, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 다발성 골수종일 수 있다. 다발성 골수종은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 다발성 골수종일 수 있다. 일부 경우, 다발성 골수종은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 다발성 골수종은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0133] 추가 측면에서, 치료할 다발성 골수종은 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절 및/또는 Ras (예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 Raf 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이를 가진 다발성 골수종이다.

[0134] 또 다른 실시양태에서, 다발성 골수종은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 다발성 골수종이다. 구체적으로, 다발성 골수종은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 다발성 골수종일 수 있다. 이러한 다발성 골수종은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 다발성 골수종은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0135] 유방암

[0136] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유방암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 유방암은 침습성 유방암, 예컨대, 침습성 소엽성 유방암일 수 있다. 유방암은 삼중 음성 유방암일 수 있다. 유방암은 염증성 유방암일 수 있다. 유방암은 유방의 혈관육종일 수 있다. 유방암은 유관 상피내 암종 또는 소엽 상피내 암종일 수 있다.

[0137] 본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 투여하여 유방암을 치료하고 예방하는 것을 제공한다. 따라서, 유방암은 간질 GREM1 과발현을 포함할 수 있다. GREM1을 과발현하는 간질 유방 세포는 본원에서 암 관련 섬유모세포로서도 기재된 간질 섬유모세포를 포함할 수 있다. 유방암은 재발성 유방암일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 유방암은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 유방암을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 유방암은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다. 유방암은 파종성 유방암일 수 있다. 유방암은 전이성 유방암일 수 있다. 유방암은 폐의 전이성 유방암일 수 있다. 유방암은 간의 전이성 유방암일 수 있다. 유방암은 골의 전이성 유방암일 수 있다.

[0138] 일부 측면에서, 유방암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 유방암, 예를 들어, 본원

에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 유방암일 수 있다. 유방암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 유방암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 유방암일 수 있다. 유방암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 유방암일 수 있다. 일부 경우, 유방암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 유방암은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0139] 또 다른 실시양태에서, 유방암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 유방암이다. 구체적으로, 유방암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 유방암일 수 있다. 이러한 유방암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 유방암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0140] 전립선암

[0141] 추가 측면에서, 본 발명은 전립선암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 전립선암은 전립선 선암종일 수 있다. 전립선암은 전립선으로 퍼진 이행 세포 암종 또는 요로상피암일 수 있다.

[0142] 전립선암은 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 전립선암일 수 있다. 전립선암은 재발성 전립선암일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 전립선암은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 전립선암을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 전립선암은 위에서 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.

[0143] 본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 투여하여 전립선암을 치료하고 예방하는 것을 추가로 제공한다. 전립선암은 과종성 전립선암일 수 있다. 전립선암은 전이성 전립선암일 수 있다. 전립선암은 폐의 전이성 전립선암일 수 있다. 전립선암은 간의 전이성 전립선암일 수 있다. 전립선암은 골의 전이성 전립선암일 수 있다.

[0144] 일부 측면에서, 전립선암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 전립선암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 전립선암일 수 있다. 전립선암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 전립선암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 전립선암일 수 있다. 전립선암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 전립선암일 수 있다. 일부 경우, 전립선암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 전립선암은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0145] 또 다른 실시양태에서, 전립선암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 전립선암이다. 구체적으로, 전립선암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 전립선암일 수 있다. 이러한 전립선암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 전립선암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0146] 방광암

[0147] 추가 측면에서, 본 발명은 방광암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 방광암은 이행 세포(요로상피) 방광암일 수 있다. 방광암은 방광의 상피 내벽으로부터 발생할 수 있다. 방광암은 비-근육 침습성 방광암일 수 있다. 방광암은 편평 세포 방광암일 수 있다. 방광암은 선암종일 수 있다. 방광암은 방광 내벽으로부터 점막고유층 내로 성

장한 고등급 T1 종양일 수 있다. 방광암은 표재성 암 또는 침습성 방광암일 수 있다. 방광암은 재발성 방광암일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 재발성 방광암은 수술적 치료와 같은 치료 후에 재발한 방광암을 지칭한다.

[0148] 본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 투여하여 방광암을 치료하고 예방하는 것을 추가로 제공한다. 방광암은 파종성 방광암일 수 있다. 방광암은 전이성 방광암일 수 있다. 방광암은 폐의 전이성 방광암일 수 있다. 방광암은 간의 전이성 방광암일 수 있다. 방광암은 골의 전이성 방광암일 수 있다. 방광암은 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 방광암일 수 있다. 방광암은 재발성 방광암일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 방광암은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 방광암을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 방광암은 뒤에 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.

[0149] 일부 측면에서, 방광암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 방광암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 방광암일 수 있다. 방광암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 방광암, 예를 들어, MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 방광암일 수 있다. 방광암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 방광암일 수 있다. 일부 경우, 방광암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 방광암은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0150] 또 다른 실시양태에서, 방광암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 방광암이다. 구체적으로, 방광암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 방광암일 수 있다. 이러한 방광암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 방광암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0151] 난소암

[0152] 추가 측면에서, 본 발명은 난소암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 난소암은 상피 난소암, 생식 세포 난소암 또는 성삭 간질 난소암일 수 있다. 난소암은 원발성 복막암일 수 있다. 난소암은 나팔관암일 수 있다. 난소암은 경계성 난소 종양을 특징으로 할 수 있다. 난소암은 생식 세포 난소 종양을 특징으로 할 수 있다. 난소암은 투명 세포 난소암일 수 있다. 암은 장액성 난소암일 수 있다. 난소암은 점액성 난소암일 수 있다. 난소암은 자궁 내막암일 수 있다.

[0153] 난소암은 GREM1의 과발현을 갖는 것을 특징으로 하는 난소암일 수 있다. 난소암은 재발성 난소암일 수도 있다. 다시 말해, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 난소암은 화학요법, 방사선요법 또는 치유적 수술과 같은 선행 치료 후에 수개월 또는 심지어 수년이 지나서 재발한 난소암을 포함한다. 치료할 바람직한 유형의 난소암은 뒤에 더 설명된 바와 같이, 하나 이상의 알려진 항암제(예컨대, 화학요법제)에 대한 내성을 나타낼 수 있다.

[0154] 본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 투여하여 난소암을 치료하고 예방하는 것을 추가로 제공한다. 난소암은 파종성 난소암일 수 있다. 난소암은 전이성 난소암일 수 있다. 난소암은 폐의 전이성 난소암일 수 있다. 난소암은 간의 전이성 난소암일 수 있다. 난소암은 골의 전이성 난소암일 수 있다.

[0155] 일부 측면에서, 난소암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응하는 난소암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 난소암일 수 있다. 난소암은 대안적으로 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 난소암, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 불충분하게 반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 난소암일 수 있다. 난소암은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주될 수 있고, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 부적합한 것으로 이전에 간주된 난소암일 수 있다. 일부 경우, 난소암은 처음에는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다. 예를 들

어, 난소암은 처음에는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 또는 ERK 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있으나, MEK 또는 ERK 억제제에 대한 내성을 발생시킬 수 있다.

[0156] 또 다른 실시양태에서, 난소암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/항-GREM1 길항제에의 노출에 대한 반응으로 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 난소암이다. 구체적으로, 난소암은 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달이 유도/상향조절되는 난소암일 수 있다. 이러한 난소암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 난소암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

[0157] 간질 및 상피

[0158] MAPK/ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 GREM1 길항제를 사용하는 본원의 예방 또는 치료에 대해 설명된 암은 간질 및/또는 상피 GREM1 과발현을 포함할 수 있다.

[0159] 본원에서 사용된 용어 "간질 세포(들)" 또는 "간질"은 조직 또는 장기의 구조적 및/또는 결합적 부분을 지칭한다.

[0160] 간질 조직은 주로 결합 조직 세포를 함유하는 세포의 매트릭스로 만들어진다. 세포의 매트릭스는 주로 기저 물질 - 주로 프로테오글리칸 응집체로부터 만들어진 다공성 수화된 겔 - 및 결합 조직 섬유로 구성된다. 간질 내에서 일반적으로 발견되는 3가지 유형의 섬유, 즉 콜라겐 I형 섬유, 탄성 섬유 및 망상(콜라겐 III형) 섬유가 있다. 섬유모세포와 주변세포는 가장 흔한 유형의 간질 세포에 속한다.

[0161] (예를 들어, 조직 또는 장기의 상피에서 시작되는) 암 또는 종양과 관련하여, 조직 또는 장기의 간질은 암 성장과 진행을 도울 수 있다. 암 또는 종양과 관련된 간질은 암 또는 종양 주변의 섬유 또는 결합 조직의 성장에 의해 유발된 섬유조직형성 간질일 수 있다.

[0162] GREM1의 과발현은 간질/임의의 간질 세포의 임의의 부분에서 관찰될 수 있다. 간질 세포는 섬유모세포 또는 섬유모세포 유사 지지 세포일 수 있다. 간질 세포는 앞에서 설명된 임의의 암 또는 종양의 섬유조직형성 간질, 예컨대, 췌장, 결장직장암의 경우 결장 또는 직장, 또는 다발성 골수종의 경우 골수로부터 단리된 섬유모세포 또는 섬유모세포 유사 지지 세포일 수 있다. 간질 세포는 암 관련 섬유모세포일 수 있다.

[0163] 본원에서 사용된 용어 "상피"는 조직 또는 장기의 외벽 또는 내벽으로부터 유래한 세포를 지칭한다. 결장과 관련하여, 장 상피는 위장관의 소장과 대장 둘 다의 내강 표면 또는 내벽을 형성하는 세포 층이다. 이것은 단순한 원주형 상피로 구성된다. "상부 장벽"은 4가지 장 상피 세포 유형, 즉 흡수성 장세포, 잔세포, 파네스 세포 및 장내분비 세포로 구성된 원주형 세포의 장 상피 단일 층이다. 소장과 대장에서 상부 장벽 특징은 유사하다. 주요 차이는 흡수 표면이 증가할 수 있게 하는, 십이지장, 공장 및 회장에서 용기와 돌출부(원형 주름, 융모 및 미세융모)의 존재로 구성된다. 이것은 평평한 표면을 보여주는 결장에서 관찰되지 않는다. 융모로 불리는 점막 돌출부 중에는 뚜렷한 샘 침입인 리베르킨소와로 불리는 굴곡이 있다. 상피 GREM1 과발현이 관찰되는 세포는 임의의 장 상피 세포와 같은 임의의 상피 세포일 수 있다.

[0164] 이론에 의해 구속받고자 하지는 않지만, 본 발명자들은 상피 및/또는 간질에서의 GREM1의 과발현이 줄기/전구체 세포 표현형(줄기/전구체 세포 수의 증가)을 촉진하여, 상피 줄기 세포 거동을 촉진하고 암 진행 및/또는 화학요법에 대한 내성을 유도할 수 있다고 추정한다. 따라서, 본 발명에 따라 사용되는 GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법은 암이 예방되거나 치료될 대상체의 조직 또는 장기의 상피에서 비정상적인 암 줄기/전구체 세포 표현형의 유도를 예방할 수 있고/있거나, 상피 줄기 세포 거동을 감소시킬 수 있고/있거나 줄기/전구체 세포의 수를 감소시킬 수 있다. GREM1 길항제가 줄기 세포 거동에 영향을 미치는 능력은 알려진 상피 및 암 줄기 세포 마커의 평가에 의해 임상적으로 어세이될 수 있다.

[0165] 간질 및/또는 상피에서의 GREM1의 과발현은 임의의 수단에 의해 확인될 수 있다. GREM1의 과발현은 전형적으로 동일한 조직 유형의 정상 세포에서 마커의 수준, 즉 기저 발현 수준과의 비교에 의해 확인된다. 발현은 전형적으로 바람직하게는 하나 이상의 하우스키퍼 유전자를 포함하는 다른 유전자의 발현 수준에 대해 정규화된다. GREM1은 암 환자 집단의 임계값 백분율로 과발현 또는 과소발현을 보이는 것으로서 분류될 수도 있다. 상기 집단 내의 환자 각각의 과발현은 기하 평균으로부터 2보다 더 높을 수 있다. 상기 집단 내의 환자의 적어도 10%, 더 바람직하게는 적어도 15% 이상은 이러한 과발현을 나타낼 수 있다.

[0166] GREM1 간질 과발현은 간질 GREM1 수준이 매칭된 정상 조직의 GREM1 수준보다 더 높은 것을 의미한다. 예를

들어, 간질 GREM1 수준은 매칭된 정상 조직 GREM1 수준보다 적어도 2배 더 높을 수 있다.

- [0167] GREM1이 과발현되는 경우, 그의 양은 기준에 비해 임의의 양만큼 증가될 수 있다. 예를 들어, GREM1에 의해 유발된 암, 예컨대, HMPs는 상피 GREM1의 수천 배 상향조절을 포함할 수 있는 반면, 정상 상피에서는 GREM1 발현이 관찰되지 않는다. 간질 GREM 과발현을 포함하는 산발성 암은 장기의 정상 간질에서의 생리학적 GREM1 발현 수준을 넘는 임의의 간질 과발현 수준을 포함할 수 있다. 숙련된 자는 동일한 유형의 정상 세포에서의 GREM1 수준과 비교하여 간질 또는 상피에서의 과발현의 존재를 평가할 수 있다.
- [0168] 측정된 양은 mRNA의 양일 수 있다. 따라서, 암은 GREM1 mRNA의 과발현을 포함할 수 있다. 암은 동일한 조직 유형의 정상 세포에 비해 증가된 양의 GREM1 mRNA를 포함할 수 있다. mRNA는 임의의 양만큼 증가될 수 있다. mRNA의 양은 정량적 역전사 증합효소 연쇄 반응(qRT-PCR), 예컨대, 실시간 qRT-PCR, 콰티진(quantigene) 어레이(Affymetrix/Thermo Fisher)의 이용, 노던 블롯팅, 또는 마이크로어레이, RNA 시퀀싱의 이용을 통해 측정될 수 있다. mRNA 발현은 바람직하게는 샘플의 유전자 발현을, 해당 유전자에 대해 이배체인 종양으로 구성된 기준 샘플 전체에서의 특정 유전자의 발현 수준 분포와 비교함으로써 측정된다. z-점수는 예상 최대화에 의한 RNAseq(RSEM) 알고리즘(cBioportal for Cancer Genomics, www.cbioportal.org; Gao et al, 2013 and Serami et al 2012)을 사용함으로써 도출될 수 있다. 기준 세트의 평균보다 2 SD 더 높거나 더 낮은 z-점수는 바람직하게는 각각 과발현 또는 과소발현으로서 간주된다.
- [0169] 측정된 양은 단백질의 양일 수 있다. 암은 예컨대, 동일한 조직 유형의 정상 세포와 비교된 GREM1 단백질의 과발현을 포함할 수 있다. 단백질은 임의의 양만큼 증가될 수 있다. 단백질의 양은 본 발명의 항-GREM1 항체의 사용을 포함하는, 면역조직화학, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광측정 또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)의 이용을 통해 측정될 수 있다. 발현을 측정하기 위한 임계값은 이용된 기술에 따라 달라질 수 있으며, 면역조직화학 점수에 대해 검증될 수 있다.
- [0170] 따라서, 본원에 기재된 바와 같이 환자의 암을 치료하거나 예방하기 위해 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 GREM1 길항제를 사용하는 것은 (a) 암에서 GREM1의 양을 측정하고, (b) 암이 GREM1의 과발현을 포함하는 경우, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 GREM1 길항제를 상기 환자에게 투여하여 암을 치료하거나 예방하는 단계를 포함할 수 있다. GREM1의 양은 mRNA 또는 단백질 양일 수 있으며, 과발현은 앞에서 논의된 임의의 과발현일 수 있다.
- [0171] 상기 측정을 환자로부터 얻은 임의의 적합한 샘플에서 수행할 수 있다. 상기 측정을 환자로부터 얻은 암 또는 종양 생검에서 수행할 수 있다. 간질 및/또는 상피(간질 및/또는 상피 세포)는 생검으로부터 분리될 수 있다. 생검 조직은 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된(FFPE) 조직 또는 신선한 조직일 수 있다. 조직은 췌장 조직, 방광 조직, 폐 조직, 자궁내막 조직, 유방 조직, 위 조직, 십이지장 조직, 식도 조직, 골수 또는 결장직장 조직일 수 있다. 앞에서 논의된 방법들 중 임의의 방법을 암 생검에 대해 수행할 수 있다. 이러한 방법을 환자의 혈액에서 순환하는 암 세포에 대해 수행할 수도 있다. RNA 방법을 소변 또는 혈액 엑소솜에 대해 수행할 수 있다.
- [0172] Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로 이상조절과 관련된 암
- [0173] 앞에서 언급된 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명에 따른 항-GREM1 길항제(Ab7326)에 노출된 후에 KPC 마우스 모델에서 KRAS 신호전달이 상향조절된다는 것을 입증하였다. 더욱이, Ras-Raf-MEK-ERK 경로에 관여하는 유전자, 예컨대, *Mapk1*, *Nras* 및 *Myc*는 KPC 마우스 모델에서 Ab7326에 노출될 때 상향조절된다. 따라서, 그랜틴-1과 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 둘 다를 표적화하는 조합 요법이 유리할 것이다.
- [0174] 본 발명은 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절과 관련된 암, 및/또는 Ras 또는 Raf 유전자의 돌연변이를 함유하는 암을 치료하거나 예방하기 위해 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 항-GREM1 길항제를 사용하는 것을 포괄한다. 예를 들어, Ras 유전자는 *KRAS*, *NRAS* 및/또는 *HRAS*일 수 있다. 예를 들어, Raf 유전자는 *ARAF*, *BRAF* 및/또는 *CRAF*일 수 있다. MAPK/ERK 경로 이상조절과 관련된 암, 및/또는 Ras 또는 Raf 유전자의 돌연변이를 함유하는 암은 예를 들어, 결장직장암, 다발성 골수종, 췌장암, 방광암, 유방암, 폐암, 위암, 난소암, 십이지장암, 식도암, 두경부암, 전립선암, 신경교종, 자궁내막암, 간암, 비장암, 골 상주 암 및 골육종을 포함할 수 있다.
- [0175] 본 발명은 항-GREM1 길항제에 사전노출시키거나 이 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 암의 치료 또는 예방을 위해 본원에 정의된 항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법도 포괄한다. 구체적으로, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달이 유도/상향조절되는 암일 수 있다. 이러한 암은 항-GREM1 길항제 치료의 부재 하에서

Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내지 않을 수 있다. 다시 말해, 암은 본원에 설명된 바와 같이 항-GREM1 길항제로 치료하기 전에 기준 샘플 또는 기준 값에 비해 정상적인 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 나타낼 수 있다.

- [0176] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 췌장암의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명은 항-GREM1 길항제에 사전노출시키거나 이 길항제로 치료한 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로가 이상조절되는 췌장암의 치료 또는 예방을 위해 본원에 정의된 항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법을 포괄한다. 췌장암은 대안적으로 또는 추가로 고전적 MAPK 경로의 항시적 활성화를 특징으로 할 수 있다. 많은 경우, 췌장암은 RAS를 인코딩하는 *KRAS*의 기능 획득 돌연변이를 수반한다. 전형적인 기능 획득 돌연변이는 G12D 또는 G12R 치환을 포함하며 췌장관 선암종에서 관찰된다. 다른 경우, 췌장암은 B-RAF를 인코딩하는 *BRAF*의 기능 획득 돌연변이를 수반한다. RAF의 항시적 키나제 활성을 초래하는 전형적인 기능 획득 돌연변이는 위치 V600E에서 확인된다.
- [0177] 앞에서 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 KRAS/BRAF 돌연변이된 결장직장암의 치료 또는 예방에 관한 것일 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 BRAF 돌연변이된 흑색종, 예컨대, BRAF에서 V600E 돌연변이를 보유하는 흑색종에 관한 것이다.
- [0178] GREM1
- [0179] 단백질과 관련하여 본 발명에 사용된 용어 GREM1 또는 그렘린-1은 전형적으로 UniProt 항목 060565(서열번호 1)로 제시된 아미노산 서열을 가진 단백질, 즉 인간 GREM1을 지칭한다. 용어 GREM1 및 그렘린-1은
- [0180] (a) N-말단 신호 펩티드를 갖거나 갖지 않은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 즉 서열번호 21로 제시된 성숙 펩티드 서열을 포함할 수 있거나 이로 구성될 수 있거나;
- [0181] (b) (서열번호 21로 제시된 바와 같이) N-말단 신호 펩티드를 갖거나 갖지 않은 서열번호 1의 아미노산 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 변형, 결실 또는 삽입을 갖지만, 서열번호 20의 아미노산 서열과 같은 그렘린-1의 활성을 유지하는 유도체이거나;
- [0182] (c) 전형적으로 서열번호 1(또는 서열번호 20 또는 21)과 적어도 약 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 동일성(또는 심지어 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 유지하는 이의 변이체인
- [0183] 그렘린-1 폴리펩티드를 지칭할 수도 있다. 다시 말해, 이러한 변이체는 서열번호 1과 약 60% 내지 약 99% 동일성, 적절하게는 서열번호 1과 약 80% 내지 약 99% 동일성, 더 적절하게는 서열번호 1과 약 90% 내지 약 99% 동일성, 가장 적절하게는 서열번호 1과 약 95% 내지 약 99% 동일성을 유지할 수 있다. 변이체는 뒤에서 더 설명되어 있다.
- [0184] 뒤에서 더 논의된 바와 같이, 잔기 번호는 전형적으로 서열번호 1의 서열을 기준으로 인용된다. 그러나, 잔기 넘버링은 앞에서 논의된 바와 같이 숙련된 자에 의해 유도체 또는 변이체 서열로 쉽게 외삽될 수 있다. 잔기 번호가 인용되는 경우, 본 발명은 변이체 또는 유도체 서열 상의 이러한 잔기도 포괄한다.
- [0185] GREM1 또는 그렘린-1 핵산 서열은 서열번호 36 또는 서열번호 37의 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있거나 이로 구성될 수 있다. 변이체 핵산 서열은 뒤에서 더 설명되어 있다. GREM1 또는 그렘린-1 핵산 서열은 임의의 GREM1 전사체 변이체를 포함할 수 있거나 이로 구성될 수 있다. GREM1 전사체 변이체의 예는 전사체 1(NCBI: NM_013372.6; ENSEMBL: ENST00000560677.5); 전사체 2(NCBI: NM_001191323.1; ENSEMBL: ENST00000560830.1); 전사체 3(NCBI: NM_001191322.1; ENSEMBL: ENST00000622074.1)이다. 2018년 6월 18일 현재 상기 수탁번호로 입수 가능한 서열은 본원에 참고로 포함된다.
- [0186] 길항제
- [0187] 항-GREM1 길항제는 GREM1의 기능 또는 활성을 감소시키는 임의의 분자이다. 항-GREM1 길항제는 GREM1의 기능 또는 활성을 임의의 양만큼 감소시킬 수 있다. 항-GREM1 길항제는 GREM1 기능 또는 활성을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 감소시킬 수 있거나, 임의의 GREM1 기능 또는 활성을 방해할 수 있다. 항-GREM1 길항제가 GREM1 기능 또는 활성을 감소시키는 정도는 항-GREM1 길항제의 존재 및 부재 하에서 세포의 GREM1 기능 또는 활성을 측정함으로써 확인될 수 있다. 세포는 정상 세포 또는 암 세포일 수 있다. 세포는 앞에서 설명된 암 세포일 수 있다. 상기 세포는 췌장암 세포일 수 있다. 췌장암 세포는 실시예에서 기재된 바와 같이 KPC 마우스 모델에 존재할 수 있다. 따라서, 췌장암에서 조합 요법에서의 GREM1 길항제의 활성에 대한 생체내 어세이를 마우스 모델에서 수행할 수 있

다. 이어서, 보다 일반적으로, 임의의 수단으로 GREM1의 기능 또는 활성을 감소시키는 것으로 확인된 GREM1 길항제를, 췌장암 세포와 같은 암 세포의 증식을 예방하거나 감소시키거나, 암 또는 종양을 예방하거나, 감소시키거나 제거하는 그의 능력에 대해 시험관내 또는 생체내에서 어세이할 수 있다.

[0188] 상기 길항제는 임의의 수단으로 GREM1 기능을 감소시킬 수 있다. 상기 길항제는 GREM1 기능에 직접적 또는 간접적으로 영향을 미치는 임의의 분자의 활성 또는 양을 증가시킬 수 있거나 감소시킬 수 있다. 상기 길항제는 mRNA 또는 단백질 수준에서 GREM1의 양을 감소시킬 수 있다. 상기 길항제는 GREM1의 분해를 증가시킬 수 있다. 상기 길항제는 억제 변형을 통해 GREM1의 기능을 감소시킬 수 있다. 상기 길항제는 GREM1 기능을 향상시키는 분자의 전사를 감소시킬 수 있다. 상기 길항제는 징크 핑거 뉴클레아제와 같은 작용제를 사용하여 GREM1을 인코딩하는 DNA 또는 GREM1 기능을 향상시키는 분자를 파괴할 수 있다.

[0189] 상기 길항제는 그렐린-1과 상호작용하는 작용제일 수 있다. 그렐린-1과 상호작용하는 작용제는 전형적으로 그렐린-1에 결합하는 작용제이다. 그렐린-1과 상호작용하는 작용제는 그렐린-1을 조절할 수 있다. 억제 조절제는 그렐린-1의 임의의 기능에 영향을 미칠 수 있으나, 전형적으로 그렐린-1과 BMP(BMP 2/4/7)의 결합을 감소시킨다. 길항제는 BMP-7 모방체 분자일 수 있다. 그렐린-1은 BMP의 음성 조절제이므로, 감소된 결합은 BMP를 통한 신호 전달을 증가시킨다. 활성화 조절제는 그렐린-1과 BMP의 결합을 증가시킬 수 있다.

[0190] BMP 결합 및 신호전달은 당분야에 알려진 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0191] 길항제는 GREM1의 활성 부위에 결합하여 작용할 수 있거나 상이한 부위에 결합하여 알로스테릭적으로 작용할 수 있다. 길항제는 GREM1에 대한 조절제 또는 리간드에 결합하여 작용함으로써, GREM1의 활성화를 감소시킬 수 있다. 길항제는 가역적일 수 있거나 비가역적일 수 있다.

[0192] GREM1 길항제는 소분자 억제제, 펩티드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스 RNA, 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)일 수 있다.

[0193] GREM1의 길항제는 GREM1을 인코딩하는 mRNA 또는 GREM1 활성을 향상시키는 분자를 인코딩하는 mRNA에 특이적으로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. GREM1의 길항제는 GREM1 기능을 감소시키는 임의의 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0194] GREM1의 길항제는 GREM1 기능을 직접적 또는 간접적으로 감소시키기 위해 임의의 표적 분자(전형적으로 단백질)에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 길항제는 GREM1에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 이 측면에서, 상기 항체는 알로스테릭 불활성화를 통해, 또는 그의 표적과 활성에 필요한 리간드 사이의 상호작용의 차단을 통해 GREM1 기능을 감소시킬 수 있다.

[0195] 길항제 작용제와 단백질 잔기의 상호작용은 당분야에 알려진 임의의 적절한 방법, 예컨대, x-선 결정학에 의해 확인된, 잔기와 작용제 사이의 거리(전형적으로 6 Å 미만 또는 4 Å 미만)에 의해 확인될 수 있다. 치료제에 의해 표적화될 수 있는 그렐린-1 영역은 아미노산 Asp92-Leu99, Arg116-His130, Ser137-Ser142, Cys176-Cys178을 포함할 수 있다. 이들은 그렐린-1의 표면에서 돌출되어 아미노산의 6 Å 이내에 있다.

[0196] 항체 길항제

[0197] 본원에서 언급된 용어 "항체"는 전체 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원 결합 부분") 또는 단일쇄를 포함한다. 항체는 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질 또는 이의 항원 결합 부분을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V_H 로서 약칭됨)과 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V_L 로서 약칭됨)과 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄와 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 더 보존된 영역에 의해 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 초가변 영역으로 더 세분화될 수 있다.

[0198] 항체의 불변 영역은 면역글로불린과, 면역 시스템의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 첫 번째 구성요소(C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자의 결합을 매개할 수 있다.

[0199] 본 발명에 따라 사용되는 항체는 단일클론 항체 또는 다중클론 항체일 수 있으며, 전형적으로 단일클론 항체일 것이다. 본 발명에 따라 사용되는 항체는 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 나노바디, 인간 또는 인간화 항체 또는 이들의 임의의 항원 결합 부분일 수 있다. 단일클론 항체 및 다중클론 항체 둘 다를 생성하기 위해, 실험 동

물은 전형적으로 비인간 포유류, 예컨대, 염소, 토끼, 래트 또는 마우스이지만, 항체는 다른 종에서도 생성될 수 있다.

- [0200] 다중클론 항체는 관용적인 방법, 예컨대, 관심 있는 항원을 사용한 적합한 동물의 예방접종에 의해 생성될 수 있다. 그 후, 동물로부터 혈액을 제거하고 IgG 분획을 정제할 수 있다.
- [0201] 그램린-1에 대한 항체는, 동물의 예방접종이 필요한 경우, 잘 알려진 관용적인 프로토콜을 이용하여 폴리펩티드를 동물, 예를 들어, 비인간 동물에게 투여함으로써 획득될 수 있다(예를 들어, 문헌[Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986] 참조). 토끼, 마우스, 래트, 양, 소, 낙타 또는 돼지와 같은 많은 온혈 동물을 예방접종할 수 있다. 그러나, 마우스, 토끼, 돼지 및 래트가 일반적으로 가장 적합하다.
- [0202] 단일클론 항체는 당분야에 알려진 임의의 방법, 예컨대, 하이브리도마 기법(Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), 트리오마 기법, 인간 B 세포 하이브리도마 기법(Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72) 및 EBV-하이브리도마 기법(Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985)에 의해 제조될 수 있다.
- [0203] 본 발명에 따라 사용되는 항체는 예를 들어, 문헌[Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-7848]; 국제 특허 출원 공개 제WO92/02551호; 국제 특허 출원 공개 제WO2004/051268호; 및 국제 특허 출원 공개 제WO2004/106377호에 기재된 방법으로 특정 항체의 생성을 위해 선별된 단일 림프구로부터 생성된 면역글로불린 가변 영역 cDNA를 클로닝하고 발현시킴으로써 단일 림프구 항체 방법의 이용을 통해 생성될 수도 있다.
- [0204] 상기 항체는 당분야에 알려진 다양한 파지 디스플레이 방법의 이용을 통해 생성될 수도 있고 문헌[Brinkman *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50)], 문헌[Ames *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186)], 문헌[Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958)], 문헌[Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18)], 문헌[Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280)]; 국제 특허 출원 공개 제WO 90/02809호, 제WO 91/10737호, 제WO 92/01047호, 제WO 92/18619호, 제WO 93/11236호, 제WO 95/15982호 및 제WO 95/20401호; 및 미국 특허 제5,698,426호, 제5,223,409호, 제5,403,484호, 제5,580,717호, 제5,427,908호, 제5,750,753호, 제5,821,047호, 제5,571,698호, 제5,427,908호, 제5,516,637호, 제5,780,225호, 제5,658,727호, 제5,733,743호 및 제5,969,108호에 개시된 방법을 포함한다.
- [0205] 완전 인간 항체는 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 영역 및 불변 영역(존재하는 경우)이 모두 인간으로부터 유래하거나 인간 유래 서열과 실질적으로 동일하지만 반드시 동일한 항체로부터 유래하지는 않은 항체이다. 완전 인간 항체의 예는 예를 들어, 앞에서 설명된 파지 디스플레이 방법에 의해 생성된 항체, 및 예를 들어, 유럽 특허 제 0546073호, 미국 특허 제5,545,806호, 미국 특허 제5,569,825호, 미국 특허 제5,625,126호, 미국 특허 제 5,633,425호, 미국 특허 제5,661,016호, 미국 특허 제5,770,429호, 유럽 특허 제0438474호 및 유럽 특허 제 0463151호에 일반 용어로 설명된 바와 같이 뮤린 면역글로불린 가변 영역 유전자 및 임의로 불변 영역 유전자가 이들의 인간 대응물로 대체되어 있는 마우스에 의해 생성된 항체를 포함할 수 있다.
- [0206] 대안적으로, 본 발명에 따라 사용되는 항체는 비인간 포유류를 그램린-1 면역원으로 예방접종하는 단계; 상기 포유류로부터 항체 제제를 획득하는 단계; 이로부터 그램린-1을 인식하는 단일클론 항체를 유도하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0207] 본 발명에 따라 사용되는 항체 분자는 전체 길이 중쇄 및 경쇄를 가진 완전한 항체 분자 또는 이의 단편 또는 항원 결합 부분을 포함할 수 있다. 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어는 항원에 선별적으로 결합하는 능력을 유지하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능은 전체 길이 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 항체 및 이의 단편과 항원 결합 부분은 Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')₂, Fv, 단일 도메인 항체(예를 들어, VH 또는 VL 또는 VHH), scFv, 2가, 3가 또는 4가 항체, Bis-scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 이들의 임의의 에피토프 결합 단편일 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다(예를 들어, 문헌[Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217] 참조). 이러한 항체 단편을 생성하고 제조하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181] 참조). 본 발명에 사용할 다른 항체 단편은 국제 특허 출원 공개WO 2005/003169호, 제WO 2005/003170호 및 제WO 2005/003171호에 기재된 Fab 및 Fab' 단편, 및 국제 특허 출원 공개 제WO2009/040562호에 기재된 Fab-dAb 단편

을 포함한다. 다가 항체는 다중 특이성을 포함할 수 있거나 단일특이적일 수 있다(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 92/22853호 및 제WO 05/113605호 참조). 이러한 항체 단편은 당분야에서 숙련된 자에게 알려진 통상적인 기법을 이용함으로써 수득될 수 있으며, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0208] 존재하는 경우, 항체 분자의 제안된 기능, 특히 필요할 수 있는 이펙터 기능을 참작하여 항체 분자의 불변 영역 도메인을 선택할 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인은 인간 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 도메인일 수 있다. 특히, 항체 분자가 치료적 용도로 의도되고 항체 이펙터 기능이 필요할 때, 특히 IgG1 및 IgG3 동형의 인간 IgG 불변 영역 도메인이 사용될 수 있다. 대안적으로, 항체 분자가 치료적 목적으로 의도되고 항체 이펙터 기능이 필요하지 않을 때 IgG2 및 IgG4 동형이 사용될 수 있다.

[0209] 본 발명에 따라 사용되는 항체는 (a) 관심 있는 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환 또는 트랜스염색체성 동물(예를 들어, 마우스) 또는 이로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체, (b) 관심 있는 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어, 형질감염종으로부터 단리된 항체, (c) 재조합 조합적 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 단계를 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 단리된 항체와 같이 재조합 수단에 의해 제조될 수 있거나, 발현될 수 있거나, 생성될 수 있거나 단리될 수 있다.

[0210] 본 발명에 따라 사용되는 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 영역을 가진 항체를 포함하기 위한 것이다. 더욱이, 항체가 불변 영역을 함유하는 경우, 불변 영역도 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 본원에 기재된 인간 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유류 종의 생식세포계열로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식되어 있는 항체를 포함하기 위한 것이 아니다.

[0211] 이러한 인간 항체는 인간 단일클론 항체일 수 있다. 이러한 인간 단일클론 항체는 불멸화된 세포에 융합된, 인간 중쇄 형질전환유전자 및 경쇄 형질전환유전자를 포함하는 계능을 가진 형질전환 비인간 동물, 예를 들어, 형질전환 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0212] 인간 항체는 인간 림프구를 시험관내 예방접종한 후 엡스타인-바 바이러스를 사용하여 림프구를 형질전환시킴으로써 제조될 수 있다.

[0213] 용어 "인간 항체 유도체"는 임의의 변형된 형태의 인간 항체, 예를 들어, 항체와 또 다른 작용제 또는 항체의 접합체를 지칭한다.

[0214] 용어 "인간화 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유류 종의 생식세포계열로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식되어 있는 CDR-이식된 항체 분자를 지칭하기 위한 것이다. 추가 프레임워크 영역 변형은 인간 프레임워크 서열 내에서 만들어질 수 있다.

[0215] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CDR-이식된 항체 분자"는 중쇄 및/또는 경쇄가 수용자 항체(예를 들어, 인간 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 프레임워크에 이식된 공여자 항체(예를 들어, 뮤린 또는 래트 단일클론 항체)의 하나 이상의 CDR(원하는 경우, 하나 이상의 변형된 CDR 포함)을 함유하는 항체 분자를 지칭한다. 검토를 위해 문헌[Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998]을 참조한다. 한 실시양태에서, 전체 CDR이 전달되기 보다는, 앞에서 설명된 CDR들 중 어느 하나로부터의 특이성 결정 잔기들 중 하나 이상만이 인간 항체 프레임워크로 전달된다(예를 들어, 문헌[Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34] 참조). 한 실시양태에서, 앞에서 설명된 CDR들 중 하나 이상으로부터의 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 전달된다. 또 다른 실시양태에서, 앞에서 설명된 CDR들 각각으로부터의 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 전달된다.

[0216] CDR 또는 특이성 결정 잔기가 이식될 때, CDR이 유래한 공여자 항체의 부류/유형을 고려하여 마우스, 영장류 및 인간 프레임워크 영역을 포함하는 임의의 적절한 수용자 가변 영역 프레임워크 서열을 사용할 수 있다. 적절한 계는, 본 발명에 따른 CDR-이식된 항체는 앞에서 설명된 CDR 또는 특이성 결정 잔기 중 하나 이상뿐만 아니라 인간 수용자 프레임워크 영역도 포함하는 가변 도메인을 가진다. 따라서, 한 실시양태에서, 가변 도메인이 인간 수용자 프레임워크 영역과 비인간 공여자 CDR을 포함하는 중화 CDR-이식된 항체를 제공한다.

- [0217] 본 발명에 사용될 수 있는 인간 프레임워크의 예는 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY 및 POM이다(상기 문헌 [Kabat *et al.*]). 예를 들어, KOL 및 NEWM은 중쇄에 사용될 수 있고, REI는 경쇄에 사용될 수 있으며, EU, LAY 및 POM은 중쇄와 경쇄 둘 다에 사용될 수 있다. 대안적으로, 인간 생식세포계열 서열이 사용될 수 있고; 이들은 예를 들어, <http://www.vbase2.org/>에서 입수될 수 있다(문헌[Retter *et al.*, Nucl. Acids Res. (2005) 33 (supplement 1), D671-D674] 참조).
- [0218] 본원에 기재된 CDR-이식된 항체에서, 수용자 중쇄 및 경쇄는 반드시 동일한 항체로부터 유래할 필요는 없으며, 원하는 경우, 상이한 세포로부터 유래한 프레임워크 영역을 가진 복합체를 포함할 수 있다.
- [0219] 또한, 본원에 기재된 CDR-이식된 항체에서, 프레임워크 영역은 수용자 항체의 프레임워크 영역과 정확히 동일한 서열을 가질 필요는 없다. 예를 들어, 희귀 잔기는 해당 수용자 체 부류 또는 유형에 대해 더 자주 발견되는 잔기로 변경될 수 있다. 대안적으로, 수용자 프레임워크 영역 내의 선별된 잔기는 공여자 항체의 동일한 위치에서 발견되는 잔기에 상응하도록 변경될 수 있다(문헌[Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332, 323-324] 참조). 이러한 변경은 공여자 항체의 친화성을 회복하는 데 필요한 최소한으로 유지되어야 한다. 수용자 프레임워크 영역에서 변경될 필요가 있을 수 있는 잔기를 선별하는 프로토콜은 국제 특허 출원 공개 제WO 91/09967호에 제시되어 있다.
- [0220] 당분야에서 숙련된 자는 항체가 다양한 번역 후 변형을 겪을 수 있다는 것도 이해할 것이다. 이러한 변형의 유형과 정도는 종종 항체를 발현하는 데 사용된 숙주 세포주 및 배양 조건에 의해 좌우된다. 이러한 변형은 글리코실화, 메티오닌 산화, 디케토피페라진 형성, 아스파르테이트 이성질체화 및 아스파라진 탈아미드화의 변경을 포함할 수 있다. 빈번한 변형은 (문헌[Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995]에 기재된 바와 같이) 카르복시펩티다제의 작용으로 인한 카르복시 말단 염기성 잔기(예컨대, 라이신 또는 아르기닌)의 상실이다.
- [0221] 한 실시양태에서, 항체 중쇄는 CH1 도메인을 포함하고 항체 경쇄는 카파 또는 람다 CL 도메인을 포함한다.
- [0222] 항체 또는 단편과 같은 생물학적 분자는 산성 및/또는 염기성 작용기를 함유하므로, 순 양전하 또는 순 음전하를 분자에 제공한다. 전체 "관찰된" 전하의 양은 독립체의 절대 아미노산 서열, 3D 구조에서의 하전된 기의 국소 환경 및 분자의 환경 조건에 의해 좌우될 것이다. 등전점(pI)은 특정 분자 또는 표면이 순 전기 전하를 갖지 않는 pH이다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체 또는 단편은 적어도 7의 등전점(pI)을 가진다. 한 실시양태에서, 항체 또는 단편은 적어도 8, 예를 들어, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8 또는 9의 등전점을 가진다. 한 실시양태에서, 항체의 pI는 8이다. **ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html(문헌[Walker, The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press(2005), 571-607] 참조)와 같은 프로그램을 사용하여 항체 또는 단편의 등전점을 예측할 수 있다.
- [0223] 바람직한 그래핀-1 에피토프를 특징규명하기 위해, 본 발명자들은 인간 그래핀-1을 단독으로 결정화하였을 뿐만 아니라 Ab 7326(Fab 단편)으로 불리는 항체와 함께 복합체를 형성한 상태로도 결정화하였다. 그래핀-1의 결정화는 BMP 결합 부위의 추정 잔기가 확인될 수 있게 하였다. 게다가, 알로스테릭 억제 항체인 Ab 7326을 사용한 결정화는 항체 에피토프의 잔기가 확인될 수 있게 하였다. 이 에피토프에 결합하는 항체는 그래핀-1과 관련된 질환의 치료에 있어서 치료제로서 특별한 잠재력을 가진다.
- [0224] 본원에 기재된 바람직한 Ab 7326 항체는 그래핀-1의 다음 잔기에 결합하는 것으로 확인되었다: Ile110(131), Lys126(147), Lys127(148), Phe128(149), Thr129(150), Thr130(151), Arg148(169), Lys153(174) 및 Gln154(175), 여기서 Lys126(147), Lys127(148), Phe128(149), Thr129(150), Thr130(151), Arg148(169), Lys153(174) 및 Gln154(175)는 하나의 그래핀-1 단량체에 존재하고 Ile110(131)은 두 번째 그래핀-1 단량체에 존재한다. 괄호 안에 있지 않은 넘버링은 구조적 파일을 기반으로 한다(구조적 정렬을 기반으로 한 마우스 그래핀-2의 넘버링과 매칭됨). 괄호 안의 번호는 서열번호 1의 UniProt 항목 060565를 기반으로 잔기를 나타낸다. 그래핀-1-Ab 7326 Fab 복합체로부터 4 Å에서 NCONT 분석을 이용하여 이러한 에피토프 잔기를 확인하였다.
- [0225] 따라서, 본원에 기재된 항체는 Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175로부터 선택된 적어도 하나의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합할 수 있다(이때 잔기 넘버링은 서열번호 1을 기반으로 함). 본원에 기재된 항체는 이러한 잔기들 중 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 모두 9개의 잔기(바람직하게는 적어도 5개의 잔기)를 포함하는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0226] 본원에 기재된 항체는 Ile131이 다른 잔기와 상이한 그래핀-1 단량체에 존재하는 에피토프를 인식할 수도 있다.

- [0227] 이러한 잔기는 인간 그램린-1의 특정 서열에 대해 제공되지만, 숙련된 자는 관용적인 기법을 이용하여 이러한 잔기의 위치를 다른 상응하는 그램린 서열(예를 들어, 마우스)에 쉽게 외삽할 수 있다. 따라서, 이러한 다른 그램린 서열 내의 상응하는 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체도 본 발명에 의해 제공된다.
- [0228] 특정 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌[Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)]에 설명된 어세이와 같은 관용적인 교차차단 어세이를 수행할 수 있다. 다른 방법은 알려진 스캐닝 돌연변이체, 펩티드 블롯(Reineke (2004) Methods Mol Biol 248:443-63) 또는 펩티드 절단 분석을 포함한다. 또한, 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법을 이용할 수 있다(Tomer (2000) Protein Science 9: 487-496). 이러한 방법은 당분야에 잘 알려져 있다.
- [0229] x-선 결정학 분석으로 항체 에피토프를 확인할 수도 있다. 따라서, 그램린-1에 결합된 항체의 x-선 결정학 분석을 통해 본 개시내용의 항체를 평가할 수 있다. 특히, 항체 파라토프 잔기의 4 Å 이내에 있는 그램린-1의 잔기를 확인함으로써 이 방식으로 에피토프를 확인할 수 있다.
- [0230] 따라서, 본원에 기재된 항체는 Trp93, Phe117, Tyr119, Phe125, Tyr126 및 Phe138로부터 선택된 적어도 하나의 잔기를 포함하는 그램린-1의 에피토프에 결합할 수 있으며, 여기서 잔기 넘버링은 서열번호 1에 따른다. Trp93, Phe117, Tyr119, Phe125, Tyr126 및 Phe138을 모두 포함하는 에피토프에 결합하는 항체도 본원에 기재되어 있다. 잔기 Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체도 기재되어 있다. 바람직하게는, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175는 그램린-1의 한 단량체에 위치하고, Ile131은 그램린-1의 다른 단량체에 위치한다(그램린-1 이량체는 BMP 이량체에 결합한다).
- [0231] 항체는 항체 파라토프가 x-선 결정학에 의해 확인된 그램린-1 잔기의 4 Å 이내에 있는 경우 상기 그램린-1 잔기에 결합할 수 있다.
- [0232] 본원에 개시된 에피토프에 결합하는 항체는 서열번호 4 내지 6(각각 HCDR1/HCDR2/HCDR3)의 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모두 3개의 중쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다. 이들은 카바트 방법을 이용하여 확인하였을 때 실시예의 Ab 7326 항체의 HCDR1/HCDR2/HCDR3 서열이다.
- [0233] CDR 서열을 확인하는 카바트와 초티아 방법(및 기타 기법)은 당분야에 잘 알려져 있다. 본 발명에서 임의의 적절한 방법을 이용하여 CDR 서열을 확인할 수 있고, 전형적으로 카바트가 이용되지만, 다른 기법도 이용될 수 있다. 본 경우에서, 서열번호 3은 조합된 초티아와 카바트 정의를 이용함으로써 확인된 Ab 7326 HCDR1 서열을 제시한다.
- [0234] 본 발명에 따라 사용되는 항체는 서열번호 7 내지 9(각각 LCDR1/LCDR2/LCDR3)의 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모두 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다. 이들은 카바트 방법을 이용할 때 Ab 7326의 LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열이다.
- [0235] 항체는 바람직하게는 적어도 서열번호 6의 HCDR3 서열을 포함한다.
- [0236] 전형적으로, 항체는 서열번호 4 내지 6으로부터 선택된 적어도 하나의 중쇄 CDR 서열, 및 서열번호 7 내지 9로부터 선택된 적어도 하나의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 항체는 서열번호 4 내지 6으로부터 선택된 적어도 2개의 중쇄 CDR 서열, 및 서열번호 7 내지 9로부터 선택된 적어도 2개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다. 항체는 전형적으로 서열번호 4 내지 6(각각 HCDR1/HCDR2/HCDR3)의 모든 3개의 중쇄 CDR 서열 및 서열번호 7 내지 9(각각 LCDR1/LCDR2/LCDR3)의 모든 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 항체는 키메라, 인간 또는 인간화 항체일 수 있다.
- [0237] 항체는 서열번호 10 또는 12의 중쇄 가변 영역(HCVR) 서열(Ab 7326 변이체 1 및 2의 HCVR)을 포함할 수 있다. 항체는 서열번호 11 또는 13의 경쇄 가변 영역(LCVR) 서열(Ab 7326 변이체 1 및 2의 LCVR)을 포함할 수 있다. 항체는 바람직하게는 서열번호 10 또는 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 11 또는 13의 경쇄 가변 영역 서열(특히 서열번호 10/11 또는 12/13의 HCVR/LCVR 쌍)을 포함한다.
- [0238] 항체는 서열번호 14 마우스 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 1, 또는 서열번호 28 마우스 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 2, 또는 서열번호 30 인간 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 1, 또는 서열번호 16 인간 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 2, 또는 서열번호 22 인간 전체 길이 IgG4P 중쇄 변이체 1, 또는 서열번호 34 인간 전체 길이 IgG4P 중쇄 변이체 2, 또는 서열번호 18 Fab 중쇄 변이체 1, 또는 서열번호 32 Fab 중쇄 변이체 2의 중쇄(H-쇄) 서열을 포함할 수 있다.

[0239] 항체는 서열번호 15 마우스 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 29 마우스 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 31 인간 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 17 인간 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 23 인간 전체 길이 IgG4P 경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 35 인간 전체 길이 IgG4P 경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 19 Fab 경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 33 Fab 경쇄 변이체 2의 경쇄(L-쇄) 서열을 포함할 수 있다.

[0240] 한 예에서, 항체는 서열번호 14/15 마우스 전체 길이 IgG1 변이체 1, 또는 서열번호 28/29 마우스 전체 길이 IgG1 변이체 2, 또는 서열번호 30/31 인간 전체 길이 IgG1 변이체 1, 또는 서열번호 16/17 인간 전체 길이 IgG1 변이체 2, 또는 서열번호 22/23 인간 전체 길이 IgG4P 변이체 1, 또는 서열번호 34/35 인간 전체 길이 IgG4P 변이체 2, 서열번호 18/19 Fab 경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 32/33 Fab 경쇄 변이체 2의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다.

[0241] 상응하는 서열의 변이체 형태는 상호교환될 수 있다. 예를 들어, 항체는 서열번호 14/29 마우스 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 1/경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 28/15 마우스 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 2/경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 30/17 인간 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 1/경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 16/31 인간 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 2/경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 22/35 인간 전체 길이 IgG4P 중쇄 변이체 1/경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 34/23 인간 전체 길이 IgG4P 중쇄 변이체 2/경쇄 변이체 1, 또는 서열번호 18/33 Fab 중쇄 변이체 1/경쇄 변이체 2, 또는 서열번호 32/19 Fab 중쇄 변이체 2/경쇄 변이체 1의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함할 수 있다.

[0242] 항체는 키메라, 인간 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0243] 항체는 대안적으로 앞에서 언급된 특정 서열들 중 한 서열의 변이체일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 항체 변이체의 다음 설명은 앞에서 설명된 바와 같은 GREM1 폴리펩티드 변이체의 선별에도 적용될 수 있다.

[0244] 예를 들어, 변이체는 상기 아미노산 서열들 중 임의의 아미노산 서열의 치환, 결실 또는 추가 변이체일 수 있다.

[0245] 변이체 항체는 앞에서 논의된 특정 서열로부터의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 최대 10개, 최대 20개 또는 더 큰 수(전형적으로 최대 50개)의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함할 수 있다. "결실" 변이체는 개별 아미노산의 결실, 작은 아미노산 군, 예컨대, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산의 결실, 또는 더 큰 아미노산 영역의 결실, 예컨대, 특정 아미노산 도메인 또는 기타 특징의 결실을 포함할 수 있다. "치환" 변이체는 전형적으로 하나 이상의 아미노산을 동일한 수의 아미노산으로 대체하는 단계, 및 보존적 아미노산 치환을 만드는 단계를 포함한다. 예를 들어, 아미노산은 유사한 특성을 가진 대체 아미노산, 예를 들어, 또 다른 염기성 아미노산, 또 다른 산성 아미노산, 또 다른 중성 아미노산, 또 다른 하전된 아미노산, 또 다른 친수성 아미노산, 또 다른 소수성 아미노산, 또 다른 극성 아미노산, 또 다른 방향족 아미노산 또는 또 다른 지방족 아미노산으로 치환될 수 있다. 적합한 치환기를 선별하는 데 사용될 수 있는 20가지 주요 아미노산의 일부 특성은 다음과 같다:

Ala	지방족, 소수성, 중성	Met	소수성, 중성
Cys	극성, 소수성, 중성	Asn	극성, 친수성, 중성
Asp	극성, 친수성, 하전(-)	Pro	소수성, 중성
Glu	극성, 친수성, 하전(-)	Gln	극성, 친수성, 중성
Phe	방향족, 소수성, 중성	Arg	극성, 친수성, 하전(+)
Gly	지방족, 중성	Ser	극성, 친수성, 중성
His	방향족, 극성, 친수성, 하전(+)	Thr	극성, 친수성, 중성
Ile	지방족, 소수성, 중성	Val	지방족, 소수성, 중성
Lys	극성, 친수성, 하전(+)	Trp	방향족, 소수성, 중성
Leu	지방족, 소수성, 중성	Tyr	방향족, 극성, 소수성

[0246]

[0247] "유도체" 또는 "변이체"는 일반적으로 서열에서 천연 생성 아미노산 대신에 보이는 아미노산이 그의 구조적 유사체인 것을 포함한다. 항체의 기능이 유의미하게 악영향을 받지 않는 한, 서열에 사용된 아미노산은 유도체화될 수도 있거나 변형될 수도 있다, 예를 들어, 표지부착될 수도 있다.

[0248] 상기 유도체 및 변이체는 항체의 합성 동안 또는 생성 후 변형에 의해 제조될 수 있거나, 항체가 재조합 형태일

때, 알려진 기법인 부위 지정 돌연변이유발, 무작위 돌연변이유발, 또는 핵산의 효소적 절단 및/또는 라이게이션을 이용함으로써 제조될 수 있다.

- [0249] 변이체 항체는 본원에 개시된 아미노산 서열(특히 HCVR/LCVR 서열 및 H-쇄 및 L-쇄 서열)과 약 60% 이상, 또는 약 70% 이상, 예를 들어, 75% 또는 80%, 전형적으로 약 85% 이상, 예를 들어, 약 90% 또는 95% 이상의 아미노산 동일성을 가진 아미노산 서열을 가질 수 있다. 나아가, 항체는 본원에 개시된 HCVR/LCVR 서열 및 H-쇄 및 L-쇄 서열과 약 60% 이상 또는 약 70% 이상, 예를 들어, 75% 또는 80%, 전형적으로 약 85% 이상, 예를 들어, 약 90% 또는 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖지만, 이러한 서열에 대해 개시된 정확한 CDR을 유지하는 변이체일 수 있다. 변이체는 (일부 상황에서는 정확한 CDR을 유지하면서) 본원에 개시된 HCVR/LCVR 서열 및 H-쇄 및 L-쇄 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 유지할 수 있다.
- [0250] 변이체는 전형적으로 약 60% 내지 약 99% 동일성, 약 80% 내지 약 99% 동일성, 약 90% 내지 약 99% 동일성 또는 약 95% 내지 약 99% 동일성을 유지한다. 이 수준의 아미노산 동일성은 관련 서열번호 서열의 전체 길이 또는 서열의 일부에 걸쳐, 예를 들어, 전체 길이 폴리펩티드의 크기에 따라 약 20개, 30개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개 또는 더 큰 수의 아미노산에 걸쳐 관찰될 수 있다.
- [0251] 아미노산 서열과 관련하여, "서열 동일성"은 다음 매개변수와 함께 ClustalW(상기 문헌[Thompson *et al.*, 1994])를 사용하여 평가하였을 때 명시된 값을 가진 서열을 의미한다:
- [0252] 쌍별 정렬 매개변수 - 방법: 정확, 매트릭스: PAM, 갭 개방 페널티: 10.00, 갭 확장 페널티: 0.10;
- [0253] 다중 정렬 매개변수 - 매트릭스: PAM, 갭 개방 페널티: 10.00, 지연에 대한 % 동일성: 30, 말단 갭 페널티화: 커짐, 갭 분리 거리: 0, 음성 매트릭스: 없음, 갭 확장 페널티: 0.20, 잔기 특이적 갭 페널티: 커짐, 친수성 갭 페널티: 커짐, 친수성 잔기: GPSNDQEKR. 특정 잔기에서의 서열 동일성은 단순히 유도체화된 동일한 잔기를 포함하기 위한 것이다.
- [0254] 따라서, 이러한 쇄의 기능 또는 활성을 유지하는 특정 서열과 변이체를 가진 항체를 제공한다.
- [0255] 항체는 H-쇄/L-쇄, HCVR/LCVR 또는 CDR 서열의 관점에서 앞에서 정의된 항체와 그램린-1에의 결합에 대해 경쟁할 수 있거나, 이러한 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 구체적으로, 항체는 서열번호 4/5/6/7/8/9의 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열 조합을 포함하는 항체와 그램린-1에의 결합에 대해 경쟁할 수 있거나, 이러한 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 항체는 서열번호 10/11 또는 12/13의 HCVR 및 LCVR 서열 쌍 또는 서열번호 14/15 또는 16/17의 전체 길이 쇄를 포함하는 항체와 그램린-1에의 결합에 대해 경쟁할 수 있거나, 이러한 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0256] 용어 "에피토프"는 항체에 의해 결합되는 항원의 영역이다. 에피토프는 구조적 또는 기능적 에피토프로서 정의될 수 있다. 기능적 에피토프는 일반적으로 구조적 에피토프의 서브셋이며 상호작용의 친화성에 직접 기여하는 잔기를 가진다. 에피토프는 입체구조적일 수도 있다, 즉, 비선형 아미노산으로 구성될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 분자의 화학적 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 기 또는 설포닐 기인 결정인자를 포함할 수 있고, 특정 실시양태에서 특정 3차원 구조적 특성 및/또는 특정 전하 특성을 가질 수 있다.
- [0257] 당분야에 알려진 관용적인 방법을 이용하여 항체가 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 또는 기준 항체와 결합에 대해 경쟁하는지를 쉽게 확인할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 본 발명의 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지를 확인하기 위해, 기준 항체를 포화 조건 하에서 단백질 또는 펩티드에 결합시킨다. 다음으로, 시험 항체가 단백질 또는 펩티드에 결합하는 능력을 평가한다. 시험 항체가 기준 항체와 포화 결합한 후에 단백질 또는 펩티드에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체는 기준 항체와 상이한 에피토프에 결합한다는 결론을 내릴 수 있다. 다른 한편으로, 시험 항체가 기준 항체와 포화 결합한 후에 단백질 또는 펩티드에 결합할 수 없는 경우, 시험 항체는 본 발명의 기준 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0258] 항체가 기준 항체와 결합에 대해 경쟁하는지를 확인하기 위해, 앞에서 설명된 결합 방법을 양방향으로 수행한다. 첫 번째 방향에서, 기준 항체를 포화 조건 하에서 단백질/펩티드에 결합시킨 다음, 시험 항체와 단백질/펩티드 분자의 결합을 평가한다. 두 번째 방향에서, 시험 항체를 포화 조건 하에서 단백질/펩티드에 결합시킨 다음, 기준 항체와 단백질/펩티드의 결합을 평가한다. 양방향에서 첫 번째(포화) 항체만이 단백질/펩티드에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체와 기준 항체가 단백질/펩티드에 결합하기 위해 경쟁한다는 결론을 내린다. 숙련된 자가 인식할 바와 같이, 기준 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체는 반드시 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하지는 않을 수 있으나, 중첩되거나 인접한 에피토프에 결합함으로써 기준 항체의 결합을 입체적으로 차단

할 수 있다.

- [0259] 두 항체는 각각이 다른 항체와 항원의 결합을 경쟁적으로 억제(차단)하는 경우 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합한다. 즉, 1배, 5배, 10배, 20배 또는 100배 과량의 한 항체는 경쟁적 결합 어세이에서 측정되었을 때 다른 항체의 결합을 적어도 50%, 75%, 90% 또는 심지어 99% 억제한다(예를 들어, 문헌[Junghans et al., Cancer Res, 1990:50:1495-1502] 참조). 대안적으로, 두 항체는 본질적으로 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우 동일한 에피토프를 가진다. 두 항체는 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우 중첩되는 에피토프를 가진다.
- [0260] 그 다음, 추가 관용적인 실험(예를 들어, 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)을 수행하여, 관찰된 시험 항체의 결합 결여가 실제로 기준 항체와 동일한 에피토프에의 결합에 기인하는지, 또는 입체적 차단(또는 또 다른 현상)이 관찰된 결합 결여의 원인인지를 확인할 수 있다. 이러한 종류의 실험은 ELISA, RIA, 표면 플라즈몬 공명, 유세포분석 또는 당분야에서 이용 가능한 임의의 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 어세이를 이용함으로써 수행될 수 있다.
- [0261] 예를 들어, 표준 ELISA 또는 웨스턴 블롯팅을 통해 항체가 그램린-1에 결합하는지를 시험할 수 있다. ELISA 어세이는 표적 단백질과의 양성 반응을 보이는 하이브리도마를 스크리닝하는 데 이용될 수도 있다. 항체의 결합 선별성은 예를 들어, 유세포분석으로 항체와 표적 단백질을 발현하는 세포의 결합을 모니터링함으로써 확인될 수도 있다. 따라서, 스크리닝 방법은 ELISA 또는 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 또는 유세포분석을 통해 그램린-1에 결합할 수 있는 항체를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0262] 항체는 그램린-1을 선별적으로(또는 특이적으로) 인식할 수 있다. 항체 또는 기타 화합물은 그가 선별성을 보이는 단백질에 우선적으로 또는 높은 친화성으로 결합하지만, 다른 단백질에 실질적으로 결합하지 않거나 낮은 친화성으로 결합할 때 단백질에 "선별적으로 결합"하거나 단백질을 "선별적으로 인식"한다. 항체의 선별성은 항체가 앞에서 논의된 바와 같이 다른 관련 단백질에 결합하는지 여부 또는 항체가 이들을 구별하는지 여부를 결정함으로써 더 연구될 수 있다. 본 발명에 따라 사용되는 항체는 전형적으로 인간 그램린-1을 인식한다.
- [0263] 항체는 관련 단백질, 또는 인간 그램린-1 및 다른 종의 그램린-1에 대한 교차반응성도 가질 수 있다.
- [0264] 특이적(또는 선별적)은 항체가 임의의 다른 분자에 대한 유의미한 교차반응성 없이 관심 있는 단백질에 결합한다는 것으로 이해될 것이다. 교차반응성은 본원에 설명된 바와 같이 임의의 적합한 방법에 의해 평가될 수 있다. 항체의 교차반응성은 항체가 관심 있는 단백질에 결합하는 강도의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 100% 강도로 다른 분자에 결합하는 경우 유의미한 것으로 간주될 수 있다. 특이적(또는 선별적) 항체는 관심 있는 단백질에 결합하는 강도의 약 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% 또는 20% 미만의 강도로 또 다른 분자에 결합할 수 있다. 항체는 관심 있는 단백질에 결합하는 강도의 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만 또는 약 5% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만의 강도로 다른 분자에 결합할 수 있다.
- [0265] 항-그램린 항체는 이전에 설명되었으며, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제W02014/159010A1호(Regeneron)는 25 °C에서 625 pM 내지 270 nM의 결합 친화성 K_D 값으로 그램린-1 활성을 억제하는 항-그램린 항체를 설명한다. 문헌[Ciuculan et al (2013)]은 5.6×10^{-10} M의 결합 친화성 K_D 를 가진 항-그램린-1 단일클론 항체를 설명한다.
- [0266] 본원에 기재된 항-그램린-1 항체(2017년 12월 19일에 출원된 국제 특허 출원 공개 제W0/2018/115017호 및 2019년 6월 18일에 출원된 국제 특허 출원 공개 제W0 2019/243801호에도 설명되어 있음, 이들 둘 다가 전체적으로 본원에 참고로 포함됨)는 그램린-1 활성의 알로스테릭 억제제이며, BMP 결합 부위로부터 멀리 떨어진, 앞에서 설명된 바와 같은 신규 에피토프에 결합한다. 항체는 <100 pM의 K_D 값을 가진 예상외로 높은 친화성으로 그램린-1에 결합한다. 따라서, 항체는 현재 사용 가능한 항체에 비해 유의미한 개선을 나타내고 그램린-1 매개 질환의 치료에 특히 유용할 것으로 예상된다.
- [0267] 따라서, 본 발명과 함께 사용하기에 적합한 항체는 (인간) 그램린-1에 대한 높은 친화성 결합을 가질 수 있다. 항체는 <1 nM 미만, 바람직하게는 <500 pM의 해리 상수(K_D)를 가질 수 있다. 한 예에서, 항체는 200 pM 미만의 해리 상수(K_D)를 가진다. 한 예에서, 항체는 100 pM 미만의 해리 상수(K_D)를 가진다. 당분야에서 숙련된 자에게 잘 알려져 있는 바와 같이, 다양한 방법, 예컨대, 표면 플라즈몬 공명 어세이, 포화 어세이 또는 면역어세이,

예컨대, ELISA 또는 RIA를 이용하여 항체의 표적 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 측정할 수 있다. 결합 친화성을 측정하는 예시적인 방법은 문헌[Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. February; 44 (5):916-25. (Epub 2006 May 11)]에 기재된 바와 같이 CM5 센서 칩을 사용하여 BIAcore™ 2000 기기(Biacore AB, 독일 프라이부르크)에서 표면 플라스몬 공명을 분석하는 것이다.

[0268] 본 발명에 따라 사용되는 항체는 전형적으로 억제 항체이다. 그램린-1은 BMP-2, BMP-4 및 BMP-7을 음성적으로 조절하므로, 그램린-1의 억제는 BMP를 통한 신호전달을 증가시킨다.

[0269] 항체가 그램린 1을 억제할 수 있는지를 스크리닝하는 데 이용될 수 있는 구체적인 기능 어세이는 SMAD 인산화 어세이 및 Hek Id1 리포터 유전자 어세이를 포함한다. 전형적으로, 억제 항체는 Hek Id1 리포터 유전자 어세이에서 SMAD 인산화를 회복하고/하거나 BMP의 신호전달을 회복한다. SMAD 인산화는 BMP 대조군과 비교되었을 때 적어도 80%, 90% 또는 100%까지 회복될 수 있다. Hek Id1 리포터 유전자 어세이에서, 억제 항체는 10 nM 미만, 바람직하게는 5 nM 미만의 IC₅₀을 가질 수 있다.

[0270] 적합한 항체가 확인되고 선별되면, 당분야에 알려진 방법으로 항체의 아미노산 서열을 확인할 수 있다. 측퇴 프라이머를 사용하여 항체를 인코딩하는 유전자를 클로닝할 수 있다. 관용적인 방법으로 항체를 재조합적으로 생성할 수 있다.

[0271] 본 개시내용은 본원에 새로 설명된 항체 분자의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역(들)(또는 전체 길이 H-쇄 및 L-쇄)을 인코딩하는 단리된 DNA 서열도 제공한다.

[0272] 변이체 폴리뉴클레오타이드는 서열목록에 제공된 핵산 서열(GREM1 및 항-GREM1 항체 핵산 서열 포함) 중 임의의 핵산 서열로부터의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 최대 10개, 최대 20개, 최대 30개, 최대 40개, 최대 50개, 최대 75개 또는 더 큰 수의 핵산 치환 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 일반적으로, 변이체는 1개 내지 20개, 1개 내지 50개, 1개 내지 75개 또는 1개 내지 100개의 치환 및/또는 결실을 가진다.

[0273] 적합한 변이체는 본원에 개시된 핵산 서열들 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드와 적어도 약 70% 상동할 수 있으며, 전형적으로 적어도 약 80% 또는 90%, 더 적절하게는 적어도 약 95%, 97% 또는 99% 상동할 수 있다. 변이체는 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 유지할 수 있다. 변이체는 전형적으로 약 60% 내지 약 99% 동일성, 약 80% 내지 약 99% 동일성, 약 90% 내지 약 99% 동일성 또는 약 95% 내지 약 99% 동일성을 유지한다. 일반적으로 적어도 폴리뉴클레오타이드의 코딩 영역에 대해 이러한 수준에서의 상동성과 동일성이 존재한다. 상동성을 측정하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있으며, 당분야에서 숙련된 자는 본 문맥에서 상동성이 핵산 동일성을 기반으로 계산된다는 것을 이해할 것이다. 이러한 상동성은 (길이에 따라) 적어도 약 15개, 적어도 약 30개, 예를 들어, 적어도 약 40개, 60개, 100개, 200개 또 더 큰 수의 연속 뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 존재할 수 있다. 이러한 상동성은 변형되지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재할 수 있다.

[0274] 폴리뉴클레오타이드 상동성 또는 동일성을 측정하는 방법은 당분야에 알려져 있다. 예를 들어, UWGCG 팩키지는 상동성을 계산하는 데 사용될 수 있는 BESTFIT 프로그램을 제공한다(예를 들어, 그의 디폴트 설정에서 사용됨)(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395).

[0275] 예를 들어, 문헌[Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10]에 기재된 바와 같이, PILEUP 및 BLAST 알고리즘을 사용하여 (전형적으로 이들의 디폴트 설정에서) 상동성을 계산할 수도 있거나 서열을 정렬할 수도 있다.

[0276] BLAST 분석을 수행하는 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 공개적으로 입수 가능하다. 이 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬될 때 일부 양수 값의 임계값 점수 T와 매칭되거나 이를 충족하는 길이 W의 짧은 단어를 조회 서열에서 확인함으로써 높은 점수화 서열 쌍(HSP)을 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃 단어 점수 임계값으로서 지칭된다(상기 문헌[Altschul et al]). 이러한 초기 이웃 단어 히트는 이를 함유하는 HSP를 찾기 위한 검색을 시작하기 위한 시드로서 작용한다. 단어 히트는 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양방향으로 확장된다. 각각 방향으로 단어 히트에 대한 확장은 누적 정렬 점수가 하나 이상의 음수 점수화 잔기 정렬의 누적으로 인해 0 이하로 떨어지거나; 어느 한 서열의 말단에 도달할 때 중단된다. BLAST 알고리즘 매개변수 W, T 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 11의 단어 길이(W), 50의 BLOSUM62 점수 매트릭스(문헌[Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919] 참조) 정렬(B), 10의 기대치(E), M=5, N=4 및

두 가닥의 비교를 디폴트로서 사용한다.

- [0277] BLAST 알고리즘은 두 서열 사이의 유사성의 통계적 분석을 수행한다(예를 들어, 문헌[Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성 척도 중 하나는 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 매칭이 우연히 발생할 확률의 지표를 제공하는 최소 합계 확률(P(N))이다. 예를 들어, 제1 서열과 제2 서열의 비교에서 최소 합계 확률이 약 1 미만, 전형적으로 약 0.1 미만, 적절하게는 약 0.01 미만, 가장 적절하게는 약 0.001 미만인 경우 서열이 또 다른 서열과 유사한 것으로 간주된다. 예를 들어, 최소 합계 확률은 약 1 내지 약 0.001, 종종 약 0.01 내지 약 0.001의 범위 내에 있을 수 있다.
- [0278] 상동체는 약 3개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 더 큰 수 미만의 돌연변이(이들 각각은 치환, 결실 또는 삽입일 수 있음)에 의해 관련 폴리뉴클레오타이드의 서열과 상이할 수 있다. 예를 들어, 상동체는 3개 내지 50개의 돌연변이, 종종 3개 내지 20개의 돌연변이에 의해 상이할 수 있다. 이러한 돌연변이는 상동체의 적어도 30개, 예를 들어, 적어도 약 40개, 60개 또는 100개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 측정될 수 있다.
- [0279] 한 실시양태에서, 변이체 서열은 유전 코드의 중복성으로 인해 서열목록에 제공된 특정 서열과 상이할 수 있다. DNA 코드는 4개의 주요 핵산 잔기(A, T, C 및 G)를 갖고, 이를 사용하여 생물체의 유전자에 인코딩된 단백질의 아미노산을 나타내는 3글자 코돈을 "표기"한다. DNA 분자를 따라 코돈의 선형 서열은 해당 유전자에 의해 인코딩된 단백질(들)의 선형 아미노산 서열로 번역된다. 코드는 매우 축퇴적이고, 이때 61개의 코돈은 20가지 천연 아미노산을 코딩하고 3개의 코돈은 "정지" 신호를 나타낸다. 따라서, 대부분의 아미노산은 하나 초과와 코돈에 의해 코딩된다 - 실제로, 4개 이상의 상이한 코돈에 의해 여러 개가 코딩된다. 따라서, 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 또 다른 폴리뉴클레오타이드와 동일한 폴리펩티드 서열을 인코딩할 수 있으나, 동일한 아미노산을 인코딩하기 위해 상이한 코돈을 사용하기 때문에 상이한 핵산 서열을 가질 수 있다.
- [0280] DNA 서열은 예를 들어, 화학적 처리에 의해 생성된 합성 DNA, cDNA, 게놈 DNA 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0281] 본원에 기재된 항체 분자를 인코딩하는 DNA 서열은 당분야에서 숙련된 자에게 잘 알려진 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄의 일부 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열은 확인된 DNA 서열로부터 원하는 대로 합성될 수 있거나 상응하는 아미노산 서열을 기반으로 원하는 대로 합성될 수 있다.
- [0282] 벡터를 구축할 수 있는 일반적인 방법, 형질감염 방법 및 배양 방법은 당분야에서 숙련된 자에게 잘 알려져 있다. 이와 관련하여 문헌["Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing]을 참조한다.
- [0283] 핵산 길항제
- [0284] 폴리뉴클레오타이드, 예컨대, 핵산은 2개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 중합체이다. 뉴클레오타이드는 천연적으로 생성될 수 있거나 인공적일 수 있다. 뉴클레오타이드는 전형적으로 핵염기, 당 및 적어도 하나의 연결기, 예컨대, 포스페이트, 2'-O-메틸, 2' 메톡시-에틸, 포스포라미데이트, 메틸포스포네이트 또는 포스포로티오에이트 기를 함유한다. 핵염기는 전형적으로 헤테로고리형 핵염기이다. 핵염기는 퓨린 및 피리미딘, 보다 구체적으로 아데닌(A), 구아닌(G), 타이민(T), 우라실(U) 및 사이토신(C)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 당은 전형적으로 펜토스 당이다. 뉴클레오타이드 당은 리보스 및 데옥시리보스를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 뉴클레오타이드는 전형적으로 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드이다. 뉴클레오타이드는 전형적으로 모노포스페이트, 디포스페이트 또는 트리포스페이트를 함유한다. 포스페이트는 뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 쪽에 부착될 수 있다.
- [0285] 뉴클레오타이드는 아데노신 모노포스페이트(AMP), 아데노신 디포스페이트(ADP), 아데노신 트리포스페이트(ATP), 구아노신 모노포스페이트(GMP), 구아노신 디포스페이트(GDP), 구아노신 트리포스페이트(GTP), 타이미딘 모노포스페이트(TMP), 타이미딘 디포스페이트(TDP), 타이미딘 트리포스페이트(TTP), 유리딘 모노포스페이트(UMP), 유리딘 디포스페이트(UDP), 유리딘 트리포스페이트(UTP), 사이티딘 모노포스페이트(CMP), 사이티딘 디포스페이트(CDP), 사이티딘 트리포스페이트(CTP), 5-메틸사이티딘 모노포스페이트, 5-메틸사이티딘 디포스페이트, 5-메틸사이티딘 트리포스페이트, 5-하이드록시메틸사이티딘 모노포스페이트, 5-하이드록시메틸사이티딘 디포스페이트, 5-하이드록시메틸사이티딘 트리포스페이트, 고리형 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 고리형 구아노신 모노포스페이트(cGMP), 데옥시아데노신 모노포스페이트(dAMP), 데옥시아데노신 디포스페이트(dADP), 데옥시아데노신 트리포스페이트(dATP), 데옥시구아노신 모노포스페이트(dGMP), 데옥시구아노신 디포스페이트(dGDP), 데옥시구아노

신 트리포스페이트(dGTP), 테옥시타이미딘 모노포스페이트(dTMP), 테옥시타이미딘 디포스페이트(dTDP), 테옥시타이미딘 트리포스페이트(dTTP), 테옥시유리딘 모노포스페이트(dUMP), 테옥시유리딘 디포스페이트(dUDP), 테옥시유리딘 트리포스페이트(dUTP), 테옥시사이티딘 모노포스페이트(dCMP), 테옥시사이티딘 디포스페이트(dCDP) 및 테옥시사이티딘 트리포스페이트(dCTP), 5-메틸-2'-테옥시사이티딘 모노포스페이트, 5-메틸-2'-테옥시사이티딘 디포스페이트, 5-메틸-2'-테옥시사이티딘 트리포스페이트, 5-하이드록시메틸-2'-테옥시사이티딘 모노포스페이트, 5-하이드록시메틸-2'-테옥시사이티딘 디포스페이트 및 5-하이드록시메틸-2'-테옥시사이티딘 트리포스페이트를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 뉴클레오타이드는 바람직하게는 AMP, TMP, GMP, UMP, dAMP, dTMP, dGMP 또는 dCMP로부터 선택된다.

[0286] 뉴클레오타이드는 추가 변형을 함유할 수 있다. 특히, 적합한 변형된 뉴클레오타이드는 2'-아미노 피리미딘(예컨대, 2'-아미노 사이티딘 및 2'-아미노 유리딘), 2'-하이드록실 퓨린(예컨대, 2'-플루오로 피리미딘(예컨대, 2'-플루오로사이티딘 및 2'-플루오로 유리딘), 하이드록실 피리미딘(예컨대, 5'- α -P-보라노 유리딘), 2'-O-메틸 뉴클레오타이드(예컨대, 2'-O-메틸 아데노신, 2'-O-메틸 구아노신, 2'-O-메틸 사이티딘 및 2'-O-메틸 유리딘), 4'-티오 피리미딘(예컨대, 4'-티오 유리딘 및 4'-티오 사이티딘), 및 핵염기의 변형을 가진 뉴클레오타이드(예컨대, 5-펜틸-2'-테옥시 유리딘, 5-(3-아미노프로필)-유리딘 및 1,6-디아미노핵산-N-5-카르바모일메틸 유리딘)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0287] 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드는 임의의 방식으로 서로 부착될 수 있다. 뉴클레오타이드는 포스페이트, 2'-O-메틸, 2' 메톡시-에틸, 포스포라미데이트, 메틸포스포네이트 또는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결될 수 있다. 뉴클레오타이드는 전형적으로 핵산에서와 같이 그의 당 및 포스페이트 기에 의해 부착된다. 뉴클레오타이드는 피리미딘 이량체에서와 같이 그의 핵염기를 통해 연결될 수 있다.

[0288] GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0289] 폴리뉴클레오타이드는 테옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)과 같은 핵산일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 당분야에 알려진 임의의 합성 핵산, 예컨대, 펩티드 핵산(PNA), 글리세롤 핵산(GNA), 트레오스 핵산(TNA), 잠금 핵산(LNA), 모르폴리노 핵산, 또는 뉴클레오타이드 측쇄를 가진 다른 합성 중합체일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0290] 폴리뉴클레오타이드 서열은 임의의 적합한 발현 벡터에 클로닝될 수 있다. 발현 벡터에서, 구축물을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 전형적으로 숙주 세포에 의한 코딩 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 발현 벡터를 사용하여 구축물을 발현시킬 수 있다.

[0291] 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드이다. 폴리뉴클레오타이드는 유전자 요법에 사용하기 위해 제공될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 생체내에서 항-GREM1 항체의 발현을 제공할 수 있는 임의의 적합한 벡터에 제공될 수 있다.

[0292] 항-GREM1 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 DNA 서열일 수 있다. DNA 서열은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위해 임의의 적합한 벡터, 예를 들어, 발현 벡터에 제공될 수 있다. 예를 들어, DNA 서열은 생체내에서 항-GREM1 항체의 발현을 제공할 수 있는 발현 벡터로 대상체에게 투여될 수 있다. 발현 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터와 같은 바이러스 발현 벡터일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 DNA 서열이다. 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 유전자 요법에 사용하기 위한 DNA 서열이며, 여기서 DNA 서열은 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩한다. 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 AAV이다. 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 유전자 요법에 사용하기 위한 AAV이며, 여기서 AAV는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 DNA 서열을 포함한다.

[0293] 항-GREM1 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA 서열일 수 있다. RNA 서열은 이를 필요로 하는 대상체에게 임의의 적절한 벡터로 투여될 수 있다. RNA 서열은 메신저 RNA(mRNA) 서열일 수 있다. mRNA 서열은 이를 필요로 하는 대상체에게 안정화된 형태로 투여될 수 있다. 예를 들어, mRNA 서열은 지질 나노입자(LNP) 조성물로 제공될 수 있다. LNP 조성물은 mRNA 서열을 캡슐화하여 상기 mRNA 서열의 안정성 증가를 제공할 수 있는 임의의 적합한 LNP를 포함할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 안정화된 mRNA 서열이다. 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 유전자 요법에 사용하기 위한 안정화된 mRNA 서열이고, 여기서 mRNA 서열은 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩한다. 한 실시양태에서, 항-GREM1 길항제는 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 mRNA를 포함하는 LNP 조성물이다. 한 실시양태에서, 항-

GREM1 길항제는 유전자 요법에 사용하기 위한 LNP 조성물이며, 여기서 LNP 조성물은 본원에 기재된 항-GREM1 항체를 인코딩하는 mRNA를 포함한다.

- [0294] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기재된 구성요소들이 그들의 의도된 방식으로 작용할 수 있게 하는 관계로 있는 병치를 의미한다. 코딩 서열에 "작동 가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 병용 가능한 조건 하에서 달성되는 방식으로 라이게이션된다. 동일하거나 상이한 폴리뉴클레오타이드의 여러 카피를 벡터에 도입할 수 있다.
- [0295] 이어서, 발현 벡터를 적합한 숙주 세포에 도입할 수 있다. 따라서, 구축물을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 병용 가능한 박테리아 숙주 세포에 도입하고, 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 일으키는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 성장시킴으로써 구축물을 생성할 수 있다.
- [0296] 핵산 기반 GREM1 길항제는 GREM1의 발현을 감소시킬 수 있다. 단백질 발현을 억제하는 안티센스 및 RNA 간섭(RNAi) 기술은 당분야에 잘 알려져 있으며, 표준 방법을 이용하여 관심 있는 분자의 발현을 억제할 수 있다. 안티센스 및 siRNA 기술 둘 다 mRNA를 방해한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 일부에 결합(하이브리드화)하여 mRNA를 방해한다. 따라서, (뒤에서 논의된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드가 100% 상보적일 필요는 없지만) 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 mRNA와 상보적이도록 설계된다. 즉, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 cDNA의 일부일 수 있다. 다시 말해, 올리고뉴클레오타이드 서열은 cDNA 서열과 100% 동일하지 않을 수 있다. 이것은 뒤에서도 논의되어 있다. RNAi는 mRNA에 결합하여 단백질 발현을 억제할 수 있는 이중 가닥 RNA, 예컨대, 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)의 사용을 포함한다.
- [0297] 따라서, 길항제는 GREM1을 인코딩하는 mRNA, 예를 들어, 서열번호 36 또는 서열번호 37의 인코딩 서열 또는 이의 변이체에 특이적으로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열에 우선적으로 또는 높은 친화성으로 하이브리드화하지만 다른 서열에 실질적으로 하이브리드화하지 않거나, 하이브리드화하지 않거나, 낮은 친화성으로만 하이브리드화할 때 표적 서열에 "특이적으로 하이브리드화"한다. 보다 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 다른 핵산에 대한 그의 T_m 보다 적어도 5°C , 적어도 10°C , 적어도 20°C , 적어도 30°C 또는 적어도 40°C 더 큰 T_m 으로 표적 서열에 하이브리드화한다. 하이브리드화를 허용하는 조건은 당분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press; and Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)]). 하이브리드화 조건은 당분야에서 설명된 바와 같이 엄격한 조건일 수 있다.
- [0298] 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 50개 이하의 뉴클레오타이드, 예컨대, 40개 이하, 30개 이하, 22개 이하, 21개 이하, 20개 이하, 10개 이하 또는 5개 이하의 뉴클레오타이드를 가진 짧은 뉴클레오타이드 중합체이다. 사용된 올리고뉴클레오타이드는 길이가 20개 내지 25개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 길이가 21개 또는 22개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 뉴클레오타이드는 천연적으로 생성될 수 있거나 인공적일 수 있다. 뉴클레오타이드는 앞에서 설명된 뉴클레오타이드들 중 임의의 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0299] GREM1 길항제는 GREM1에 결합하는, 전형적으로 GREM1에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 항체는 해당 단백질에 우선적으로 또는 높은 친화성으로 결합하지만, 다른 단백질에는 실질적으로 결합하지 않거나, 결합하지 않거나, 낮은 친화성으로만 결합할 때 단백질에 "특이적으로 결합"한다. 예를 들어, 항체는 해당 표적 분자에 우선적으로 또는 높은 친화성으로 결합하지만 다른 인간 단백질에는 실질적으로 결합하지 않거나, 결합하지 않거나, 낮은 친화성으로만 결합할 때 표적 분자에 "특이적으로 결합"한다.
- [0300] 항체는 1×10^{-7} M 이하, 보다 바람직하게는 5×10^{-8} M 이하, 보다 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하 또는 보다 바람직하게는 5×10^{-9} M 이하의 K_d 로 결합하는 경우 우선적으로 또는 높은 친화성으로 결합한다. 항체는 1×10^{-6} M 이상, 보다 바람직하게는 1×10^{-5} M 이상, 보다 바람직하게는 1×10^{-4} M 이상, 보다 바람직하게는 1×10^{-3} M 이상, 훨씬 더 바람직하게는 1×10^{-2} M 이상의 K_d 로 결합하는 경우 낮은 친화성으로 결합한다.
- [0301] 항체는 예를 들어, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 단일쇄 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, CDR-이식된 항체 또는 인간화 항체일 수 있다. 항체는 온전한 면역글로불린 분자 또는 이의 단편, 예컨대, Fab, F(ab')₂ 또는 Fv 단편일 수 있다.

- [0302] 환자
- [0303] 임의의 환자가 본 발명에 따라 치료될 수 있다. 환자는 전형적으로 인간이다. 그러나, 환자는 또 다른 포유류 동물, 예컨대, 상업적으로 사육된 동물, 예컨대, 말, 소, 양, 물고기, 닭 또는 돼지, 실험 동물, 예컨대, 마우스 또는 래트, 또는 애완동물, 예컨대, 기니피그, 햄스터, 토끼, 고양이 또는 개일 수 있다.
- [0304] 약학 조성물, 용량 및 용법
- [0305] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 GREM1 길항제는 약학 조성물로 제공될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제(예컨대, 본원에 설명된 바와 같이 MEK 억제제 또는 ERK 억제제)는 동일한 약학 조성물의 일부 또는 별도의 약학 조성물로 제공될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 GREM1 길항제는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 억제제 또는 ERK 억제제, 또는 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달의 다른 억제제와 함께 약학 조성물로 제공될 수 있다. 약학 조성물은 일반적으로 멸균될 것이며 전형적으로 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 보조제를 포함할 것이다. 이러한 조성물은 치료 활성 성분(들) 외에도 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제, 완충제, 안정화제, 또는 당분야에서 숙련된 자에게 잘 알려진 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 독성이 없어야 하며 활성 성분의 효능을 방해해서는 안 된다. 예를 들어, 약학 담체 또는 희석제는 등장성 용액일 수 있다.
- [0306] 본원에서 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 병용 가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제와 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 담체 또는 기타 물질의 정확한 성질은 투여 경로, 예를 들어, 경구, 정맥내, 피부 또는 피하, 비강, 근육내 및 복강내 경로에 의해 좌우될 수 있다.
- [0307] 담체는 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 비경구, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피내, 안구내, 복강내, 피하, 척추 또는 기타 비경구 투여 경로에 적합할 수 있다. 대안적으로, 담체는 비-비경구 투여, 예컨대, 국소, 표피 또는 점막 투여 경로에 적합할 수 있다. 담체는 경구 투여에 적합할 수 있다. 투여 경로에 따라, 조절제는 화합물을 불활성화할 수 있는 산 및 기타 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위한 물질로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 고체 경구 제형은 활성 물질과 함께, 희석제, 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 사카로스, 셀룰로스, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 활택제, 예를 들어, 실리카, 활석, 스테아르산, 스테아르산마그네슘 또는 스테아르산칼슘 및/또는 폴리에틸렌 글리콜; 결합제, 예를 들어, 전분, 아라비아 검, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 또는 폴리비닐 피롤리돈; 붕해제, 예를 들어, 전분, 알긴산, 알기네이트 또는 나트륨 전분 글리콜레이트; 발포성 혼합물; 염료; 감미제; 습윤제, 예컨대, 레시틴, 폴리소르베이트, 라우릴설페이트; 및 일반적으로, 약학 제제에 사용되는 무독성 및 약리학적으로 비활성인 물질을 함유할 수 있다. 이러한 약학 제제는 예를 들어, 혼합, 과립화, 타정, 당 코팅 또는 필름 코팅 공정을 통해 알려진 방식으로 제조될 수 있다.
- [0308] 다른 경구 제제는 예를 들어, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등과 같은 통상적으로 사용되는 부형제를 포함한다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡슐제, 지속 방출 제제 또는 산제의 형태를 취하며 10% 내지 95%, 바람직하게는 25% 내지 70%의 활성 성분을 함유한다. 약학 조성물이 동결건조된 경우, 동결건조된 물질은 투여 전에 예를 들어, 현탁액으로 재구성될 수 있다. 재구성은 바람직하게는 완충제에서 수행된다.
- [0309] 예를 들어, 유드라기트(Eudragit) "S", 유드라기트 "L", 셀룰로스 아세테이트, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스를 포함하는 장용 코팅을 개체에게 경구 투여할 캡슐제, 정제 및 환제에 제공할 수 있다.
- [0310] 경구 투여용 액체 분산액은 시럽, 에멀전 또는 현탁액일 수 있다. 시럽은 예를 들어, 사카로스, 또는 글리세린 및/또는 만니톨 및/또는 소르비톨과 함께 사카로스를 담체로서 함유할 수 있다.
- [0311] 현탁액 및 에멀전은 예를 들어, 천연 검, 한천, 알긴산나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 또는 폴리비닐알코올을 담체로서 함유할 수 있다. 근육내 주사용 현탁액 또는 용액은 활성 물질과 함께, 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 멸균수, 올리브유, 에틸 올레에이트, 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜 및 원하는 경우 적합한 양의 리도카인 염산염을 함유할 수 있다.
- [0312] 정맥내 투여 또는 주입용 용액은 예를 들어, 멸균수를 담체로서 함유할 수 있거나, 바람직하게는 멸균, 수성, 등장성 식염수 용액의 형태로 존재할 수 있다.
- [0313] 좌약의 경우, 전통적인 결합제 및 담체는 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세라이드를 포함할 수 있

고; 이러한 좌약은 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1% 내지 2%의 범위 내에서 활성 성분을 함유하는 혼합물로서 형성될 수 있다.

- [0314] 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 억제제는 네이키드 뉴클레오타이드 서열일 수 있거나 양이온성 지질, 중합체 또는 표적화 시스템과 조합된 상태일 수 있다. 이들은 임의의 이용 가능한 기법에 의해 전달될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 피내, 피하 또는 근육내 바늘 주사에 의해 도입될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 입자 매개 유전자 전달과 같은 전달 장치를 이용함으로써 피부를 가로질러 직접 전달될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 피부에 국소적으로 투여될 수 있거나, 예를 들어, 비강내, 경구 또는 직장내 투여에 의해 점막 표면에 투여될 수 있다.
- [0315] 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 구축물의 흡수는 여러 알려진 형질감염 기법, 예를 들어, 형질감염제의 사용을 포함하는 기법에 의해 향상될 수 있다. 이러한 작용제의 예는 양이온성 작용제, 예를 들어, 인산칼슘 및 DEAE-덱스트란 및 지질감염제, 예를 들어, 리포펙탐 및 트랜스펙탐을 포함한다. 투여되는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 용량은 변경될 수 있다.
- [0316] 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. "약학적으로 허용되는 염"은 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 임의의 원치 않는 독성학적 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다. 이러한 염의 예는 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다.
- [0317] 약학적으로 허용되는 담체는 수성 담체 또는 회석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 담체의 예는 물, 완충수 및 식염수를 포함한다. 다른 담체의 예는 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대, 올리브유, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레에이트를 포함한다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다.
- [0318] 치료 조성물은 전형적으로 제조 및 보관 조건 하에서 멸균되고 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 배열된 구조물로서 제제화될 수 있다.
- [0319] 본 발명의 약학 조성물은 추가 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0320] 본원에 기재된 조합 요법 및 사용 설명서를 포함하는 키트도 본 개시내용의 범위 내에 있다. 키트는 하나 이상의 추가 시약, 예컨대, 본원에서 논의된 추가 치료제 또는 예방제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0321] 본원에 기재된 길항제 또는 이의 제제 또는 조성물은 예방적 및/또는 치료적 치료를 위해 투여될 수 있다.
- [0322] 치료적 적용에서, 화합물은 앞에서 설명된 바와 같은 장애 또는 질병을 이미 앓고 있는 대상체에게, 상기 질병 또는 이의 증상들 중 하나 이상을 치유하거나, 완화하거나 부분적으로 정지시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 치료적 치료는 질환 증상의 중증도를 감소시킬 수 있거나, 무증상 기간의 빈도 또는 지속시간을 증가시킬 수 있다. 이를 달성하기에 적당한 양은 "치료 유효량"으로서 정의된다.
- [0323] 예방적 적용에서, 제제는 앞에서 설명된 바와 같은 장애 또는 질병의 위험이 있는 대상체에게, 상기 질병 또는 이의 증상들 하나 이상의 후속 효과를 예방하거나 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이를 달성하기에 적당한 양은 "예방 유효량"으로서 정의된다. 각각의 목적에 효과적인 양은 질환 또는 부상의 중증도 및 대상체의 체중과 일반적인 상태에 의해 좌우될 것이다.
- [0324] 투여할 대상체는 인간 또는 비인간 동물일 수 있다. 용어 "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유류 및 비포유류, 예컨대, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다. 인간에게 투여하는 것이 전형적이다.
- [0325] 본 발명의 길항제, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제(예를 들어, MEK 또는 ERK 억제제) 또는 약학 조성물은 당 분야에 알려진 다양한 방법들 중 하나 이상을 이용함으로써 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 숙련된 당업자가 인식할 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 화합물 또는 약학 조성물에 대한 투여 경로의 예는 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 정맥내, 근육내, 피내, 안구내, 복강내, 피하, 척추 또는 기타 비경구 투여 경로를 포함한다. 본원에서 사용된 문구 "비경구 투여"는 통상적으로 주사에 의한, 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미한다. 대안적으로, 본 발명의 항체/조절제 또는 약학 조성물은 비-비경구 경로, 예컨대, 국소, 표피 또는 점막 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 본 발명의

항체/조절제 또는 약학 조성물은 경구 투여용일 수 있다.

- [0326] 본 발명의 항체/조절제 또는 약학 조성물의 적합한 용량은 숙련된 의료 종사자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에서 활성 성분의 실제 용량 수준은 환자에게 독성을 나타내지 않으면서, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변경될 수 있다. 선택된 용량 수준은 사용되는 구체적인 본 발명의 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 구체적인 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용되는 구체적인 조성물과 함께 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에 잘 알려져 있는 유사한 요인을 비롯한 다양한 약동학적 요인들에 의해 좌우될 것이다.
- [0327] 예를 들어, 적합한 용량은 앞에서 언급된 조건에 따라 치료될 환자의 체중 kg당 약 0.01 μg 내지 약 1000 mg, 전형적으로 체중 kg당 약 0.1 μg 내지 약 100 mg의 범위 내에 있을 수 있다. 예를 들어, 적합한 용량은 하루에 체중 kg당 약 1 μg 내지 약 10 mg 또는 하루에 체중 kg당 약 10 μg 내지 약 5 mg일 수 있다.
- [0328] 최적 원하는 반응(예를 들어, 치료 반응)을 제공하기 위해 용법을 조절할 수 있다. 예를 들어, 단일 용량을 투여할 수 있거나, 여러 분할된 용량을 시간 경과에 따라 투여할 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 의해 표시될 때 용량을 비례적으로 감소시킬 수 있거나 증가시킬 수 있다. 용량은 다회 용량으로서 제공될 수 있으며, 예를 들어, 규칙적인 간격으로 복용될 수 있고, 예를 들어, 매시간 2회, 3회 또는 4회 용량이 투여될 수 있다. 다회 용량은 동일하거나 상이한 경로를 통해 동일하거나 상이한 위치에 투여될 수 있다. 대안적으로, 용량은 지속 방출 제제를 통해 투여될 수 있고, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 용량과 빈도는 환자에서의 길항제의 반감기 및 원하는 치료의 지속시간에 따라 달라질 수 있다.
- [0329] 전형적으로 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 억제제는 입자 매개 전달의 경우 1 pg 내지 1 mg, 바람직하게는 1 pg 내지 10 μg 핵산의 범위 내에서 투여되고, 다른 경로의 경우 10 μg 내지 1 mg의 범위 내에서 투여된다.
- [0330] 본원에서 사용된 용량 유닛 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 용량으로서 맞추어진 물리적으로 분리된 유닛을 지칭하고; 각각의 유닛은 필요한 약학 담체와 함께, 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 사전결정된 양의 활성 화합물을 함유한다.
- [0331] 앞에서 언급된 바와 같이, 본 발명의 조절제/항체 또는 약학 조성물은 하나 이상의 다른 치료제와 공-투여될 수 있다.
- [0332] 앞에서 언급된 기법 및 프로토콜의 예는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins]에서 찾을 수 있다.
- [0333] 두 가지 이상의 작용제의 조합된 투여는 다수의 상이한 방법으로 달성될 수 있다. 두 작용제는 단일 조성물로 함께 투여될 수 있거나, 조합 요법의 일부로서 별도의 조성물로 투여될 수 있다. 예를 들어, 하나는 다른 하나 전에 또는 별도로, 다른 하나 후에 또는 순차적으로, 또는 다른 하나와 동시에 또는 동시적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-GREM1 길항제는 Ras-Raf-MERK-ERK 신호전달 억제제 전에 또는 별도로, 이러한 억제제 후에 또는 순차적으로, 또는 이러한 억제제와 동시에 또는 동시적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-GREM1 길항제는 본원에 설명된 바와 같이 MEK 억제제 전에 또는 별도로, 이러한 억제제 후에 또는 순차적으로, 또는 이러한 억제제와 동시에 또는 동시적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 항-GREM1 길항제는 본원에 설명된 바와 같이 ERK 억제제 전에 또는 별도로, 이러한 억제제 후에 또는 순차적으로, 또는 이러한 억제제와 동시에 또는 동시적으로 투여될 수 있다.
- [0334] 조성물 및 키트
- [0335] 항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조성물 또는 키트를 추가로 제공한다. 항-GREM1 길항제는 본원에 설명된 바와 같이 임의의 항-GREM1 길항제일 수 있다. Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제는 본원에 설명된 바와 같이 임의의 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제일 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 항-GREM1 길항제와 MEK 억제제를 포함하는 조성물 또는 키트를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-GREM1 길항제와 ERK 억제제를 포함하는 조성물 또는 키트를 제공한다. 조성물 또는 키트는 궤장암 치료에 적합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, MEK 억제제는 특히 궤장암 치료를 위한 조성물 또는 키트의 일부로서 셀루메티닙(AZD6244), 트라메티닙(GSK-1120212) 또는 WX-554(UCB-554)이다. 바람직한 조합은 항-GREM1 길항제와 셀루메티닙(AZD6244), 트라메티닙(GSK-1120212) 또는 WX-554(UCB-554)를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서,

ERK 억제제는 울릭세르티닙이다.

- [0336] 항-GREM1 특이성과 다른 상기 특이성 중 하나를 겸비한 이중특이적 항체는 본원에 기재된 조성물 또는 키트에 제공될 수 있다. 상기 조성물들 및 키트들 중 임의의 조성물 및 키트의 항-GREM1 길항제는 바람직하게는 항-GREM1 항체일 수 있다.
- [0337] 추가 치료적 조합
- [0338] 앞에서 설명된 본 발명의 조합 요법은 예를 들어, 보조 요법으로서, 치료를 위한 추가 치료적 조성물과의 조합으로 사용/투여될 수 있다. 다른 치료적 조성물 또는 치료는 예를 들어, 본원에 논의된 치료적 조성물 또는 치료 중 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 조성물과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0339] GREM1 길항제는 암 또는 종양을 방사선요법 또는 수술과 같은 추가 항암제에 민감하게 만드는 데 사용될 수 있기 때문에 조합 치료에 특히 유용하다. 암은 GREM1 길항제의 부재 하에서 다른 항암제 또는 암 요법에 대한 내성을 가질 수 있다.
- [0340] 따라서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합되는 항-GREM1 길항제는 임의의 다른 암 요법 또는 암에 대한 임의의 다른 치료제와의 조합으로 사용될 수도 있다. 다른 암 요법은 관련 암에 대한 임의의 알려진 요법, 예컨대, 췌장암에 대한 임의의 알려진 요법으로부터 선택될 수 있다. 다른 암 요법은 방사선요법일 수 있다. 적합한 방사선요법 치료는 예를 들어, 문헌[Van Cutsem (and others) Annals of Oncology, 2014. Vol 25, Issue 3]에 설명되어 있다. 방사선요법은 암 수술 전 또는 암 수술 후에 수행될 수 있다. 방사선요법은 보조 방사선요법일 수 있다. 방사선요법은 본원에 설명된 바와 같이 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 수행될 수 있다. 예를 들어, GREM1 길항제 및 셀루메티닙(AZD6244)을 포함하는 조합 요법은 방사선요법과의 조합으로 사용될 수 있다. 추가로, GREM1 길항제 및 트라메티닙(GSK-1120212)을 포함하는 조합 요법은 방사선요법과의 조합으로 사용될 수 있다. 대안적으로, GREM1 길항제 및 WX-554(UCB-554)를 포함하는 조합 요법은 방사선요법과의 조합으로 사용될 수 있다. 본원에 설명된 바와 같이 GREM1 길항제 및 임의의 MEK 억제제를 포함하는 조합 요법은 방사선요법과의 조합으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 설명된 바와 같이 GREM1 길항제 및 임의의 ERK 억제제를 포함하는 조합 요법은 방사선요법과의 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, GREM1 길항제 및 울릭세르티닙을 포함하는 조합 요법은 방사선요법과의 조합으로 사용될 수 있다.
- [0341] 암은 본원에 설명된 바와 같이 GREM1 길항제를 포함하는 조합 요법과 함께 투여되지 않을 때 방사선요법에 대한 내성을 가질 수 있다.
- [0342] 상기 측면의 일부로서, 본 발명은 본 발명에 따른 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공하며, 여기서 상기 방법은 추가 항암제를 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 발명에 따른 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 하나 이상의 MEK 억제제(예컨대, 셀루메티닙(AZD6244), 트라메티닙(GSK-1120212) 및/또는 WX-554(UCB-554))와 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공하고, 여기서 상기 방법은 추가 항암제를 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0343] 상기 측면의 일부로서, 본 발명은 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 하나 이상의 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 본 발명에 따른 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 MEK 억제제 셀루메티닙(AZD6244)과 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공할 수 있으며, 여기서 상기 방법은 트라메티닙(GSK-1120212), 코비메티닙(GDC-0973), 비니메티닙(MEK162), CI-1040(PD184352), 미르다메티닙(PD0325901), TAK733, 레파메티닙(RDEA119/Bay 86-9766), RO-5126766, RO5068760, 피마세르티닙(AS703026), AZD8330, GDC-0623, RO-4987655, WX-554(UCB-554), HL-085, ARRY-300, ClnQ-03, G-573, PD184161, PD318088, PD98059, U0126 또는 SL327과 같은 추가 MEK 억제제를 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0344] 대안적 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 MEK 억제제 트라메티닙(GSK-1120212)과 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공할 수 있으며, 여기서 상기 방법은 셀루메티닙(AZD6244), 코비메티닙(GDC-0973), 비니메티닙(MEK162), CI-1040(PD184352), 미르다메티닙(PD0325901), TAK733, 레파메티닙(RDEA119/Bay 86-9766), RO-5126766, RO5068760, 피마세르티닙(AS703026), AZD8330, GDC-0623, RO-4987655, WX-554(UCB-554), HL-085, ARRY-300, ClnQ-03, G-573, PD184161, PD318088, PD98059, U0126 또는 SL327과 같은 추가 MEK 억제제를 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여하는 단계를 추

가로 포함한다.

[0345] 추가 대안적 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 MEK 억제제 WX-554(UCB-554)와 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공할 수 있으며, 여기서 상기 방법은 트라메티닙(GSK-1120212), 셀루메티닙(AZD6244), 코비메티닙(GDC-0973), 비니메티닙(MEK162), CI-1040(PD184352), 미르다메티닙(PD0325901), TAK733, 레파메티닙(RDEA119/Bay 86-9766), RO-5126766, RO5068760, 피마세르티닙(AS703026), AZD8330, GDC-0623, RO-4987655, HL-085, ARRY-300, ClnQ-03, G-573, PD184161, PD318088, PD98059, U0126 또는 SL327과 같은 추가 MEK 억제제를 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0346] 추가 대안적 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 암, 예컨대, 췌장암의 치료 및/또는 예방 방법에 사용하기 위해 ERK 억제제인 울릭세르티닙과 조합되는 항-GREM1 길항제를 제공할 수 있고, 여기서 상기 방법은 울릭세르티닙, 테무테르킵, JSI-1187, 라복세르티닙, ASN007 또는 MK-8353과 같은 추가 ERK 억제제를 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0347] 본 발명은 본원에 설명된 바와 같이 MEK 억제제와 조합되고 ERK 억제제와도 조합되는 항-GREM1 길항제를 추가로 제공할 수 있다.

[0348] 검출 및 진단

[0349] Ras-Raf-MEK-ERK 경로에 관여하는 유전자가 GREM1 길항제를 사용한 치료 후에 상향조절된다는 발견과 결부된, 간질 GREM1과 암 사이의 상관관계를 기반으로, 본 발명은 치료에 대한 암의 반응성을 예측하는 추가 수단도 제공한다. 이러한 수단은 환자로부터 수득된 샘플에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달, GREM1의 간질 발현 및/또는 상피 발현을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0350] 본 발명은 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 이 방법은 상기 환자에서 GREM1의 간질 및/또는 상피 발현, 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다.

[0351] 본 발명은 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 항-GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법도 제공하고, 이 방법은 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/노출 후에 상기 환자에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 상향조절/유도된 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달은 환자가 본 발명에 따른 조합 요법을 위한 우수한 후보임을 표시할 수 있다. 본 발명은 췌장암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 췌장암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 항-GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법을 추가로 제공하고, 이 방법은 항-GREM1 길항제를 사용한 치료/노출 후에 상기 환자에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 상향조절된 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달은 환자가 본 발명에 따른 조합 요법을 위한 우수한 후보임을 표시할 수 있다. 본 발명은 췌장암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 췌장암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법도 제공하고, 이 방법은 상기 환자에서 GREM1의 간질 및/또는 상피 발현을 측정하고, 상기 환자가 RAS 유전자 또는 RAF 유전자의 돌연변이를 갖는지를 결정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함한다.

[0352] 주어진 요법에 대한 개체의 예측된 반응성은 개체가 요법을 받는 것으로부터 이익 또는 충분한 정도의 이익을 이끌어낼 것으로 예상된다는 것을 의미한다. 요법에 대한 개체의 예측된 비-반응성은 개체가 요법을 받는 것으로부터 이익 또는 충분한 정도의 이익을 이끌어낼 것으로 예상되지 않는다는 것을 의미한다. 반응을 예측하는 방법은 GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료의 투여 전에 수행될 수 있다. 그 다음, 개체에 적합한 치료를 선별하거나 권장할 때 상기 예측을 고려할 수 있다. 대안적으로, 상기 방법은 요법을 사용한 치료 후에 수행될 수 있고 치료에 대한 개체의 반응을 모니터링하고 예측하는 데 사용될 수 있다. 전형적으로, 상기 방법은 개체가 요법을 사용한 치료에 대한 일차 반응을 가질지 여부, 즉 개체가 처음 치료를 받을 때 반응할지 여부를 예측하기 위한 것이다. 일부 경우, 상기 방법은 이차 비-반응성, 즉 처음에는 치료에 반

응하는 개체가 치료에 반응하는 것을 나중에 중단할지 또는 치료에 덜 잘 반응할지 여부를 예측하기 위한 것이다.

[0353] 일부 경우, 기준 샘플 또는 기준 수준과 비교하였을 때, GREM1의 과발현은 개체가 본원에 기재된 조합 치료를 사용한 요법에 반응할 것임을 표시한다. 기준 샘플 또는 기준 수준과 비교하였을 때, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달의 이상조절, 예를 들어, *Nras*, *Mapk1* 및/또는 *Myc*의 상향조절은 개체가 본원에 기재된 조합 치료를 사용한 요법에 반응할 것임을 표시할 수도 있다. Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달은 예를 들어, MEK 및 ERK에 대한 인 특이적 항체와 같은 인산화 부위 특이적 항체를 사용하여 인산화 수준을 조사함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 기준 샘플 또는 기준 수준과 비교하였을 때, 본 발명의 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 증가된 Map2k1/Map2k2/Erk1/Erk2 인산화는 개체가 본원에 기재된 조합 치료를 사용한 요법에 반응할 것임을 표시한다. 이어서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제, 예컨대, MEK 억제제 또는 ERK 억제제와의 조합으로 GREM1 길항제를 포함하는 조합 요법을 선별하거나 권장한 다음, 개체에게 추가로 투여할 수 있다.

[0354] 다른 경우, 기준 샘플 또는 기준 수준과 비교하였을 때, GREM1의 감소된 또는 정상 수준은 개체가 GREM1 길항제를 사용한 요법에 반응하지 않을 것임을 표시한다. 기준 샘플 또는 기준 수준과 비교하였을 때, 정상 또는 감소된 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달은 개체가 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 요법에 반응하지 않을 것임을 표시할 수 있다. 이 경우, GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조합 요법을 개체에게 투여하지 않는다. 또한, 본원에 기재된 조합 요법 이외의 치료적 치료를 개체의 치료를 위해 선별하거나 권장한 후, 개체에게 추가로 투여할 수 있다.

[0355] 다른 경우, RAS 유전자(예컨대, KRAS, NRAS 및/또는 HRAS) 또는 RAF 유전자(예컨대, ARAF, BRAF 및/또는 CRAF)의 돌연변이는 개체가 본원에 기재된 조합 치료를 사용한 요법에 반응할 것임을 표시한다. 이 경우, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 GREM1 길항제를 포함하는 조합 요법을 선별하거나 권장한 다음, 개체에게 추가로 투여할 수 있다.

[0356] 본 발명의 모든 측면에서, 암(예를 들어, 췌장암)을 가진 개체 또는 질환 또는 질병을 가진 것으로 의심되는 개체 및/또는 질환 또는 질병을 발생시킬 위험이 있는 개체를 치료를 위해 선별할 수 있거나 확인할 수 있다. 예를 들어, 개체는 공식적으로 진단받지 않았을 수 있으나, 하나 이상의 증상의 존재 때문에 상기 질환 또는 질병을 가진 것으로 의심될 수 있다. 개체는 암과 관련된 하나 이상의 위험 요인 및/또는 암에 대한 그의 감수성을 증가시키는 하나 이상의 소인을 가진 경우 암을 발생시킬 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 췌장암과 관련된 위험 요인은 *PRRS1* 유전자의 돌연변이 및 유전되는 유전적 돌연변이, 예컨대, GREM1 인코딩 유전자의 돌연변이 또는 돌연변이들, 또는 GREM1 유전자의 발현에 영향을 미치는 임의의 다른 돌연변이에 의해 유발된 가족성 췌장염을 포함할 수 있다.

[0357] 하기 실시예는 본 발명을 예증한다.

[0358] 실시예

[0359] 재료 및 방법

[0360] 항-그렙린-1 항체 - Ab7326 mIgG1 - APP.4405.IgG.mFc

[0361] 비히클 - 인산염 완충 식염수 pH 7.4(비슨 인스티튜트(Beatson Institute)에 의해 제공됨)

[0362] 0.5% HPMC + 0.1% Tween-80 중의 셀루메티닙(AZD6244) - 비슨 인스티튜트에 의해 제공됨(신테시스 팜(SYNthesis Pharm)으로부터 구매함).

[0363] 10% DMSO + 90%의 1%(w/v) 메틸 셀룰로스 중의 UCB-554 MEK 억제제(UCB1366554-000, 배치 ID B10476792, UCB에 의해 제공됨). 투약은 125 μ l의 10 mg/kg, 경구(p.o.), 2일에 1회(q2d)였다.

[0364] 실시예 5의 비히클은 125 μ l의 10% DMSO + 90%의 1%(w/v) 메틸 셀룰로스, p.o., q2d였다.

[0365] 유전적으로 변형된 마우스

[0366] *LSL-Kras^{G12D/+}; Trp53^{R172H/+}; Pdx1-Cre(KPC)* 마우스는 이전에 설명되어 있다(Hingorani et al., 2005). Pdx1-Cre 및 조건부 *LSL-Kras^{G12D}* 또는 *LSL-Trp53^{R172H}* 대립유전자를 보유하는 마우스(품종 01XJ6 및 01XL9, 인간 암 컨소시엄의 마우스 모델[MMHCC], NCI-Frederick, 미국 메릴랜드주 프레드릭)를 교배하여 마우스를 생성하였다. 혼합된 배경의 마우스를 CRUK 비슨 인스티튜트에서 사내 사육하였고, 환경적으로 풍부하고 표준 사료와 물에 임의로 접근할 수 있는 보편적인 우리에서 유지하였다. 트랜스네틱스(Transnetyx)(미국 테네시주 코르도바)에서 유

전자형검사를 수행하였다. 두 성별의 마우스를 연구에 동원하였다. 모든 동물 실험을 영국 내무부 허가 하에 수행하였고 글래스고 대학 동물 복지 및 윤리 검토 위원회의 승인을 받았다.

[0367] 실시예 3 및 4에 대한 치료

[0368] 복부 촉진으로 췌장암을 진단하고 초음파 영상화로 확인할 때까지 마우스를 매주 3회 모니터링하였다. 마우스를 치료 아암으로 무작위배정하고, 30 mg/kg Ab7326 mIgG1을 매주 2회 피하 투여하였거나; 30 mg/kg Ab7326 mIgG1을 매주 2회 피하 투여하고 25 mg/kg 셀루메티닙을 하루에 2회(b.i.d) 경구 투여하였다. 25 mg/kg 셀루메티닙으로 하루에 2회 경구 치료한 마우스의 과거 데이터는 입수 가능해졌다. 군당 ≥ 2 마리의 마우스가 있었다. 마우스를 매일 모니터링하고 치료 시작 후 7일째 날(군당 4마리 마우스) 또는 윤리적 종점(군당 ≥ 8 마리 마우스, 증상은 복부 팽창, 악액질, 간헐적 굶음 또는 감소된 운동성, 털세움, 경미한 설사, 빈혈을 포함함)에 도달하였을 때 희생시켰다. 치료 시작부터 이러한 마우스의 생존의 통계적 평가를 카플란-마이어 및 로그-순위 분석으로 수행하였다.

[0369] 초음파 영상화

[0370] 비주얼소닉스 베보(VisualSonics Vevo) 3100 전임상 영상화 플랫폼(FUJIFILM VisualSonics, 캐나다 토론토)을 고해상도 초음파 영상화에 사용하여 종양 진단을 확인하고 종양 진행을 매주 모니터링하였다. 이소플루란과 의료용 공기의 혼합물로 마취를 유도하고 유지하였다. 종양 부피를 각각의 마우스에 대해 매주 계산하고 종단적으로 작도하였다.

[0371] 샘플링

[0372] 마우스를 연구소 지침에 따라 일정 1 방법으로 도태하였다. 사후 종양 부피를 육안 병리학 및 조직학으로 평가하였다. 장기를 제거하고 10% 완충 포르말린에 고정시켰다. 가능한 경우, 희생 시, 심장 천자를 통해 말단 혈액 샘플을 채취하고 혈청을 위해 처리하였다. FFPE 처리를 위해 대부분의 종양을 10% 완충 포르말린에 고정시켰고, RNA 준비 및/또는 급속 냉동을 위해 임의의 나머지를 RNAlater[®] (Sigma-Aldrich)에 수거하였다. 고정된 조직을 파라핀 포매하였고 IHC 분석을 위해 5 μ m 절편을 폴리-L-라이신 슬라이드에 놓았다.

[0373] 조직학 및 면역조직화학

[0374] 이전에 설명된 바와 같이 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에 대해 H&E 및 피크로시리우스 레드 염색을 수행하였다. 표준 프로토콜을 이용하여 면역조직화학을 수행하였다. 요약하면, 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 절편으로부터 파라핀을 제거하고 이 절편을 크실렌 및 일련의 등급화된 알코올에 통과시켜 재수화하였다. 과산화수소로 처리하여 내인성 과산화효소 활성을 불활성화한 후, 구연산염 완충제 항원 회수를 수행하였다. 절편을 혈청에서 차단한 다음, 일차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 절편을 이차 항체에서 30분 동안 인큐베이션하였고, 3,3'-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드로 염색을 시각화하였다. 사용된 일차 항체는 항-알파-SMA(1A4, Sigma-Aldrich) 1:20,000 및 항-포도폴라닌(RTD4E10, AbCam 1:250)이었다.

[0375] 실시예 5에 대한 치료

[0376] 복부 촉진으로 췌장암을 진단하고 초음파 영상화로 확인할 때까지 마우스를 매주 3회 모니터링하였다. 마우스를 치료 아암(군당 n = 9 내지 11)으로 무작위배정하고 다음을 투여하였다: 125 μ l 비히클, p.o., q2d; 30 mg/kg Ab7326 mIgG1 s.c. 매주 2회; 25 mg/kg 셀루메티닙 p.o., b.i.d.; 30 mg/kg Ab7326 mIgG1 s.c. 매주 2회 및 25 mg/kg 셀루메티닙 p.o., b.i.d.; 125 μ l의 UCB-554 10 mg/kg, p.o., q2d; 또는 30 mg/kg Ab7326 mIgG1 s.c. 매주 2회 및 125 μ l의 UCB-554 10 mg/kg, p.o., q2d. 마우스를 매일 모니터링하고 윤리적 종점에 도달하였을 때 희생시켰다.

[0377] 실시예 5에 대한 통계

[0378] 콕스(Cox)의 비례적 위험 모델을 사용하여 치료 시작부터 이러한 마우스의 생존의 통계적 평가를 수행하여 위험비를 계산하였다. 무작위배정 설계에 적합한 선형 모델을 사용하여 7일째 날 데이터에서 종양 부피 데이터를 분석하였고, 0일째 날의 치료 종양 부피의 피팅을 공변량으로서 사용하여 추정치의 정확도를 증가시켰다.

[0379] 실시예 1: 췌장암에서 *Grem1* mRNA 발현의 확인

[0380] 그렘린-1이 췌장암에서 역할을 하는지를 조사하기 위해, RNAseq 분석으로 확인하였을 때, *Grem1* mRNA 발현을 인간 췌장관 선암종(PDAC) 환자의 코호트에서 확인하였다. 이것은 *Grem1* mRNA가 인간 PDAC에서 발현되었고, 높은 발현이 좋지 않은 예후와 유의미하게 관련되어 있었음을 확인시켜주었다(도 1). 이 결과는 췌장암에서 *Grem1* 발

현과 좋지 않은 결과 사이의 연관성을 보고한 공개된 연구와 일치하였다(Yu et al., 2018).

[0381] 췌장암의 KPC 유전적 조작 마우스 모델에서 *grem1* mRNA가 발현되었는지를 확인하기 위해, KPC 종양(및 다른 토착성 췌장암 모델)에서 유전자 발현을 조사하고 대조군인 KrasG12D 발현 정상 췌장관 상피와 비교하였다. 결과는 *grem1* mRNA 발현이 대조군에 비해 KPC 종양(및 다른 무린 췌장 종양)에서 상승되었음을 표시한다(표 1).

표 1

유전자 기호	유전자 명칭	KPC 종양 대 췌장관 세포(배수 변화)	p-값	모든 마우스 PDAC 대 췌장관 세포(배수 변화)	p-값
<i>grem1</i>	그렘린 1	5.5	4.0×10^{-3}	6.4	4.1×10^{-3}

[0382]

[0383] 실시예 2: Ab7326 mIgG1을 사용한 치료 시 KPC 마우스 모델에서의 유전자 발현 변화.

[0384] 췌장 종양이 확인된 KPC 마우스를 재료 및 방법에 설명된 바와 같이 확립하였다. 표 2에 표시된 바와 같이 항-그렘린 항체 Ab7326 mIgG1 또는 비히클 대조군으로 치료하기 위해 마우스를 코호트에 등록하였다.

[0385] 마우스를 윤리적 종점에서 희생시켰고, RNA 추출을 위해 주요 종양 조직을 RNAlater[®] (Sigma-Aldrich)에 수거하였다. 대략 750개 프로브의 패널을 사용하여 나노스트링(Nanostring) nCounter 유전자 발현 기술을 이용하여 RNA 샘플을 조사하였다.

표 2

치료	용량	일정	n =	중양값 생존기간(일)
Ab7326 mIgG1	30 mg/kg s.c.	매주 2 회	3	26
비히클(PBS)	na	매주 2 회	3	20

[0386]

[0387] Ab7326 mIgG1에 노출되었을 때 KPC 마우스 모델에서의 유전자 발현 변화의 분석은 MAPK/ERK(MEK) 경로와 그의 정규 구성원의 상향조절을 보여주었다.

[0388] MAPK/ERK(MEK) 경로의 정규 구성원인 *Mapk1*, *Nras* 및 *Myc*는 상향조절되었다(도 3). 불충분한 검정력(군당 3개의 샘플, 즉 Ab7326 mIgG1 노출 및 대조군)으로 인해, 이러한 유전자들은 다중 가설 보정 후 그들의 통계적 유의성을 상실하였다(FDR <5%). 그러나, 이 3개의 유전자의 유전자 발현 분포의 차이를 도시하는 상자와 수염 플롯은 Ab7326 mIgG1을 대조군 아암과 비교하였을 때 상향조절된 발현을 명확히 보여주었다(도 3).

[0389] 이러한 발견은 경로 농후화 분석에 의해 확인되었다(도 4). KRAS 신호전달의 하향조절은 하향조절된 유전자 세트에서 농후화된 반면($p = 0.03$), KRAS 신호전달의 상향조절은 상향조절된 차등적으로 발현된 유전자 세트와 연관되어 있었다($p = 0.01$). 이 농후화된 경로는 다중 가설 보정 후 통계적으로 유의미한 상태로 남아있지 않았지만, 상향조절된 효과와 하향조절된 효과에 걸친 일관된 패턴은 두드러졌다.

[0390] 또한, KPC 마우스가 Ab7326 mIgG1에 노출되었을 때 증식 신호는 증가하였다(G2M, E2F 및 MYC 표적). 이것은 MAPK/ERK(MEK) 경로 활성화의 다운스트림 효과와 일치하였다. 도 4에서, $-\log_{10}(p)$ 점수가 표시되어 있고, $p < 0.05$ 인 경로만이 유지되었다. 다중 가설 보정을 수행하지 않았다. 그러나, MYC_표적, E2F_표적 및 G2M_체크포인트

트 경로는 이 보정 후 유의미하게 유지되었다(FDR < 5%).

이러한 발견은 췌장암의 치료를 위한 Ab7326 mIgG1과 MEK 억제제의 잠재적 조합을 뒷받침하였다. 나아가, Ab7326 mIgG1 노출은 췌장암을 이 표적화 치료에 더 민감하게 만들 수 있다.

실시예 3: Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합을 사용한 치료는 Ab7326 mIgG1을 단일 작용제로서 사용한 치료에 비해 종양 성장을 늦춘다.

LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx1-Cre(KPC) 마우스는 이전에 설명되어 있다(Hingorani et al., 2005). 이 마우스는 조직학 및 병리학의 관점에서 인간 췌장 종양과 유사하고 매우 공격적이며 종종 전이성 및 고도 화학내성을 나타내어, 다시 인간 췌장암을 모방하는 종양을 발생시킨다. KPC 마우스의 코호트를 확립하였고 촉진에 의해 검출될 수 있는 췌장암을 발생시킬 때까지 마우스를 모니터링하였다. 이 마우스를 생성하는 데 필요한 번식 전략 및 실험 설계는 도 2에 제시되어 있다.

췌장 종양이 검출될 수 있을 때까지 마우스를 촉진으로 적어도 매주 모니터링하였다. 이때, 고해상도 초음파 영상화를 이용하여 췌장암의 존재를 확인하였고, 항-그렙린1 항체 Ab7326 mIgG1, 또는 조합된 Ab7326 mIgG1 + 셀루메티닙을 사용하여 치료하기 위해 마우스를 코호트에 등록하였다(표 3 및 4에 상세히 기재됨).

표 3

치료	용량	일정	n =	시점
Ab7326 mIgG1	30 mg/kg s.c.	매주 2 회	4	7 일
Ab7326 mIgG1 + 셀루메티닙	30 mg/kg s.c. 25 mg/kg p.o.	매주 2 회 b.i.d.	4	7 일

표 4

치료	용량	일정	n =	종양값 생존기간
Ab7326 mIgG1	30 mg/kg s.c.	매주 2 회	9	19
셀루메티닙*	25 mg/kg p.o.	b.i.d.	8	17
Ab7326 mIgG1 + 셀루메티닙	30 mg/kg s.c. 25 mg/kg p.o.	매주 2 회 b.i.d.	9	33

각각의 코호트로부터 4마리의 마우스가 1주 후에 후속 초음파 스캔을 받았고, 이어서 이 마우스를 희생시켜 약력학적 평가용 샘플을 생성하였다(표 3). 육안 병리학의 분석은 다양한 실험 조건 사이에 종양 부담 또는 표현형의 임의의 차이를 보여주지 않았다. 초음파에 의한 3D 종양 영상화의 분석은 조합된 Ab7326 mIgG1 + 셀루메티닙으로 치료한 마우스에서 종양 성장이 느려졌음을 보여주었다(도 5).

실시예 4: Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합을 사용한 치료는 Ab7326 mIgG1만을 사용한 치료에 비해 연장된 반응으로 더 느린 종양 성장과 종양 수축을 유발하고, 셀루메티닙 및 Ab7326 mIgG1을 단일 작용제로서 사용한 치료에 비해 종양값 생존기간의 유의미한 증가를 유발한다.

생존 코호트(표 4)의 경우, 치료받는 각각의 개별 마우스의 종양 부담을 모니터링하기 위해 치료 기간 동안 고해상도 초음파 영상화를 매주 수행하였다. 마우스는 연구에 남았고 윤리적 종점에 도달할 때까지 마우스를 면밀히 모니터링하였으며, 이 윤리적 종점에서 마우스를 연구소 지침에 따라 희생시켰다. 표시된 임상적 특징은 복부 팽창, 악액질을 표시하는 신체 상태조절의 상실, 감소된 운동성 및 때때로 황달을 포함하였다.

[0400]

초음파에 의한 3D 종양 영상화의 분석은 Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합으로 치료한 여러 마우스에서 연장된 반응으로 더 느린 종양 성장과 종양 수축이 있었음을 보여주었다(도 6). 또한, 본 발명자들은 Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합으로 치료한 마우스가 셀루메티닙만으로 치료한 마우스(17일, 로그 순위, $p=0.050$)에 비해 중앙값 생존기간(33일)의 유의미한 증가, 및 Ab7326만으로 치료한 마우스(19일, 개별 마우스 데이터에 대해서는 도 7, 표 5 및 표 6 참조)에 비해 중앙값 생존기간의 증가를 보였음을 관찰하였다. 약력학적 평가 및 생존 연구들 다로부터 얻은 혈청 샘플을 분석을 위해 UCB로 보냈다(표 7).

표 5

Ab7326 + 셀루메티닙 대 Ab7326	P = 0.100
Ab7326 + 셀루메티닙 대 셀루메티닙	P = 0.050
Ab7326 + 셀루메티닙 대 Ab7326 (조합된 제 1 & 제 2 Ab7326 단일 약제 코호트)	P = 0.061

[0401]

표 6

마우스 ID	반응한 일수	Ab7326	셀루메티닙	Ab7326 + 셀루메티닙
NKD207.1d	11	1		
NKD203.2e	18	1		
NKD193.7a	18	1		
NKD203.6a	18	1		
NKD192.9d	19	1		
NKD211.1f	21	1		
NKD211.3e	25	1		
NKD210.1d	33	1		
NKD206.2c	40	1		
160324	9		1	
NKD232.1b	13		1	
160323	15		1	
NKD214.9e	17		1	
130780	17		1	
173159	20		1	
148346	32		1	
NKD232.3d	33		1	
NKD219.1c	11			1
NKD217.1f	12			1
NKD221.1e	17			1
NKD208.1d	21			1
NKD214.1e	33			1
NKD186.10d	59			1
NKD206.1g	86			1
NKD190.8e	91			1
NKD191.6e	130			1

[0402]

표 7

NKD191.1g	Ab7326	7 일	혈청
NKD202.3g	Ab7326	7 일	혈청
NKD201.6f	Ab7326	7 일	혈청
NKD219.1d	Ab7326	7 일	혈청
NKD203.2e	Ab7326	중점	혈청
NKD193.7a	Ab7326	중점	혈청
NKD192.9d	Ab7326	중점	혈청
NKD210.1d	Ab7326	중점	혈청
NKD211.1f	Ab7326	중점	혈청
NKD206.2c	Ab7326	중점	혈청
NKD202.1j	Ab7326 + 셀루메티닙	7 일	혈청
NKD203.3e	Ab7326 + 셀루메티닙	7 일	혈청
NKD203.5i	Ab7326 + 셀루메티닙	7 일	혈청
NKD209.2e	Ab7326 + 셀루메티닙	7 일	혈청
NKD186.10d	Ab7326 + 셀루메티닙	중점	혈청
NKD208.1d	Ab7326 + 셀루메티닙	중점	혈청
NKD214.1e	Ab7326 + 셀루메티닙	중점	혈청
NKD221.1e	Ab7326 + 셀루메티닙	중점	혈청
NKD219.1c	Ab7326 + 셀루메티닙	중점	혈청
NKD217.1f	Ab7326 + 셀루메티닙	중점	혈청

[0403]

[0404]

실험 마우스의 희생 후, 육안 병리학의 조사는 다양한 실험 조건 사이에 종양 부담 또는 표현형의 임의의 차이를 보여주지 않았다. 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 종양 조직에 대해 면역조직화학(IHC) 분석을 수행하여 종양 미세환경을 조사함으로써, 알파-SMA 양성 및 포도플라닌 양성 종양 관련 섬유모세포 수, 또는 콜라겐 I 및 III의 질 또는 양의 임의의 변화를 평가하였다(피크로시리우스 레드 염색에 의해 측정됨). HALO 디지털 소프트웨어를 사용하여 염색을 점수화하였으나, 시험된 방법들 중 임의의 방법에 의한 이러한 매개변수들 중 임의의 매개변수에 대한 유의미한 영향은 없었다(도 8).

[0405]

결과

[0406]

요약하면, 본원에 제시된 결과는 MAPK/ERK 경로 유전자가 KPC 마우스 모델에서 Ab7326에 노출될 때 상향조절됨을 입증한다. 더욱이, Ab7326 mIgG1은 셀루메티닙과의 조합으로 KPC 마우스에게 안전하게 제공될 수 있다. 마우스를 Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합으로 치료하였을 때 셀루메티닙만을 사용한 치료에 비해 생존의 유의미한 개선이 관찰되었다(도 7, 표 5, 및 표 6의 개별 마우스에 대한 데이터 참조). 더욱이, Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합으로 치료한 여러 마우스에서 종양 수축이 관찰되었고, 이러한 마우스에서 반응이 연장되었다. 이것은 Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙의 조합이 췌장암에 대한 매우 유망한 치료를 대표함을 시사한다.

[0407]

실시예 5: Ab7326 mIgG1과 셀루메티닙 또는 UCB-554 MEK 억제제의 조합을 사용한 KPC 마우스의 치료는 단일 작용제를 사용한 치료에 비해 더 느린 종양 성장 및 연장된 생존을 유발한다.

[0408]

실시예 3에서 Ab7326과 셀루메티닙의 조합을 사용하여 관찰한 연장된 생존이 다른 MEK 억제제에도 적용될 수 있는지를 확인하고, 각각의 코호트에서 KPC 마우스의 수를 증가시켜 연구의 견고성을 더 증가시키기 위해, MEK 억제제 셀루메티닙 또는 MEK 억제제 UCB-554와의 조합으로 Ab7326을 비교하는 연구를 수행하였다. 췌장 종양이 확인된 KPC 마우스를 재료 및 방법에 설명된 바와 같이 확립하고, 표 8에 표시된 바와 같이 치료를 위해 코호트에 등록하고, 조음과 및 윤리적 생존 중점으로 종양 성장에 대해 모니터링하였다.

표 8

치료	용량	일정	n =	중앙값 생존기간
비히클	125 μ l p.o.	2 일마다	10	12 일
Ab7326 mIgG1	30 mg/kg s.c.	매주 2 회	10	9.5 일
셀루메티닙	25 mg/kg p.o.	b.i.d.	9	22 일
Ab7326 mIgG1 + 셀루메티닙	30 mg/kg s.c. 25 mg/kg p.o.	매주 2 회 b.i.d.	10	29.5 일
UCB-554	10 mg/kg p.o.	2 일마다	10	21 일
Ab7326 mIgG1 + UCB-554	30 mg/kg s.c. 10 mg/kg p.o.	매주 2 회 2 일마다	11	32 일

[0409]

[0410]

MEK 억제제 UCB-554를 사용한 치료는 비히클 단독 대조군 또는 Ab7326 치료에 비해 KPC 마우스의 적당한 생존 증가를 이끌어내었다(도 9a 및 표 8 중앙값 생존기간). 그러나, Ab7326과 UCB-554를 사용한 조합 치료는 UCB-554 단독에 비해 KPC 마우스의 더 개선된 생존을 이끌어내었다(도 9a 및 표 8 중앙값 생존기간). 콕스의 비례적 위험 모델을 생존 데이터에 피팅하였고 다양한 치료군을 비교하기 위해 위험 비(HR)를 추정하였다(표 9). Ab7326 + UCB-554 대 비히클 대조군에 대한 위험 비(HR = 3.57, p = 0.005) 또는 Ab7326 단독에 대한 위험 비(HR = 4.38, p = 0.001)는 조합에 의한 통계적으로 유의미한 생존 개선을 입증하였다. Ab7326 + UCB-554 대 UCB-554 단독에 대한 위험 비도 1보다 더 컸는데(HR = 1.75), 이는 MEK 억제 단독보다 조합에 의한 생존을 개선을 시사하지만, 통계적 유의성에는 도달하지 못하였다(p = 0.211).

표 9

Ab7326 과 UCB-554 조합으로 치료한 KPC 마우스에 대한 생존 통계자료의 요약

비교	위험 비	P 값
비히클 / Ab7326	0.82	0.656
비히클 / UCB-554	2.04	0.120
비히클 / Ab7326 + UCB-554	3.57	0.005
Ab7326 / UCB-554	2.50	0.043
Ab7326 / Ab7326 + UCB-554	4.38	0.001
UCB-554 / Ab7326 + UCB-554	1.75	0.211

[0411]

[0412]

초음파에 의한 3D 종양 영상화를 이용하여 시간 경과에 따라 대조군 또는 치료된 KPC 마우스의 췌장 종양 부피를 측정하였다. 치료 시작 후 7일째 날의 종양 부피의 비교는 생존 데이터와 일치하게 종양 부피가 비히클 또는 Ab7326 치료 단독에 비해 UCB-554 치료군에서 감소됨을 보여주었다(도 9b). 나아가, Ab7326 + UCB-554의 조합은 UCB-554 단독에 비해 7일째 날의 종양 부피의 통계적으로 유의미한 감소를 가졌다(p = 0.040).

[0413]

윤리적 종점까지 이 코호트에서 마우스의 시간 경과에 따른 종양 부피의 측정은 Ab7326과 UCB-554의 조합 치료가 마우스의 서브세트에서 비히클 대조군에 비해 수축 또는 감소된 종양 성장을 이끌어냄을 표시하였다(도 9c).

[0414]

더 큰 수의 동물을 포함시켜 분석의 견고성을 증가시키기 위해 실시예 3(표 4)에 표시된 셀루메티닙 MEK 억제제

연구에서 수집된 KPC 마우스 생존 데이터를 실시예 5 코호트로부터의 데이터(표 8)와 조합하였다. 도 10a 및 표 10에 나타난 바와 같이, Ab7326과 셀루메티닙의 조합은 비히클 단독(HR = 5.16, $p < 0.001$) 또는 Ab7326 치료(HR = 3.82, $p < 0.001$)에 비해 KPC 마우스의 생존을 유의미하게 증가시켰다. 더욱이, Ab7326과 셀루메티닙의 조합은 2.92의 위험 비($p = 0.006$)로, 셀루메티닙 단독을 사용한 치료에 비해 생존을 유의미하게 증가시켰는데, 이는 이 체장암 모델에서 그렐린-1 억제와 MEK 경로 억제의 조합의 유의미한 유익한 효과가 있음을 표시한다.

표 10

Ab7326 과 셀루메티닙 조합으로 치료한 KPC 마우스에 대한 생존 통계자료의 요약

비교	위험 비	P 값
비히클 / Ab7326	1.35	0.450
비히클 / 셀루메티닙	1.77	0.166
비히클 / Ab7326 + 셀루메티닙	5.16	0.000
Ab7326 / 셀루메티닙	1.31	0.427
Ab7326 / Ab7326 + 셀루메티닙	3.82	0.000
셀루메티닙 / Ab7326 + 셀루메티닙	2.92	0.006

[0415]

[0416]

치료 시작 후 7일째 날의 종양 부피의 비교는 생존 데이터와 일치하게 평균 종양 부피가 비히클 또는 Ab7326 치료 단독에 비해 셀루메티닙 및 셀루메티닙 + Ab7326 치료군에서 감소됨을 보여주었다(도 10b).

[0417]

윤리적 종점까지 이 코호트에서 마우스의 시간 경과에 따른 종양 부피의 측정은 Ab7326과 셀루메티닙의 조합 치료가 마우스의 서브세트에서 비히클 대조군에 비해 수축 또는 감소된 종양 성장을 이끌어냄을 표시하였다(도 10c).

[0418]

결론적으로, 이 데이터는 셀루메티닙 또는 UCB-554와 같은 MEK 억제제와의 조합으로 투여된 항-그렐린-1 항체 Ab7326이 체장암의 KPC 뮌 모델에서 개별 작용제를 사용한 치료에 비해 종양 성장을 감소시키고 생존을 증가시킨다는 것을 입증한다. 이것은 그렐린-1과 MEK 약리학적 경로를 동시에 표적화하는 것이 체장암의 치료에 있어서 상가적 또는 상승작용적 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

[0419]

측면

[0420]

1. 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 항-GREM1 길항제로서, 이 방법이 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

[0421]

2. 제1 측면에 있어서, 암이 고형 암인 항-GREM1 길항제.

[0422]

3. 제1 측면 또는 제2 측면에 있어서, 암이 간질 GREM1 과발현을 가진 것인 항-GREM1 길항제.

[0423]

4. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절과 관련된 암인 항-GREM1 길항제.

[0424]

5. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 항-GREM1 길항제에 노출된 후에 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 이상조절을 나타내는 것인 항-GREM1 길항제.

[0425]

6. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 Ras 유전자, 임의로 KRAS, NRAS 및/또는 HRAS의 돌연변이를 함유하는 것인 항-GREM1 길항제.

[0426]

7. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 Raf 유전자, 임의로 ARAF, BRAF 및/또는 CRAF의 돌연변이를 함유하는 것인 항-GREM1 길항제.

[0427]

8. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 치료에 불충분하게

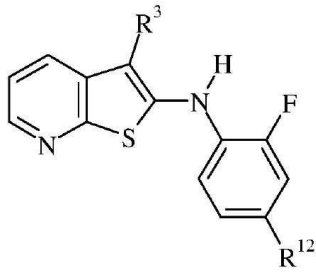
반응하거나, 반응하지 않거나 난치성인 암인 항-GREM1 길항제.

- [0428] 9. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 결장직장암, 다발성 골수종, 췌장암, 방광암, 유방암, 폐암, 위암, 십이지장암, 식도암, 두경부암, 전립선암, 신경교종, 자궁내막암, 간암, 비장암, 골 상주 암, 흑색종 및 골육종으로부터 선택되는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0429] 10. 제9 측면에 있어서, 암이 췌장암인 항-GREM1 길항제.
- [0430] 11. 제10 측면에 있어서, 췌장암이 외분비 췌장암인 항-GREM1 길항제.
- [0431] 12. 제10 측면 또는 제11 측면에 있어서, 췌장암이 췌장관 선암종(PDAC)인 항-GREM1 길항제.
- [0432] 13. 제9 측면에 있어서, 암이 다발성 골수종 또는 결장직장암; 임의로 KRAS/BRAF 돌연변이된 결장직장암인 항-GREM1 길항제.
- [0433] 14. 제9 측면에 있어서, 암이 폐암이고; 임의로 암이 비-소세포 폐암(NSCLC)인 항-GREM1 길항제.
- [0434] 15. 제9 측면에 있어서, 암이 흑색종; 임의로 BRAF 돌연변이된 흑색종인 항-GREM1 길항제.
- [0435] 16. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 상피 GREM1 과발현을 가진 것인 항-GREM1 길항제.
- [0436] 17. 제16 측면에 있어서, 암이 GREM1-유발 암인 항-GREM1 길항제.
- [0437] 18. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 파종성 암인 항-GREM1 길항제.
- [0438] 19. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 암이 확립된 암인 항-GREM1 길항제.
- [0439] 20. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 펩티드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스 RNA, 작은 간섭 RNA(siRNA), 작은 분자 억제제 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)인 항-GREM1 길항제.
- [0440] 21. 제20 측면에 있어서, Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175로부터 선택된 적어도 하나의 잔기를 포함하는 그램린-1의 에피토프에 결합하는 항체인 항-GREM1 길항제로서, 잔기 넘버링이 서열번호 1에 따른 것인 항-GREM1 길항제.
- [0441] 22. 제21 측면에 있어서, 항체가 Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175를 모두 포함하는 에피토프에 결합하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0442] 23. 제21 측면 또는 제22 측면에 있어서, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 및 Gln175가 동일한 그램린-1 단량체에 위치하고 Ile131이 제2 그램린-1 단량체에 위치하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0443] 24. 제20 측면에 있어서, 서열번호 10 또는 12의 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 서열 및/또는 서열번호 11 또는 13의 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 서열을 포함하는 항-그램린-1 항체인 항-GREM1 길항제.
- [0444] 25. 제20 측면에 있어서, 서열번호 3, 4, 5 및 6로부터 선택된 적어도 하나의 HCDR 서열 및/또는 서열번호 7, 8 및 9로부터 선택된 적어도 하나의 LCDR 서열을 포함하는 항-그램린-1 항체인 항-GREM1 길항제.
- [0445] 26. 제25 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 6의 HCDR3 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0446] 27. 제25 측면 또는 제26 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 4/5/6 또는 서열번호 3/5/6으로부터 선택된 HCDR1/HCDR2/HCDR3 서열 조합 및/또는 서열번호 7/8/9로부터 선택된 LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열 조합을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0447] 28. 제25 측면 내지 제27 측면 중 어느 한 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 4/5/6/7/8/9 또는 서열번호 3/5/6/7/8/9의 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열 조합을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0448] 29. 제25 측면 내지 제28 측면 중 어느 한 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 10 또는 12의 중쇄 가변 영역(HCVR) 서열 및/또는 서열번호 11 또는 13의 경쇄 가변 영역(LCVR) 서열, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0449] 30. 제29 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 10/11 또는 12/13의 HCVR 및 LCVR 서열 쌍, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

- [0450] 31. 제30 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 4/5/6/7/8/9 또는 서열번호 3/5/6/7/8/9로 구성된 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열을 포함하고, HCVR 및 LCVR의 나머지가 각각 서열번호 10, 11, 12 및/또는 13과 적어도 95% 동일성을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0451] 32. 제29 측면 내지 제31 측면 중 어느 한 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 14, 16, 18, 22, 28, 30, 32 또는 34의 중쇄 및/또는 서열번호 15, 17, 19, 23, 29, 31, 33 또는 35의 경쇄, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0452] 33. 제32 측면에 있어서, 항-그램린-1 항체가 서열번호 14/15, 16/17, 18/19, 22/23, 28/29 또는 30/31, 32/33, 34/35의 중쇄와 경쇄 쌍, 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0453] 34. 제33 측면에 있어서, 항체의 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 서열이 서열번호 4/5/6/7/8/9 또는 서열번호 3/5/6/7/8/9로 구성되고, 중쇄 및 경쇄의 나머지가 각각 서열번호 14, 15, 16 및/또는 17과 적어도 95% 동일성을 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0454] 35. 제20 측면에 있어서, 제22 측면 내지 제32 측면 중 어느 한 측면에 정의된 항체와 그램린-1에의 결합에 대해 경쟁하는 항체인 항-GREM1 길항제.
- [0455] 36. 제20 측면에 있어서, 제22 측면 내지 제32 측면 중 어느 한 측면에 정의된 항체와 동일한 그램린-1의 에피토프에 결합하는 항체인 항-GREM1 길항제.
- [0456] 37. 제20 측면 내지 제36 측면 중 어느 한 측면에 있어서, 길항제 항체가 키메라, 인간 또는 인간화 항체인 항-GREM1 길항제.
- [0457] 38. 제20 측면 내지 제37 측면 중 어느 한 측면에 있어서, 길항제 항체가 Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')₂, Fv, 단일 도메인 항체 또는 scFv인 항-GREM1 길항제.
- [0458] 39. 제20 측면에 있어서, 제21 측면 내지 제38 측면 중 어느 한 측면에 정의된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 운반하는 발현 벡터인 항-GREM1 길항제.
- [0459] 40. 제20 측면 내지 제38 측면 중 어느 한 측면에 있어서, 길항제 항체가 약학적으로 허용되는 보조제 및/또는 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물에 포함되는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0460] 41. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 Mapk1, Nras, Kras 및/또는 Myc 신호전달을 하향조절하는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0461] 42. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 MEK 억제제; 임의로 알로스테릭 MEK 억제제인 항-GREM1 길항제.
- [0462] 43. 제42 측면에 있어서, MEK 억제제가 MEK1 및/또는 MEK2 억제제인 항-GREM1 길항제.
- [0463] 44. 제42 측면 또는 제43 측면에 있어서, MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244), 트라메티닙(GSK-1120212), 코비메티닙(GDC-0973), 비니메티닙(MEK162), CI-1040(PD184352), 미르다메티닙(PD0325901), TAK733, 레파메티닙(RDEA119/Bay 86-9766), RO-5126766, RO5068760, 피마세르티닙(AS703026), AZD8330, GDC-0623, RO-4987655, WX-554(UCB-554), HL-085, ARRY-300, ClnQ-03, G-573, PD184161, PD318088, PD98059, U0126 또는 SL327인 항-GREM1 길항제.
- [0464] 45. 제42 측면에 있어서, MEK 억제제가
- [0465] (a) N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-(모르폴린-4-일카르보닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- [0466] (b) N-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-[(4-메틸피페라진-1-일)카르보닐]티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- [0467] (c) 2-[[2-(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일](피롤리딘-1-일)메탄;
- [0468] (d) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}피페리딘-4-일)-카르바미드 *tert*-부틸 에스테르;
- [0469] (e) 2-[[2-(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일]카르복실산 (4-아미노피페리딘-1-일)아미드 디하이드로-클로라이드;
- [0470] (f) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}아제티딘-3-일메틸)-카르바미드

tert-부틸 에스테르;

- [0471] (g) [3-((아미노메틸)아제티딘-1-일)]-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0472] (h) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐})-(3*R*)-피롤리딘-3-일)카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0473] (i) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐})-(3*S*)-피롤리딘-3-일)카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0474] (j) (1-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}아제티딘-3-일)-카르바산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0475] (k) [(3*R*)-3-아미노피롤리딘-1-일]-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0476] (l) [(3*S*)-3-아미노피롤리딘-1-일]-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0477] (m) (3-아미노아제티딘-1-일)-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-메타논;
- [0478] (n) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-(3-하이드록시아제티딘-1-일)-메타논;
- [0479] (o) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*R*)-3-하이드록시피롤리딘-1-일]-메타논;
- [0480] (p) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*S*)-3-하이드록시피롤리딘-1-일]-메타논;
- [0481] (q) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[2-(하이드록시메틸)-피페리딘-1-일]-메타논;
- [0482] (r) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(3*S*)-3-(하이드록시메틸)-모르폴린-4-일]-메타논;
- [0483] (s) 4-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-카르보닐}-(3*R*)-3-(하이드록시메틸)피페라진-1-카르복실산 *tert*-부틸 에스테르;
- [0484] (t) 2-[4-{2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}카르보닐)피페라진-1-일]에탄올;
- [0485] (u) 3-((1,4-디아제판-1-일카르보닐)-*N*-(2-플루오로-4-요오도페닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민);
- [0486] (v) *N*-(2-플루오로-4-요오도페닐)-3-(피페라진-1-일카르보닐)티에노[2,3-*b*]피리딘-2-아민;
- [0487] (w) 에틸 [4-({2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}카르보닐)-피페라진-1-일]아세트이트;
- [0488] (x) [4-({2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}카르보닐)피페라진-1-일]아세트산;
- [0489] (y) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(2*R*)-2-(메톡시메틸)-피롤리딘-1-일]-메톤; 및
- [0490] (z) {2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]티에노[2,3-*b*]피리딘-3-일}-[(2*R*)-2-(하이드록시메틸)-피페라진-1-일]-메타논
- [0491] 으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 항-GREM1 길항제.
- [0492] 46. 제42 측면에 있어서, MEK 억제제가 화학식 (II)로 표시되는 것, 및 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 및 *N*-산화물인 항-GREM1 길항제:



(II)

[0493]

[0494]

[0495]

[0496]

[0497]

상기 식에서,

R^{12} 는 할로젠을 나타내고;

R^3 은 $CONR^bR^c$ 를 나타내고;

R^b 와 R^c 는 이들 둘 다에 부착된 질소 원자와 함께 아제티딘-1-일, 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 피페라진-1-일, 호모피페리딘-1-일, 호모-모르폴린-4-일 또는 호모피페라진-1-일을 나타내며, 이 기들 중 임의의 기는 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 하이드록시, 하이드록시(C_{1-6})알킬, 아미노-(C_{1-6})알킬, (아미노)(하이드록시)(C_{1-6})알킬, 할로젠, 옥소, C_{2-6} 알킬카르보닐, 카르복시, C_{2-6} 알콕시카르보닐, 디(C_{1-6})알킬하이드라지닐카르보닐, 아미노, C_{1-6} 알킬아미노, 디(C_{1-6})알킬-아미노, C_{2-6} 알킬카르보닐아미노, 아미노카르보닐아미노, 아미노카르보닐, C_{1-6} 알킬아미노카르보닐, 디(C_{1-6})알킬아미노카르보닐, 아미노설포닐, C_{1-6} 알킬설포닐, C_{1-6} 알킬아미노카르보닐 (C_{1-6})알킬, C_{1-6} 알콕시(C_{1-6})알킬, 카르복시(C_{1-6})알킬, C_{2-6} 알콕시카르보닐 (C_{1-6})알킬, C_{2-6} 알콕시카르보닐아미노 및 C_{2-6} 알콕시카르보닐아미노-(C_{1-6})알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환될 수 있다.

[0498]

[0499]

[0500]

[0501]

[0502]

[0503]

[0504]

[0505]

[0506]

[0507]

[0508]

[0509]

[0510]

47. 제46항에 있어서, R^{12} 가 브로모 또는 요오드를 나타내는 것인 항-GREM1 길항제.

48. 제44 측면에 있어서, MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244)인 항-GREM1 길항제.

49. 제44 측면에 있어서, MEK 억제제가 트라메티닙(GSK-1120212)인 항-GREM1 길항제.

50. 제44 측면에 있어서, MEK 억제제가 WX-554(UCB-554)인 항-GREM1 길항제.

51. 제44 측면에 있어서, MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244)이고, 암이 췌장암; 임의로 PDAC인 항-GREM1 길항제.

52. 제44 측면에 있어서, MEK 억제제가 트라메티닙(GSK-1120212)이고, 암이 췌장암; 임의로 PDAC인 항-GREM1 길항제.

53. 제44 측면에 있어서, MEK 억제제가 WX-554(UCB-554)이고, 암이 췌장암; 임의로 PDAC인 항-GREM1 길항제.

54. 제1 측면 내지 제41 측면 중 어느 한 측면에 있어서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 ERK 억제제인 항-GREM1 길항제.

55. 제54 측면에 있어서, ERK 억제제가 울릭세르티닙, 테무테르킵, JSI-1187, 라복세르티닙, ASN007 또는 MK-8353인 항-GREM1 길항제.

56. 제54 측면 또는 제55 측면에 있어서, ERK 억제제가 울릭세르티닙인 항-GREM1 길항제.

57. 제56 측면에 있어서, ERK 억제제가 울릭세르티닙이고, 암이 췌장암; 임의로 PDAC인 항-GREM1 길항제.

58. 상기 측면들 중 어느 한 측면에 있어서, 방법이 추가 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 항-GREM1 길항제.

59. 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제로서, 이 방법이 항-GREM1 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.

- [0511] 60. 제59 측면에 있어서, 상기 암, 상기 길항제 및/또는 상기 방법이 제1 측면 내지 제58 측면 중 어느 한 측면에 정의된 바와 같은 것인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0512] 61. 제59 측면 또는 제60 측면에 있어서, MEK 억제제인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0513] 62. 제61 측면에 있어서, 상기 MEK 억제제가 셀루메티닙(AZD6244)인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0514] 63. 제61 측면에 있어서, 상기 MEK 억제제가 트라메티닙(GSK-1120212)인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0515] 64. 제61 측면에 있어서, 상기 MEK 억제제가 WX-554(UCB-554)인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0516] 65. 제59 측면 또는 제60 측면에 있어서, ERK 억제제인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0517] 66. 제65 측면에 있어서, 상기 ERK 억제제가 울릭세르티닙인 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제.
- [0518] 67. 치료 유효량의 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제와의 조합으로 치료 유효량의 항-GREM1 길항제를, 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.
- [0519] 68. 제67 측면에 있어서, 상기 암, 상기 길항제 및/또는 상기 방법이 제1 측면 내지 제66 측면 중 어느 한 측면에 정의된 바와 같은 것인 방법.
- [0520] 69. 항-GREM1 길항제 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 포함하는 조성물 또는 키트.
- [0521] 70. 제69 측면에 있어서, 항-GREM1 길항제가 제20 측면 내지 제39 측면 중 어느 한 측면에 정의된 바와 같은 것인 조성물 또는 키트.
- [0522] 71. 제69 측면 또는 제70 측면에 있어서, Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제가 제41 측면 내지 제57 측면 중 어느 한 측면에 정의된 바와 같은 것인 조성물 또는 키트.
- [0523] 72. 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법으로서, 상기 환자에서 GREM1의 간질 발현, GREM1의 상피 발현 및/또는 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함하는 방법.
- [0524] 73. 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법으로서, 상기 환자에서 GREM1의 간질 발현 및/또는 GREM1의 상피 발현을 측정하고, 상기 환자가 RAS 유전자 또는 RAF 유전자의 돌연변이를 갖는지를 결정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함하는 방법.
- [0525] 74. 암을 갖거나 가진 것으로 의심되거나 암을 발생시킬 위험이 있는 환자가 GREM1 길항제와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 억제제를 사용한 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 방법으로서, 항-GREM1 길항제를 사용한 치료에 대한 반응으로 상기 환자에서 Ras-Raf-MEK-ERK 경로 신호전달을 측정하고, 이에 의해 상기 환자가 상기 조합 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하는 것을 포함하는 방법.

서열목록

서열번호 1(인간 그램린-1; Uniprot ID: O60565)

MSRTAYTVGALLLLLTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSR
NRGRGQGRGTAMPGEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNS
RTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKK
KRVTRVKQCRCISIDL

서열번호 2(N-말단 태그와 함께 결정학에 사용된 인간 절두된 그램린-1)

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPL
KQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTL
NCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

서열번호 3(Ab7326 HCDR1 조합된 카바트 & 초티아)

GYTFTDYMH

서열번호 4(Ab7326 HCDR1 카바트)

DYYMH

서열번호 5(Ab7326 HCDR2 카바트)

LVDPEDGETIYAEKFQG

서열번호 6(Ab7326 HCDR3 카바트)

DARGSGSYYPNHFY

서열번호 7(Ab7326 LCDR1 카바트)

KSSQSVLYSSNNKNYLA

서열번호 8(Ab7326 LCDR2 카바트)

WASTRES

서열번호 9(Ab7326 LCDR3 카바트)

QYYDTPT

서열번호 10(Ab7326 중쇄 가변 영역 변이체 1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGQGLTVTVSS

서열번호 11(Ab7326 경쇄 가변 영역 변이체 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAQYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQYYDTPTFGQGTRLEIK

서열번호 12(Ab7326 중쇄 가변 영역 변이체 2)

[0526]

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGGQTLVTVSS

서열번호 13(Ab7326 경쇄 가변 영역 변이체 2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPFTFGQGRLEIK

서열번호 14(마우스 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 1)

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGGQTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVT
WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVHPASSTKVDKKI
VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWF
VDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEK
TISKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN
YKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSP
GK

서열번호 15(마우스 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPFTFGQGRLEIKR
TDAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWT
DQDSKSDSTYSMSSTLTITLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSFNRNEC

서열번호 16(인간 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHCTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

서열번호 17(인간 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPFTFGQGRLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKSDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열번호 18(Fab 중쇄 변이체 1)

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN

[0527]

HFDYWGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC

서열번호 19(Fab 경쇄 변이체 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTREIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

서열번호 20(N-말단 태그 없이 결정학에 사용된 인간 절두된 그래핀-1)

AMPGEEVLESSQEALHVTTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGYQC
NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCI
SIDLD

서열번호 21(아미노산 1 내지 21의 신호 펩티드를 결여하는 서열번호 1의 성숙
그래핀-1 서열)

KKKGSQGAIPPDKAQHNDSEQTQSPQPGSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQE
ALHVTTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGYQCNSFYIPRHIRKEEG
SFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD

서열번호 22(인간 IgG4P 중쇄 변이체 1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISKVSGYTFDTYYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFKQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
LPSSIEKTIKAKQPPEPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSLGK

서열번호 23(인간 IgG4P 경쇄 변이체 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTREIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

서열번호 24(인간 IgG1 중쇄 DNA 변이체 1)

caagtgaactggagggaacccggggccgaagtgaagccgagccactgtgaagatctctgcaaaagtgtccggctacacc
ttcaccgactattacatgcactgggtccagcagggcacctgggaagggccttgagtgatgggtctgtcgalcccaggacggc
gaaactatctacggcgaaggtccagggtcgcgtcaccatcaccgacacactccaccgacaccgcgtacatggagctgtcca
gcttgagggtccgaggacacagccgtgtactactgcggcagcggatgctcggggaagcggcagctactacccgaaccactcgaact
actggggacagggcactctcgtgactgtctcgaagcgtctctacaaagggcccccctcgtgtcccgctcgtccatcatcgaagtct

[0528]

accaggaggagggactgcggctcgggtgctcgtgaaggactacttccggaggccggtgacctgtcgtggaacagcggagc
cctgaccagcgggggtgcacaccttccggccgtctgagtcacagcggcccttactccctgtcatcagtggtgactgtcccgccag
ctcattgggaacccaacacatctgcaatgtgaatcacaaacctagcaacaccaaggttgacaagaaagtgcagccaaatcg
tgtgacaagactcacactgtccggcgtgccggcaccgaactgtggagggtccagcgtcttctgttccctccaaagccgaa
agacacgctgatgatctcccgcaccccgagggtcacttgcgtggtcgtggacgtgtcacatgaggaccagaggtgaaagtcaat
tggtacgtggtggtcgtgaagtcacaatgccaaaactaagcccagagaagaacagtacaattgacctaccgctcgtgtccg
tgtcacggtgtgtcatcaggattggctgaacgggaaggatacaagtgcaaggtgtccaaagggcgtgctccggcaccgatcg
agaaaactatctccaaagcgaagggacagcctagggaacctcaagtctacacgtgccaccatcacgggatgaactgactaaga
atcaagctcactgacttgtgtggaagggttttaccctagcgacattgccgtggagtgggaatcaacggccagccagagaac
aactacaagactaccctccagtgctcgaactcggatggatgttcttcttactcgaagctcaccgtggataagtcgggtggcag
cagggaaacgtgttctcctgctcgggtgatgcatgaagccctccataaccataaccaaaagtcgtgtccctgtcggcggaag
g

서열번호 25(인간 IgG1 경쇄 DNA 변이체 1)

gcatttgtatgaccagtcctcccgattcgttgcgggtgtccctgggagaacgggccaccatfaactgcaagagctcacagtcctg
cctgtattcatcgacaacaagaattacctgcgatgtatcagcagaagcctggacagcctccaaagctgctcatctactgggctag
caccgcgaatccgggggtgcccgtatgattctccggatcgggttcgggactgacttactctgactatcaactactgcaagccg
aggatgtcgggtgtacttctgacagactacgacaccccgaccttggacaagggcaccagactggagattaaagctgacgtg
ggcgctcctcctggttcatcttccacccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgtcgtgtgctgctgaacaact
tctaccccgcgaggccaaggtgcagtggaagggtggacaacgccctgcagtcgggaactccaggaatccgtcaccgagca
ggactccaaggacagcacctactcctgtctccaccccgacctgtccaaaggccactacgagaagcacaaggtgtacgcctg
cgaagtgaaccaccaggcctgtccagcccggtgaccaagtccttcaaccggggcgtgtgc

서열번호 26(인간 IgG4P 중쇄 DNA 변이체 1)

caagtgaactggtggaatccggggccgaagtgaagaaagcccgaggccactgtgaagatcttgcgaaggtgtccggctacacc
ttaccgactattacatgactgggtccagcaggcaccctgggaaggcccttgaagtggatgggtctggtcgtatcccgaggacggc
gaaactatctacggcggaaggttcaggggtgcgtcaccatcaccgccgacattccaccgacaccgctacatggagctgtcca
gcttgagggtccgagacacagccgtgtactactgcgccacggatgctcggggaagcggcagctactaccgaaccacttgcact
actggggacagggcactctcgtgactgtcgcgagcgttctacaagggccctccgtgttccctctggcccttgcctccggtcc
acctccgagctacccgctctggtgctgcctgtcaaggactacttcccgaggccggtgacagtgctcctggaactctggcgcct
gacctccggcgtgcacaccttccctgctgctgcagtcctccgacctgtactcctgtcctccgtcgtgacctgacctcctccag
cctgggcaccaagacctacacctgtaactgtgaccacaagccctccaacaccaaggttgacaagcgggtggaatctaagtacg
gccctccctgccccccctgccctgccccgaattctggcgacgttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctg
atgatctcccgacccccgaagtgtacctgctggtgggtgacgtgtccaggaagatcccgaggtccagttcaattgttacgtgg
acggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagccagagaggaacagttcaactccactaccgggtggtgtcctgctgacc
gtgctgcaccaggactggctgaacggcgaagagtagaagtgcaaggtgtccaaagggcctgcccctccagcagcgaagagac
catctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccag
gtgtcctgacctgtctggaagggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaacggccagcccgagaacaact
acaagaccacccccctgtgtgacagcgaagcgtcttcttctgtactctcggctgacctggacaagtcgggtggcagga
aggcaacgttctcctgctccgtgatgcagggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtcctgagcctgggcaag

서열번호 27(인간 IgG4P 경쇄 DNA 변이체 1)

gcatttgtatgaccagtcctcccgattcgttgcgggtgtccctgggagaacgggccaccatfaactgcaagagctcacagtcctg
cctgtattcatcgacaacaagaattacctgcgatgtatcagcagaagcctggacagcctccaaagctgctcatctactgggctag
caccgcgaatccgggggtgcccgtatgattctccggatcgggttcgggactgacttactctgactatcaactactgcaagccg

[0529]

aggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagctactacgacaccccgaccttggacaaggcaccagactggagattaagcgctacggt
ggccgctccctcgtgttcattctccaccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgctgtgtgcctgctgaacaact
tctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcggcaactcccaggaaatccgtcaccgagca
ggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctg
cgaagtgaccaccaggcgctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccggggcgagtg

서열번호 28(마우스 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKI
VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWF
VDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEK
TISKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN
YKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSP
GK

서열번호 29(마우스 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKR
TDAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWT
DQDSKSDSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRENC

서열번호 30(인간 전체 길이 IgG1 중쇄 변이체 1)

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKAAPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGK

서열번호 31(인간 전체 길이 IgG1 경쇄 변이체 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열번호 32(Fab 중쇄 변이체 2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDP
EDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPN
HFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK

[0530]

[illegible]

aaaaaacatttacttccatagctaaataatcttatttggaggaatgtacttttcttaaaaaaaaaaaagcctgtctgtactctag
 accctttggcttagaaggtaggcacactacatagaacagaaagtctgtccaaatfaaaactgaaaccacagttgactaatfttga
 atttatagctctgtcttggcttctgcgtagtatttcaatggcttcaattagaaaatgaaaccatagcattccatagagaacag
 glaaaaagtcaggggacatttggagtttccaagaaaaagaagacaagtcttaggaagctctctaggaaggaaatfgccaca
 ctgagagttagacatccaaaggatagcaattggctcttctgtctatgggcactgtgaaagcattttaaatagcgaagaatggtagc
 tctgtaaatcaatgaggttcataataatcatgcaattaccaaatfttataagcactgtccctgtgccaggcactgagggtgaagtgatg
 aataagccctcatcaactgtcagactagatatttactcaataacagatgtgaaatgccaaagaaaggttgatataaagaag
 ccttaagtgtgttcagagaataaaatgcattttccgtagatgtttatggaatcggccttatagggtaaactgtcctatgcagtga
 catacattccagtttagtctcagattggcctctgtgatgacaaactcagagggtcctgtctaggagggtgaaatgtctggaggc
 cattttcaggaggtatggaggaagactggggcatagccctggggccatccatgactcctctctgaaatggggagcaactgaa
 ttgtgttttattatgtcttgcacactgaataccagaaatcgtgaaacctctcaattcacatataattttagaccaaggagaag
 ctccctgagaaatggccacactgtctatctctagctctggaataatcagtcctgtattataactgggcgtttctcataagtgtctttttt
 tctttttcttttataactttaaagttctgggatacatgtgcagaatgtgcaggttgttacataggtatacacgtgccatgggtgttct
 gcacccatcaacccatcatcatcattaggtatttctctaatgtaccccttccctagccccccacccctcgacaggccccagtgtt
 atgttccccctctgtgtccatgtgtctcattgttcaactcccacttatgagttagagcatgcgggtgttgggttctgtctgtttagt
 tgcctgagaatgatgttttggcttcatccacgtccctgcaaaggacatgaactcctcttttatggctgcatagtattccatggtgtat
 atgtgccacattgtcttatccagcttatcattgatgacactgggtggctccaagtcttctattatgactagtactgcgataaacat
 gtgtatgtgtctttatagaaatgattataactctttaggtctataccagtaataaggattcctgggtcaaatggtatttctgttctag
 atccctggaggaaatggccacactgtctccacaacgggtgaactaattacactccaccaacaagtgtaaaagcatttcttctccaca
 tctctccaacatctgtgttctctgactcttaataagcggcacttaactggcgtgaaatggtatctcattgtgtgtttagttgtcattct
 ctaatgaccaccgatgatgagcttttctcatatgttctgtgccccataaatgtcttcttttgagaatgtctgttcatatcttggccac
 tttttaggggtgtgttcttttctgttaatttgtttagtctctgtagattctgataattagcccttctcagatggatagactgcaaa
 aatttctccattctgtaggttgcctgttctactctgatgtgttcttcttccatgcagaagctgtttagtttaattagatccaattgtca
 gtttggcttgttggcattgttgggtgtttagtcatgaagcttggccatgcctatgtctgaattgtattccctgttcttcttagg
 attttatgggttaggtcttcaatttaagcttcaatccatctgaatttaattttagataaggtgtaaggaaagggtccagtcttctgt
 cgtatggctagccagtttcccaacgttatttattataatagggaatccttcccatgttcttggtaggttctcaagatcagacg
 gttgtatagatgtgtgttatttctgaggcctctgttctgttccattggctgtatattctgtttagaccagtaccgtgtgttgggtact
 gtgacctgtatgacagtttgaagtcaggtagcgtgatgttctgttcttctttaggtattgtcttggctatatgggtcttcttgggtctat
 atgaaatttaagtagtttttcatagacatctatagaacttccaccccaaatcaacagaatatacatttctcagtatcgcacacact
 tattctaaaatgaccacataattagaagtaaaacactctcagcaaatgcaaaaaacagaatcctaacagtctgtcagacccaggt
 gcaatcaaaatagaactcaggattaagaacttactgaaaccacacaactgcattgaaactgaacaacctgtcctgaatgacta
 ctgggttaataaacaataaagtcagaaataataggttcttgaagaataatgagaacaaagacacaatataccagaatctctggg
 acacagctaaagcagttgttagagggaattgatagcactaaatgccacaggagaagcgggacagatctaaaatcgacacc
 taatatcacaattaaaagaactagagaacaagagcaacaataatcaaaagctagcagaagacaagaataactaagatcagagc
 agaactgaaggagatagagacacaaaaacccctcaaaaaatcaatgaatccaggagctgttttttttttgaagaagattaatgaaa
 tagactgctagccaaactaataaaggagaaaaagagagaagaatcaaatagacaatagacacaataaaaagtataaaggggata
 tcaccactgatccacagaatacaaacatcacagagaatactataaacacctctacgcaataaactagaaaaatgggaagaa
 atggatatactctgaacgcatacacccctcccaagactaaaccaggaagaaagttgaatccctgaatagaccaatagcaagttctga
 aattgaggcagtaatttagtgcttaccacacaaaaaaagcccaaggaccagacagattcacagccgaagtctaccagaggtacaa
 agaggagctagtacattctctgaaactattccaacaatagaaaaagaaaggactcctccttaactatttttagaggccagcatc
 atcctgataccaaaacctggcagagacacaacataaaggaaattcaggccaatctcctgatgaactgtatgtgaaaaatctcaat
 aaaatactggcagcacatcaaaaagcttacctgcatgatcaagttggcttcatccctgggatgcaaggctgtgtcaacatacgcaa
 atcaataaacgtaataatcacatacagaaccaatgacaaaaacacatgattatctcaatagatgcagaaaaggccttcgataa
 aattcaacaccccttcaatgctaagaactctcaataaactaggattgatgaaacatactcaaaaataaagagttatttatgacaaac
 ccacagccagtatcactactgaatgggcaaaagctggaagcattcccttgaaaaccgccacaaggatgacttctctaccactccta

[0533]

[illegible]

ctctcttgggaatgaatggtcatggaagaggctcctctgagggcaagagacctgttttagtgcctgacatggaaaagtcctttt
aacctgtgcttgcatcctcttctcctcctcacaatccatctctttaaagtgatagtgactatgtcagctaatctctgtttgccaa
agggtcctaataatcacttaacatgatgcaaatgttttcatttttggaagacctccagactctgggagaggctggtgtgggcaa
ggacaagcaggatagtgagtgagaaaggagggtggagggtgaggccaaacaggtccagcaaaagtcagtagggacattg
cagaagcttgaaaggccaataaccagaacacaggctgatgctctgagaaagtctttcctagtattaacagaacccaagtgaacag
agggaagaaatgagatggcagaagtgtaactatggtccgttgcaatctgctcaaacctaacaccaactgaaaacataaatactga
ccactcctatgttcggaccacaaggaagttaactaaaccaaacctcctctgctttgtccctcaggtggaaaagagaggtagttta
gaactctctgcataggggtgggaatfaatcaaaaaccgcagaggctgaaatcctaatacctttctttatcgtggttatagtcagctc
atttcattccactatltccataatgcttctgagagccactaacttgattgataaagatcctgcctctgctgagtgacctgacagtagt
ctaagatgagagagtttagggactactctgttttagcaagagatattttgggggtctttttgttttaactattgtcaggagattgggctaa
agagaagcagcagagagtaaggaaataaaagggaattgcctctggctagagagtagttaagggttaatacctggtagagatgtaag
ggatagacccctctttttagtgcctcactgaggatctgaggggaccctgttaggagagcagatcatgatgtattagctgttcat
ctgctactgtgttgatggacataactattgtaactatcagttactggttaggcactgtcctctgattaaacttgccctactggcaatg
gctacttaggattgatcaaggccaaagtgcagggtgggtgaactttatgtactttggatttggttaacctgtttctcaagcctgag
gttttatatacaaacctcctgaatactcttttgccttctcagcctcctagccaaagcctatgtaatatggaaaacaacactgc
agacttgagattcagttgcccagatcaggctctggcattcagagaaccttgcactcagagaagctgtttttatttctgttttggatcc
agtgtctccccatcaacaactaaacaggagccattcaaggcgggagatattttaaaccaccaaaatgtgggtctgattttcaaac
tttaaacactactactgatgttctcagctagcgaatttgcacaaacacatagtggtgtgtttgtatatactgtatgacccacccca
aatctttgtattgtccacattctcaacaataaaagcacagagtgatttaattaaagcacacaaatgtaaggcagaattttgagggtgg
gagagaaagaaaaggaaagaagtgaaaatgtaaaacacaccaggaggagaaaatgacattcagaaccagcaaacactgaa
tttctctgtgttttaactctgccacaagaatgcaatttctgaacggagatgacttaagtggcagcagtaactcttttaggagctgt
accacagctctgcacataagtgcagatttggctcaagttaagagaatttctcaacactaactcactgggataatcagcagcgtaac
tacctaaagcatatcactagccaaagagggaatatctgttcttctactgtgctatattagactagtaaaatgtgtgtgtcttc
caactttcattgaaaatgccatatacatattttatctgagtcactgatgatgatatatttttattattatagtagaataattttta
tggcaagatattgtgtctgtgacatactatfaaaataatgccaaacaccaaatgaattttatgatgtacatttgtgtctggcatta
aaagaaaaaacacacactctggaagtctgtaagtgtttttgttactgtaggcttcaaaagtaagagtgaagtgaataatctgga
ggagaggataatttccactgtgtggaatgtgaatagttaaatgaaaagttaggttttaattgaattattactcaaatcctttgggtcac
tgtgatttcaagcatgttttcttttctctttatgacttctctgagttgggcaaaagaagaagctgacacaccgtatgtttagagctct
ttatctgtgtaggggaacaaaaatctgaccagctgaacatgtcttctgagtgatgcctgaatctttatttttaaatgaaatgttct
taaagggttaactttctaaagcaatattaaagaagactttaaattgtttttggaagacttacgatgatatacaaacgaatagcaga
taatatgactagttcacacataaagctctttaaggagaaaaatctaaaatgaaaagtggataaacagaacatttataagtatcagtt
aatgcctaaagagtgaagtagtttcttattgacattctcaagatatttaatatcaactgcattatgtattatgtctgttaaatcatttaaaa
cggcaaaagaattatagactatgaggtaccttctgtgttagggagatgaaaggggaggtgatagtctcataaaaactaatttggcttc
aagtttcatgaatctgtaactagaatttatttaccaccaataatgttctatatagcctttgctaaagagcaactaataaattaaacctatt
ctttctgtg

서열번호 37(인간 그래핀-1; 코딩 서열)

Atgagccgcacagcctacacgtggtggagccctgcttctccttggggaccctgctgccggctgctgaagggaagaaagaaagg
gtcccaagggtgcatccccccgcagacaagcccagcacaatgactcagagcagactcagtcgcccagcagcctggctcca
ggaaacggggggcgggccaaggcggggcactgccaatggcggggaggagggtgctggagtccagccaaggagccctgcat
gtgacggagcgaataactgaagcgagactgtgtgcaaaacccagccgttaagcagaccatccacagggaaggctgcaaca
gtcgcacatcatcaaccgtctgttacggccagtgcaactctttctacatccccagcacatccggaaggaggaagggttcttct
agtctgtccttctgcaagcccaagaattcactaccatgatgtgacactcaactgcctgaactacagccacctaccaagaag
aagagatcacacgtgtgaagcagtgctgtgcatatccatcatttgattaa

[0535]

참고문헌

Hingorani, S.R., L. Wang, A.S. Multani, C. Combs, T.B. Deramautd, R.H. Hruban, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469-83.

Kobayashi, Y., S. O. Lim and H. Yamaguchi. Oncogenic signaling pathways associated with immune evasion and resistance to immune checkpoint inhibitors in cancer. *Semin Cancer Biol*;2020;65:51-64.

Kozar, I., C. Margue, S. Rothengatter, et al. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*;2019;1871(2):313-322.

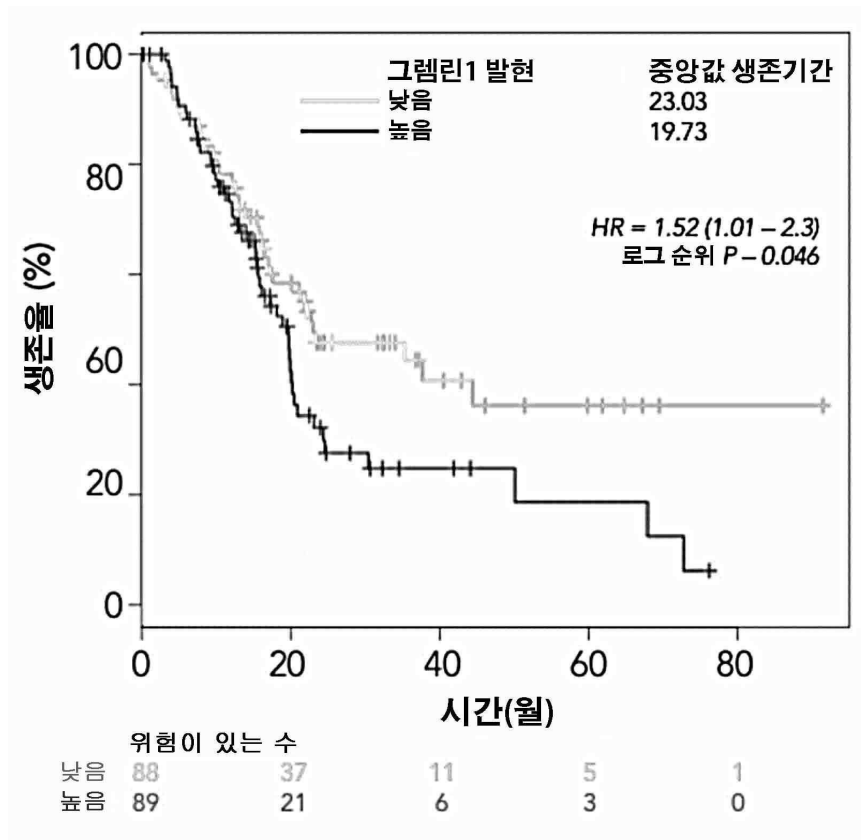
Martinelli, E., F. Morgillo, T. Troiani, et al. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer Treat Rev*;2017;53:61-69.

Yu, Y., L. Cheng, B. Yan, et al. Overexpression of Gremlin 1 by sonic hedgehog signaling promotes pancreatic cancer progression. *Int J Oncol*;2018;53(6):2445-2457).

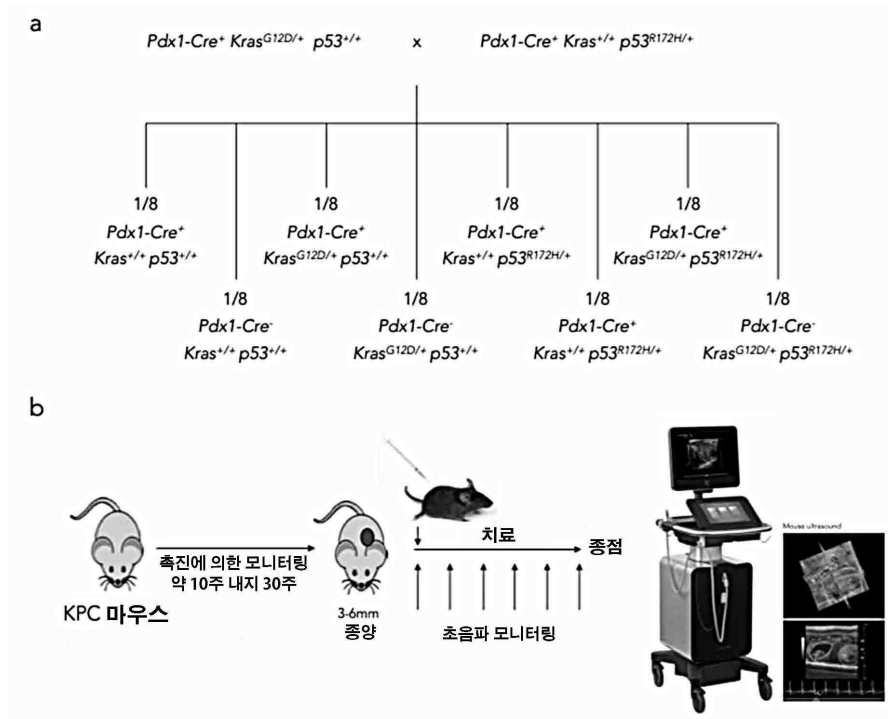
[0536]

도면

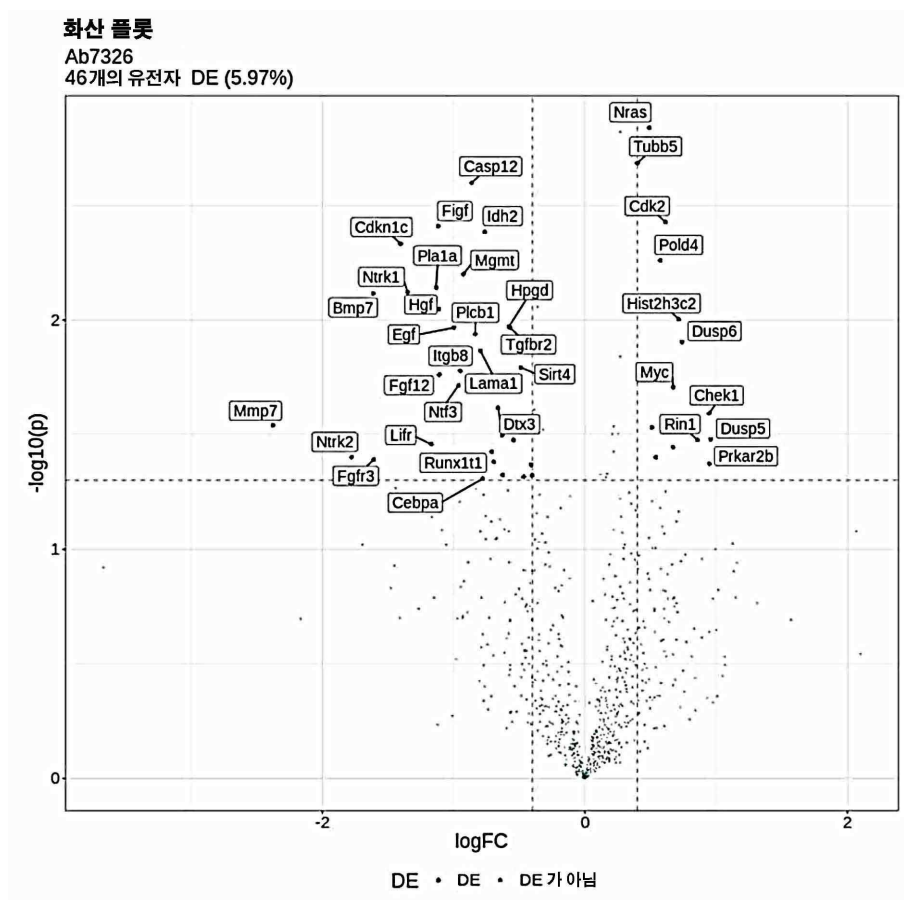
도면1



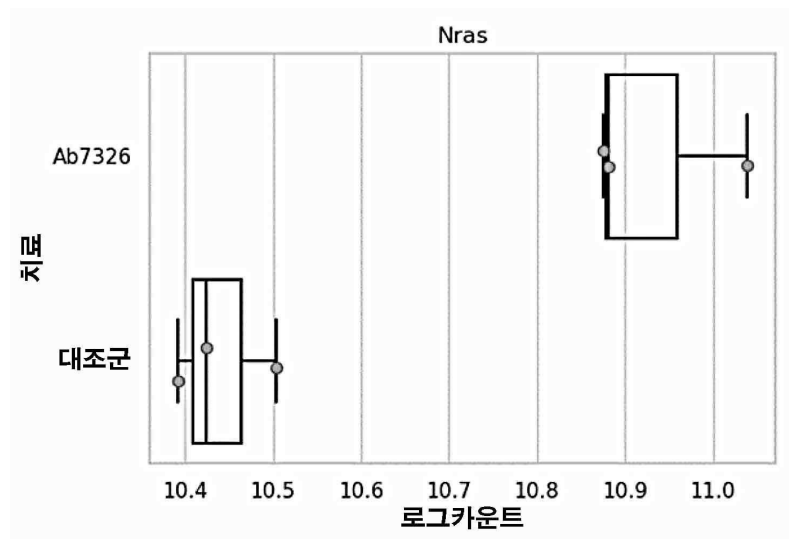
도면2



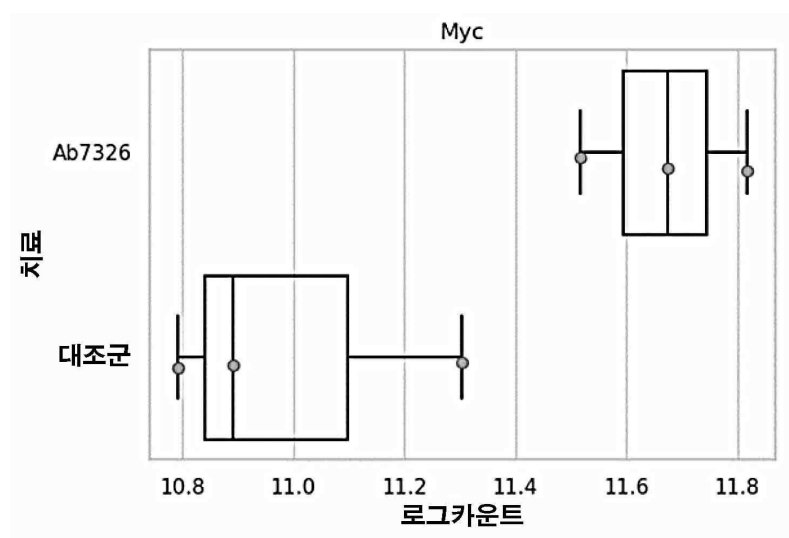
도면3a



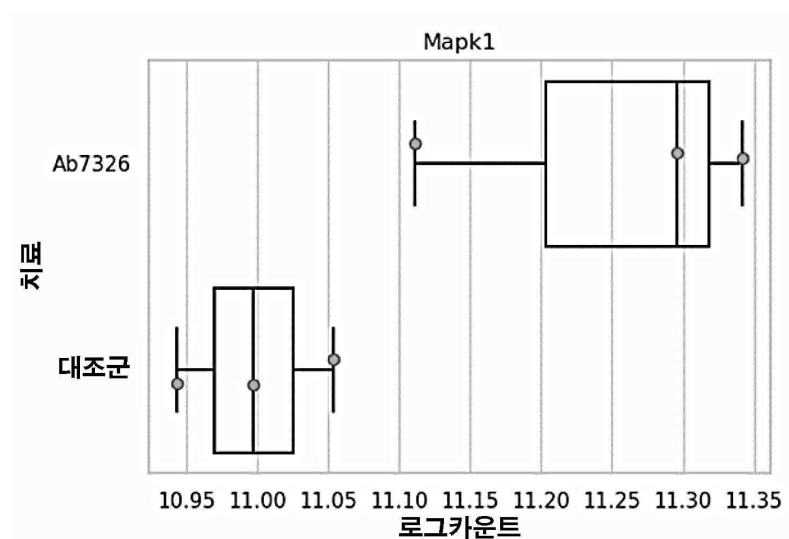
도면3b



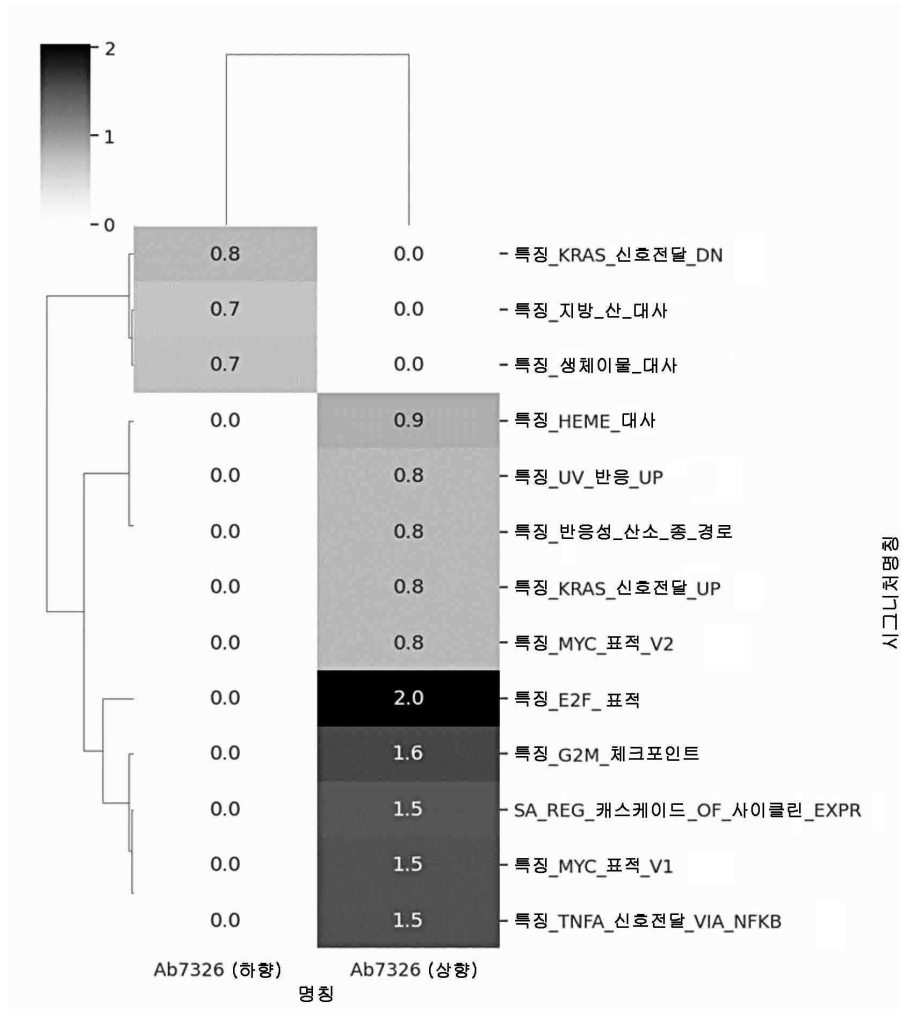
도면3c



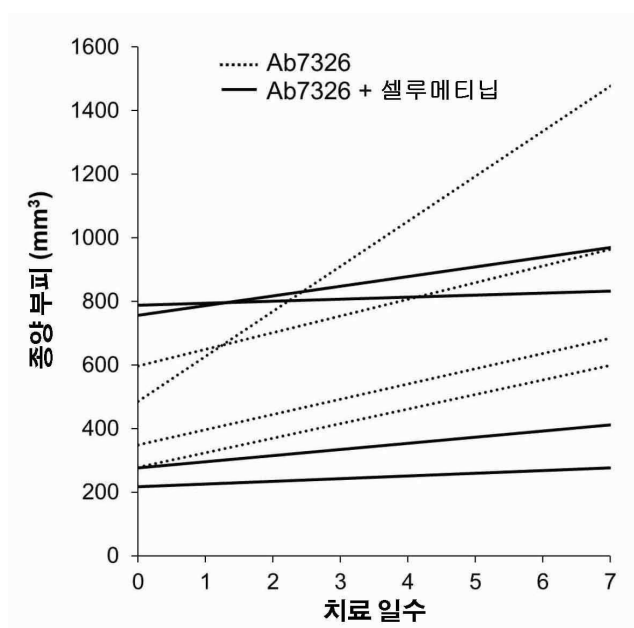
도면3d



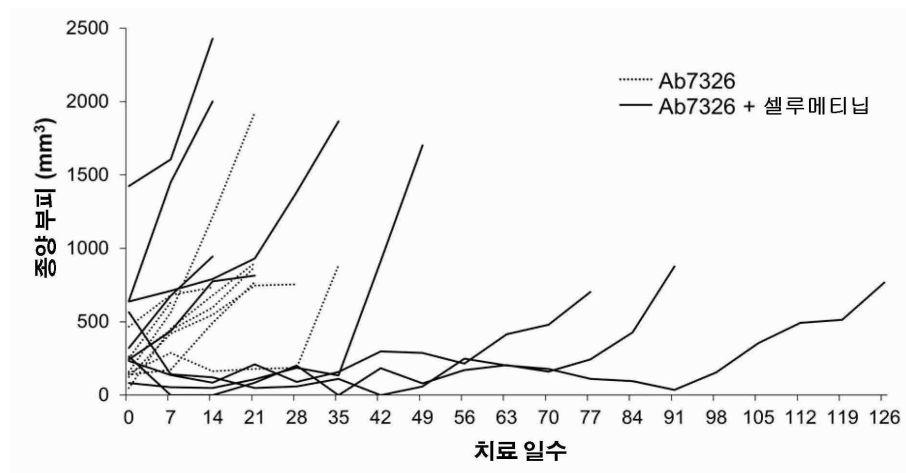
도면4



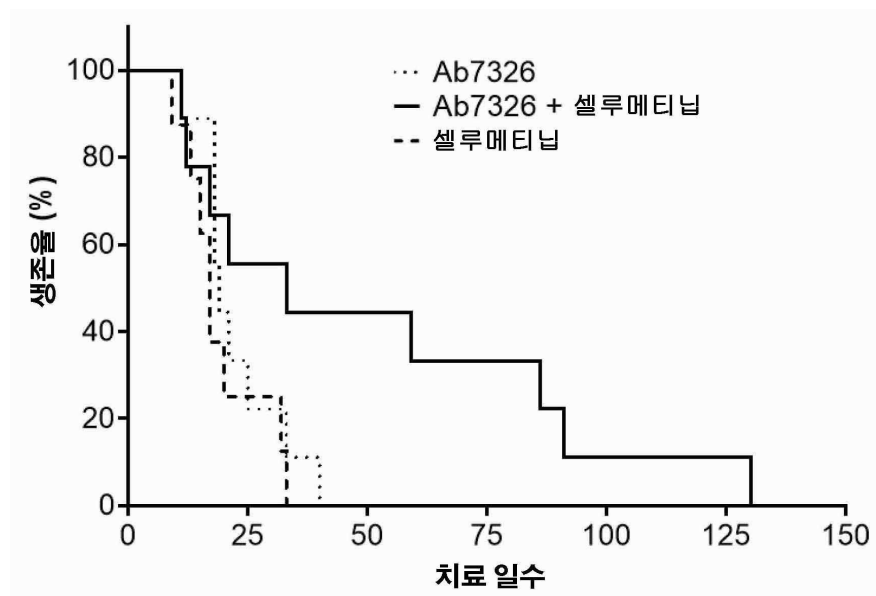
도면5



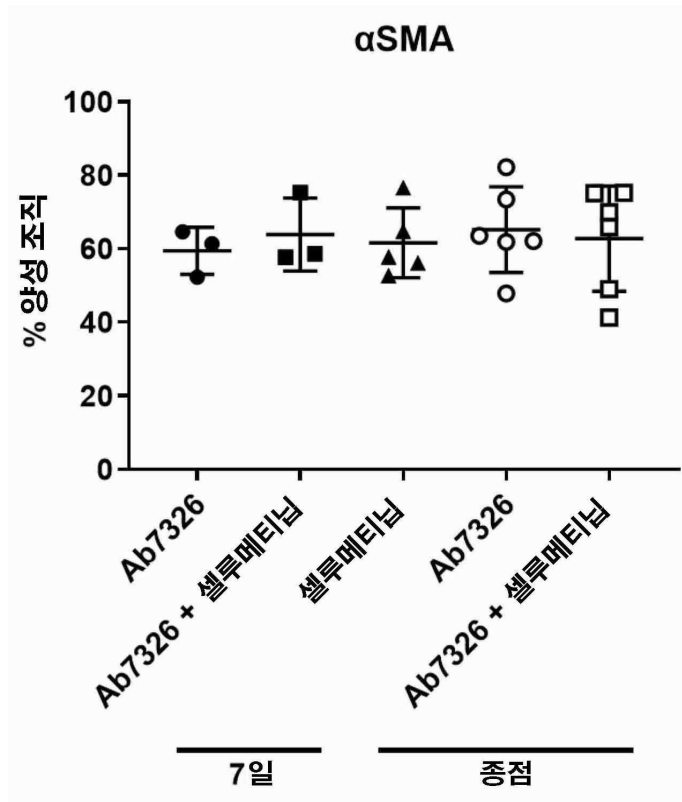
도면6



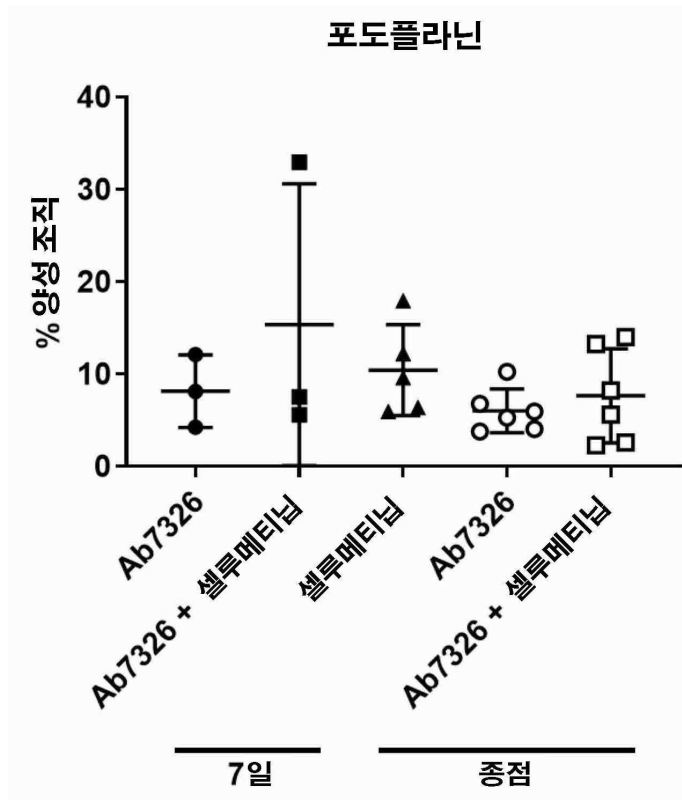
도면7



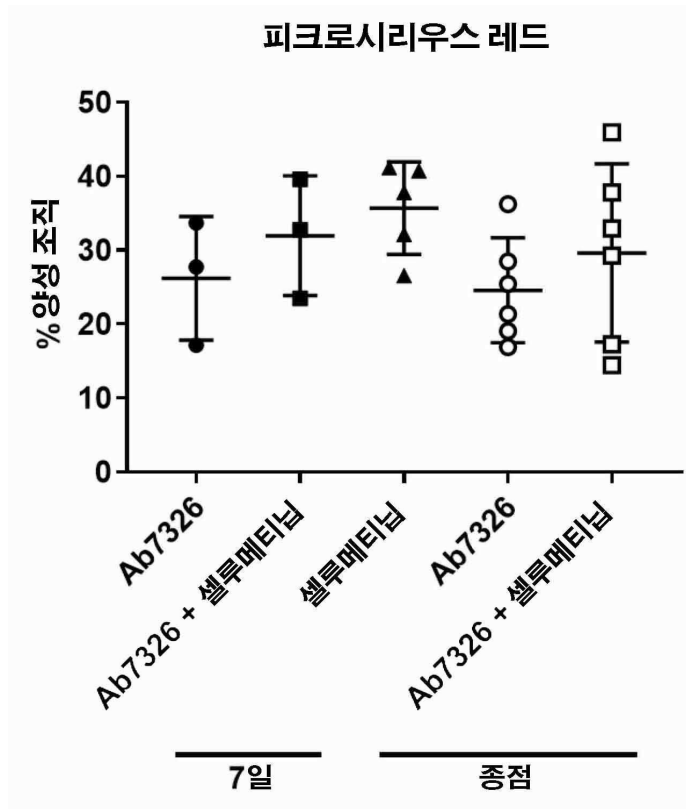
도면8a



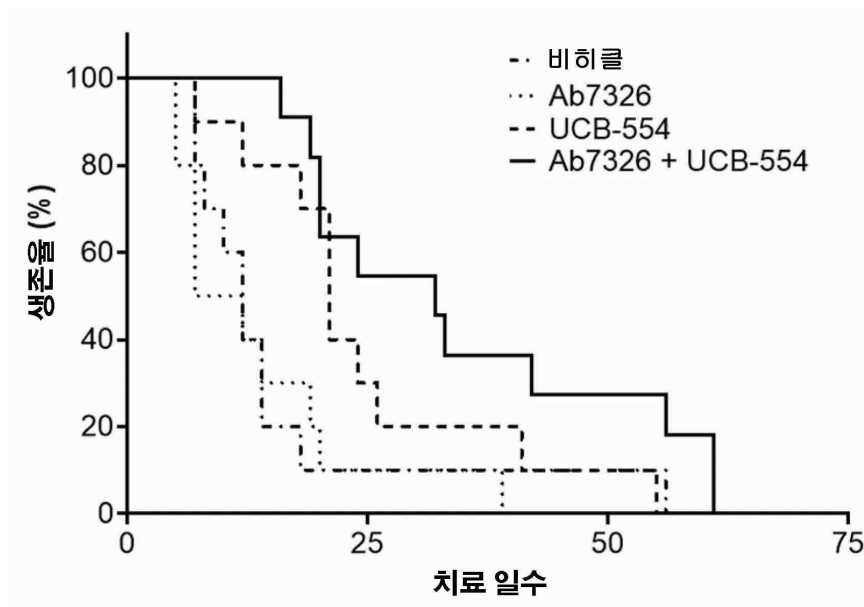
도면8b



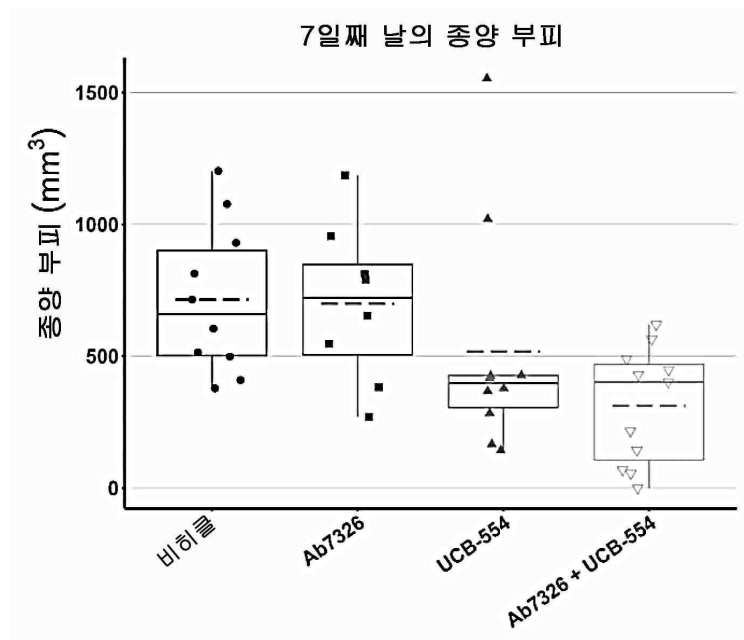
도면8c



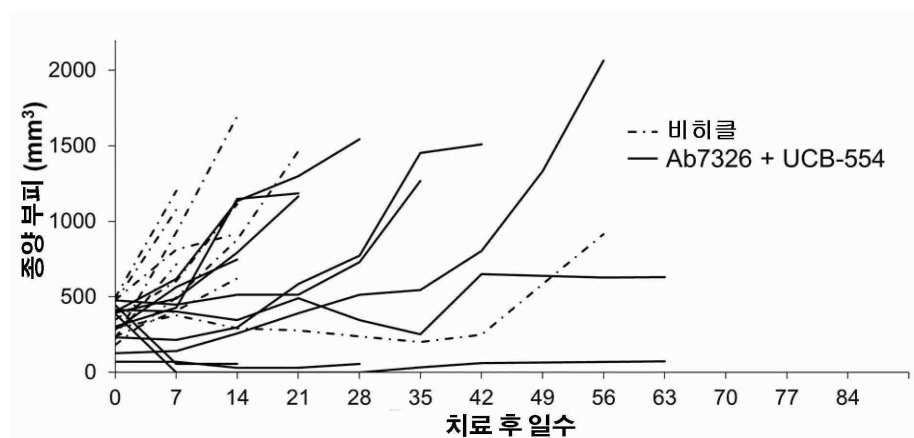
도면9a



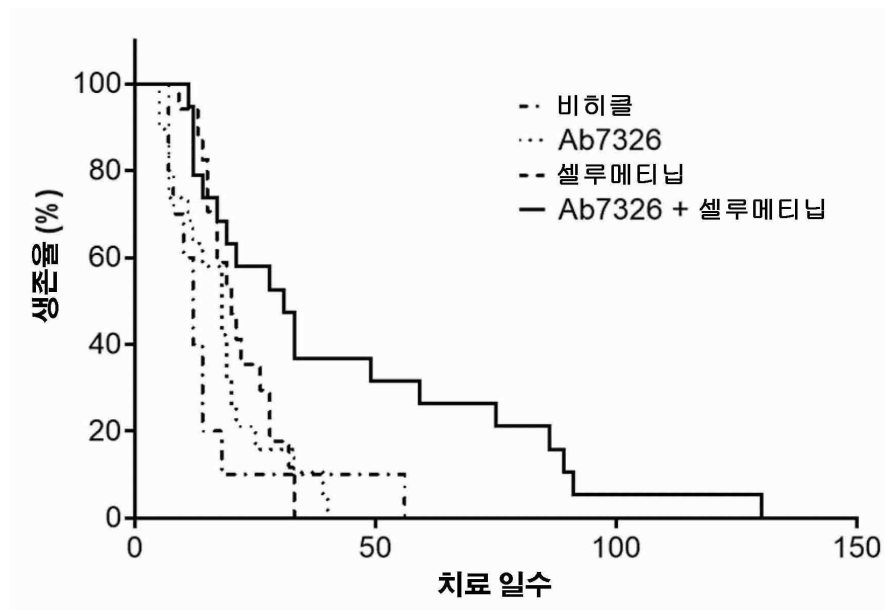
도면9b



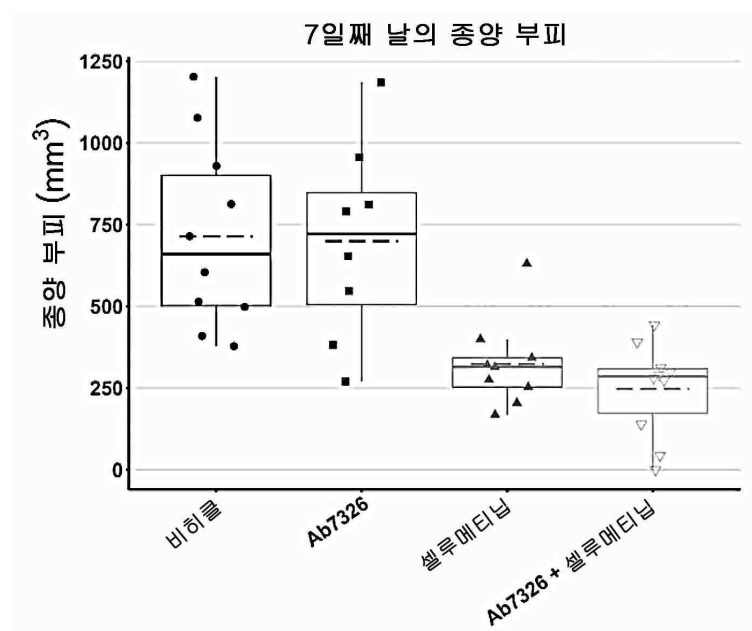
도면9c



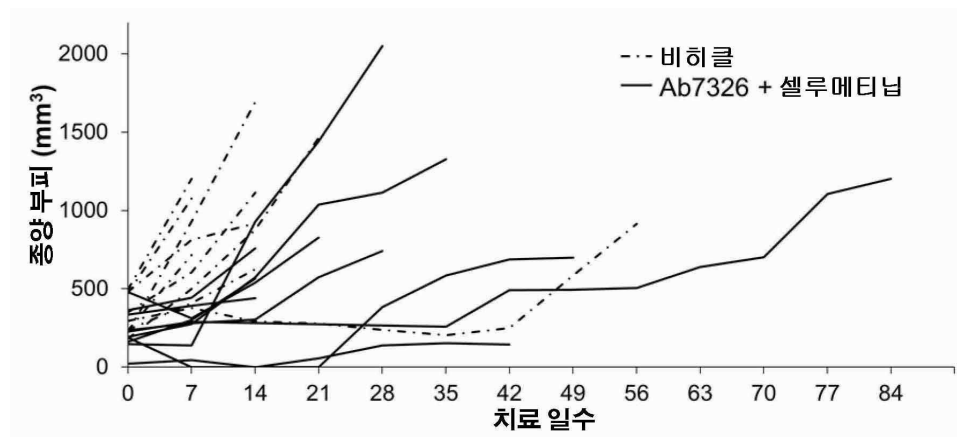
도면10a



도면10b



도면10c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.