

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-536657

(P2018-536657A)

(43) 公表日 平成30年12月13日(2018.12.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	Z N A N 4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4
<b>C 0 7 K 14/71 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/71	4 C 0 8 5
<b>C 0 7 K 7/06 (2006.01)</b>	C 0 7 K 7/06	4 C 0 8 7
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0783	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-522864 (P2018-522864)  
 (86) (22) 出願日 平成28年7月20日 (2016.7.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月14日 (2018.3.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/067338  
 (87) 国際公開番号 W02017/013188  
 (87) 国際公開日 平成29年1月26日 (2017.1.26)  
 (31) 優先権主張番号 1512733.5  
 (32) 優先日 平成27年7月20日 (2015.7.20)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 518022732  
 イェナゴン セラピューティクス アーベ  
 ー  
 スウェーデン、エスー171 76 ソル  
 ナ、カロリンスカ ユニバーシティ ホス  
 ピタル、ビルディング エム1、グスタフ  
 ヴェー リサーチ インスティテュート  
 (74) 代理人 110000040  
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナ  
 ーズ  
 (72) 発明者 ブロクゼイル、オロフ アンドリース  
 スウェーデン、11328 ストックホル  
 ム、アップランズガタン 69

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G D F 1 5 の活性を低減させるための試薬

## (57) 【要約】

本発明は、G D F 1 5 の活性を低減させる薬剤に関し、特に、高い、または望ましくない G D F 1 5 のレベルに関連する疾患を治療または予防するための、このような薬剤の使用に関する。本発明は、G D F 1 5 が、その受容体である C L P T M 1 および Q R F P R に結合するという発見に基づくものであり、受容体に結合でき、かつ G D F 1 5 と受容体との相互作用を阻害できる結合剤の形態で、このような使用のための薬剤を提供する。さらに、薬剤は、G D F 1 5 に結合でき、かつ受容体に対して G D F 1 5 が及ぼす作用を阻害できる、受容体に由来するポリペプチドを含む。また、その相互作用、または相互作用による効果を検出することに基づく診断方法、および C L P T M 1 レベルおよび/または C L P T M 1 活性が低減されるように改変された細胞毒性免疫細胞も提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

受容体である CLPTM1 および / または QRFPR に結合することができる、治療における使用のための結合剤であって、該結合剤は、GDF15 と該受容体との相互作用を阻害することができる、結合剤。

## 【請求項 2】

前記結合剤は、抗体である、請求項 1 に記載の使用のための結合剤。

## 【請求項 3】

前記抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項 2 に記載の使用のための結合剤。

10

## 【請求項 4】

前記抗体は、キメラ抗体もしくはヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための結合剤。

## 【請求項 5】

前記結合剤は、配列番号 15、16、17、18、200、212、213 ~ 239、275 ~ 278、280 ~ 286、または 322 の 1 つ以上に示すアミノ酸配列を有する、または含む、ポリペプチドに結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための結合剤。

## 【請求項 6】

前記結合剤は、請求項 7 ~ 34 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに結合しない、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用のための結合剤。

20

## 【請求項 7】

GDF15 に結合して、受容体である QRFPR および / または CLPTM1 に対して GDF15 が及ぼす作用を阻害することができる、治療における使用のためのポリペプチドであって、該ポリペプチドは、

(i) 配列番号 5 (QRFPR の細胞外ドメイン 3)、配列番号 12 (QRFPR の細胞外ドメイン 4)、もしくは配列番号 14 (CLPTM1 の細胞外ドメイン) に示すアミノ酸配列、または配列番号 5、12、もしくは 14 に対する配列同一性が少なくとも 75% であるアミノ酸配列を有する、または含む、ポリペプチド、あるいは、

(ii) 配列番号 5、12、もしくは 14 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸を含む、配列番号 5、12、もしくは 14 の一部であるか、またはそのような一部を含む、ポリペプチド、あるいは、

30

(iii) 配列番号 5、12、または 14 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸に相当する少なくとも 6 つのアミノ酸を含み、配列番号 5、12、または 14 と同等のアミノ酸配列に対する配列同一性が少なくとも 75% である、ポリペプチド、であり、

前記ポリペプチドは、天然型の受容体 QRFPR または CLPTM1 の全長アミノ酸配列を含むものでも、そのようなアミノ酸配列からなるものでもなく、前記ポリペプチドは、配列番号 243 ~ 245 のいずれか 1 つに示すアミノ酸配列からなるものではない、ポリペプチド。

## 【請求項 8】

GDF15 に結合して、受容体である QRFPR および / または CLPTM1 に対して GDF15 が及ぼす作用を阻害することができるポリペプチドであって、該ポリペプチドは、

40

(i) 配列番号 5 (QRFPR の細胞外ドメイン 3)、配列番号 12 (QRFPR の細胞外ドメイン 4)、もしくは配列番号 14 (CLPTM1 の細胞外ドメイン) に示すアミノ酸配列、または配列番号 5、12、もしくは 14 に対する配列同一性が少なくとも 75% であるアミノ酸配列を有する、または含む、ポリペプチド、あるいは、

(ii) 配列番号 5、6、もしくは 9 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸を含む、配列番号 5、12、もしくは 14 の一部であるか、またはそのような一部を含む、ポリペプチド、あるいは、

50

( i i i ) 配列番号 5、12、または 14 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸に相当する少なくとも 6 つのアミノ酸を含み、配列番号 5、12、または 14 と同等のアミノ酸配列に対する配列同一性が少なくとも 75 % である、ポリペプチド、であり、

前記ポリペプチドは、天然型の受容体 Q R F P R または C L P T M 1 の全長アミノ酸配列を含むものでも、そのようなアミノ酸配列からなるものでもなく、前記ポリペプチドは、配列番号 243 ~ 249、287、または 288 のいずれか 1 つに示すアミノ酸配列からなるものではない、ポリペプチド。

【請求項 9】

治療における使用のための、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記ポリペプチドは、配列番号 5、12、14、または 315 のいずれか 1 つに示すアミノ酸配列からなるものではない、請求項 7 もしくは 9 に記載の使用のためのポリペプチド、または請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記ポリペプチドは、

( i ) 配列番号 5 ( Q R F P R の細胞外ドメイン 3 )、配列番号 12 ( Q R F P R の細胞外ドメイン 4 )、配列番号 14 ( C L P T M 1 の細胞外ドメイン )、もしくは配列番号 315 ( N 末端にメチオニンを含む、C L P T M 1 の細胞外ドメイン ) に示すアミノ酸配列を含む、ポリペプチドであって、前記アミノ酸配列は、受容体である天然型の Q R F P R もしくは C L P T M 1 において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、前記アミノ酸配列の端部のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチドであるか、または、配列番号 5、12、14 もしくは 315 のアミノ酸配列ではないが、配列番号 5、12、14 もしくは 315 に対する配列同一性が少なくとも 75 % である、アミノ酸配列を含む、ポリペプチドであって、前記アミノ酸配列は、場合によっては、受容体である天然型の Q R F P R もしくは C L P T M 1 において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、前記アミノ酸配列の端部のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチド、あるいは、

( i i ) 配列番号 5、12、14、もしくは 315 の一部であるか、またはそのような一部を含む、ポリペプチドであって、該一部は、配列番号 5、12、14、もしくは 315 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸を含んでおり、( i ) 配列番号 5、12、14、もしくは 315 における少なくとも 2 つの連続したアミノ酸、もしくは少なくとも 2 つの連続していないアミノ酸が欠失している、かつ/または、( i i ) 受容体である天然型の Q R F P R もしくは C L P T M 1 において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、該一部の末端のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチド、あるいは、

( i i i ) 配列番号 5、12、14、もしくは 315 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸に相当する少なくとも 6 つのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 5、12、14、もしくは 315 における同等のアミノ酸配列に対する配列同一性が少なくとも 75 % である、ポリペプチドであって、( i ) 配列番号 5、12、14、もしくは 315 における少なくとも 2 つの連続したアミノ酸、もしくは少なくとも 2 つの連続していないアミノ酸が欠失している、かつ/または、( i i ) 受容体である天然型の Q R F P R もしくは C L P T M 1 において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、配列番号 5、12、14、もしくは 315 に相当する前記アミノ酸配列の末端のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチド、

である、請求項 7、9、もしくは 10 に記載の使用のためのポリペプチド、または請求項 8 もしくは 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記ポリペプチドは、配列番号 5 の残基 8 ~ 13 に相当する配列である F L Y E K ( 配列番号 210 ) を含む、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 または 11 に記載の使用のためのポ

10

20

30

40

50

リペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 13】

前記ポリペプチドは、配列番号 5 の残基 3 ~ 15 に相当する配列である L E I K Y D F L Y E K E H (配列番号 180) を含む、請求項 12 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 14】

前記ポリペプチドは、配列番号 5 の残基 22 ~ 24 に相当する配列である W T S (配列番号 211) をさらに含む、請求項 12 または 13 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 15】

前記ポリペプチドは、配列番号 11 に示す配列 ( F L Y E K E H I C )、もしくはその配列に対する配列同一性が少なくとも 75% である配列を有する、または含む、請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 16】

前記ポリペプチドは、配列番号 6、7、8、および 9 からなる群から選択される配列、もしくは、その配列に対する配列同一性が少なくとも 75% である配列を有する、または含む、請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 17】

前記ポリペプチドは、配列  $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$  を含む、ポリペプチドであって、該配列は、

$X_1$  は芳香族アミノ酸であり、

$X_2$  は脂肪族アミノ酸であり、

$X_5$  は塩基性アミノ酸であり、

$X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_8$ 、および  $X_9$  は、それぞれ独立して任意のアミノ酸であってもよい、配列 (配列番号 337) である、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 または 11 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 18】

$X_1$  は、F、W、または Y であり、

$X_2$  は、L、V、I、A、または M であって、好ましくは L、V、または I であり、

$X_5$  は、K、R、または H であって、好ましくは K または R である (配列番号 338)、請求項 17 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 19】

$X_3$  は、芳香族アミノ酸であって、好ましくは F、W、もしくは Y であり、かつ / または、

$X_4$  は、酸性アミノ酸であって、好ましくは E もしくは D である (配列番号 339 ~ 344)、請求項 17 または 18 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 20】

$X_6$  は、酸性アミノ酸であって、好ましくは E もしくは D であり、かつ / または、

$X_7$  は、塩基性アミノ酸であって、好ましくは K、R、もしくは H であり、より好ましくは K もしくは R である (配列番号 345 ~ 369)、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 21】

$X_8$  は、脂肪族アミノ酸であって、好ましくは L、V、I、A、もしくは M であり、より好ましくは L、V、もしくは I であり、かつ / または、

$X_9$  は、任意のアミノ酸であって、好ましくは C である (配列番号 370 ~ 402)、請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチドは、配列  $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$  を含む、ポリペプチドであつて、該配列は、

$X_1$  は、F、W、またはYであり、

$X_2$  は、L、V、またはIであり、

$X_3$  は、F、W、またはYであり、

$X_4$  は、DまたはEであり、

$X_5$  は、K、R、またはHであり、

$X_6$  は、DまたはEであり、

$X_7$  は、K、R、またはHであり、

$X_8$  は、L、V、またはIであり、

$X_9$  は、Cである配列（配列番号403）である、請求項17～21のいずれか1項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

10

【請求項23】

前記配列  $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$  は、その一方側または両側に並んで、1～10個のアミノ酸が位置しており、好ましくは、該並んだアミノ酸配列は、ヘリックスまたはシートを形成できるアミノ酸を含む、請求項17～22のいずれか1項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項24】

残基  $X_1$  に並んで、ヘリックスを形成できるアミノ酸を含むアミノ酸配列が位置し、かつ/または、残基  $X_9$  に並んで、シートを形成できるアミノ酸を含むアミノ酸配列が位置しており、好ましくは、 $X_9$  に並んで、Cが位置している、請求項23に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

20

【請求項25】

前記ポリペプチドは、配列番号13に示す配列（EKEYDDVTIK）、もしくはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列を有する、または含む、請求項7または9に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項8に記載のポリペプチド、あるいは請求項10または11に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

【請求項26】

前記ポリペプチドは、前記配列  $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10}$  を含み、 $X_1$  は、DまたはEであり、 $X_2$  は、K、R、またはHであり、 $X_3$  は、DまたはEであり、 $X_4$  は、F、W、またはYであり、 $X_5$  は、DまたはEであり、 $X_6$  は、DまたはEであり、 $X_7$  は、L、V、またはIであり、 $X_8$  は、A、S、またはTであり、 $X_9$  は、L、V、またはIであり、 $X_{10}$  は、R、K、またはHである（配列番号405）、請求項7または9に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項8に記載のポリペプチド、あるいは請求項10、11または26のいずれか1項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

30

【請求項27】

配列番号15に示す配列（YISEHEH）、もしくはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、および/または配列番号16に示す配列（LFWEQH）、もしくはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、を有する、または含む、請求項7または9に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項8に記載のポリペプチド、あるいは請求項10または11に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

40

【請求項28】

前記ポリペプチドは、配列番号17に示す配列、もしくはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、もしくは少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む、配列番号17の一部である配列、を有する、または含む、請求項7または9に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項8に記載のポリペプチド、あるいは請求項10、11、または27のいずれか1項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

50

**【請求項 29】**

前記ポリペプチドは、配列番号 18 の配列、もしくはその配列に対する配列同一性が少なくとも 75% である配列、を有する、または含む、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10、11、27、または 28 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

**【請求項 30】**

前記使用のためのポリペプチドまたは前記ポリペプチドは、配列番号 258、259、262、263、269、270、297、298、301、302、308、309 のいずれか 1 つに示す配列、もしくはその配列に対する同一性が少なくとも 75% である配列、もしくは少なくとも 6 つの連続したアミノ酸を含む、前記配列の一部である配列、を有する、または含む、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 または 11 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 10 または 11 に記載のポリペプチド。

10

**【請求項 31】**

前記使用のためのポリペプチドまたは前記ポリペプチドは、配列番号 30、31、32、39、46、47、175 ~ 189 のいずれか 1 つに示す配列、もしくはその配列に対する同一性が少なくとも 75% である配列、を有する、または含む、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 または 11 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

20

**【請求項 32】**

前記ポリペプチドは、二量体の形態、またはより高次の多量体の形態である、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

**【請求項 33】**

前記使用のためのポリペプチドまたは前記ポリペプチドは、融合タンパク質として提供される、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

30

**【請求項 34】**

前記融合タンパク質の融合パートナーは、アルブミン、トランスフェリン、Fc、フィブリノゲン、ホモアミノ酸ポリマー、プロリン-アラニン-セリンポリマー、またはエラスチン様ペプチドであり、前記融合パートナーは、場合によってはリンカー配列と結合している、請求項 33 に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

**【請求項 35】**

前記ポリペプチドは、環状ポリペプチドである、請求項 7 または 9 に記載の使用のためのポリペプチド、あるいは請求項 8 に記載のポリペプチド、あるいは請求項 10 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の使用のためのポリペプチドまたはポリペプチド。

**【請求項 36】**

高い、または望ましくない GDF 15 のレベルに関連する疾患を治療または予防するための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の結合剤、および / あるいは請求項 7、8、または 10 ~ 35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

40

**【請求項 37】**

薬学的に許容される少なくとも 1 つの担体または賦形剤と共に、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の結合剤、および / あるいは請求項 7、8、または 10 ~ 35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む、医薬組成物。

**【請求項 38】**

高い、または望ましくない GDF 15 のレベルに関連する疾患の治療または予防に、個別に、または順次に、または同時に、用いられる組み合わせ製剤として、請求項 1 ~ 6 の

50

いずれか 1 項に記載の結合剤、および請求項 7、8、または 10～35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む、製品。

【請求項 39】

高い、または望ましくない G D F 1 5 のレベルに関連する疾患を治療または予防する方法であって、該方法は、治療または予防を必要とする被験体に対して、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の結合剤、および / あるいは請求項 7、8、または 10～35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 40】

高い、または望ましくない G D F 1 5 のレベルに関連する疾患の治療または予防における使用のための、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の結合剤、および / あるいは請求項 7、または 9～35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、あるいは請求項 37 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 41】

前記疾患は、がん、悪液質、骨障害、心疾患、慢性肺障害、肺動脈高血圧症、腎障害、鎌状赤血球貧血、遺伝性球状赤血球症、または鉄過剰症のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 39 に記載の使用のための結合剤、および / または請求項 40 に記載の使用のためのポリペプチド。

【請求項 42】

G D F 1 5 の免疫抑制効果の低減に用いる、請求項 40 または 41 に記載の使用のための結合剤および / またはポリペプチド。

20

【請求項 43】

転移の阻害、特にがんの骨への転移の阻害を含む、がん細胞による免疫回避の阻害に用いる、請求項 40～42 のいずれか 1 項に記載の使用のための結合剤および / またはポリペプチド。

【請求項 44】

前記悪液質は、がんによって誘導される、請求項 41 に記載の使用のための結合剤および / またはポリペプチド。

【請求項 45】

インビトロにおいて、受容体 Q R F P R および / または C L P T M 1 に対して G D F 1 5 が及ぼす作用を阻害するための、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の結合剤、および / あるいは請求項 7、8、または 10～35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

30

【請求項 46】

請求項 1～8 または 10～35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドおよび / または結合剤である治療薬による治療または予防を必要とする被験体を検出する方法であって、該方法は、G D F 1 5 と、その受容体である Q R F P R および / または C L P T M 1 との相互作用、ならびに / あるいはこのような相互作用の効果を検出することを含む、方法。

【請求項 47】

請求項 1～8 または 10～35 のいずれか 1 項に記載の結合剤および / またはポリペプチドである治療薬を被験体に投与することによって、治療法または予防法を評価またはモニターする方法であって、該方法は、G D F 1 5 と、その受容体である Q R F P R および / または C L P T M 1 との相互作用、ならびに / あるいはこのような相互作用の効果を検出することを含む、方法。

40

【請求項 48】

高い G D F 1 5 のレベルに関連する疾患に罹患している、またはそのような疾患を発症するリスクがある、被験体を検出する方法であって、該方法は、該被験体において、受容体である Q R F P R および / または C L P T M 1 に対して G D F 1 5 が及ぼす作用、ならびに / あるいは該作用の効果、を検出することを含む、方法。

【請求項 49】

前記 G D F 1 5 とその受容体である Q R F P R および / または C L P T M 1 との相互作用

50

用を、インサイチュ近接ライゲーションアッセイによって検出する、請求項 46 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

前記相互作用は、GDF15 と QRFPR との間の相互作用であり、該相互作用の効果は、QRFPR 含有エキソソームレベルが上昇することである、請求項 46 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

前記相互作用は、GDF15 と CLPTM1 との間の相互作用であり、該相互作用の効果は、リン酸化 GSK3β レベルが上昇することである、請求項 46 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 52】

細胞毒性免疫細胞であって、該細胞は、改変されていない細胞と比較して、CLPTM1 レベルおよび / または CLPTM1 活性が低下するように改変されている、細胞毒性免疫細胞。

【請求項 53】

前記細胞は、がん細胞表面の抗原に対する特異性を有する T 細胞受容体を発現する、または発現するように改変されている、細胞毒性 T 細胞である、請求項 52 に記載の細胞。

【請求項 54】

前記細胞は、がん細胞表面の抗原に対する特異性を有するキメラ抗原受容体を発現するように改変されている細胞毒性 T 細胞である、請求項 52 に記載の細胞。

20

【請求項 55】

前記細胞は、場合によっては、がん細胞表面の抗原に対する特異性を有するキメラ抗原受容体を発現するように改変されている、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) である、請求項 52 に記載の細胞。

【請求項 56】

前記改変は、CLPTM1 をコードする遺伝子のノックアウト、ノックダウン、または欠失である、請求項 52 ~ 55 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 57】

治療における使用のための、請求項 52 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 58】

がんの治療における使用のための、請求項 57 に記載の使用のための細胞。

30

【請求項 59】

がんの治療における使用のための医薬品の製造における、請求項 52 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 60】

薬学的に許容される少なくとも 1 つの担体または賦形剤と共に、請求項 52 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む、治療用組成物。

【請求項 61】

治療法であって、該治療法を必要とする被験体に、請求項 52 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の細胞の有効量を投与することを含む、治療法。

40

【請求項 62】

がんの治療に、個別に、または順次に、または同時に、用いられる組み合わせ製剤として、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の結合剤、および / または請求項 7、8、または 10 ~ 35 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、および請求項 52 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む、製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験体に用いることによって、GDF15 の、高い、過剰な、または望ましくない、体内におけるレベルおよび / または活性に関連する疾患を、抑制 (すなわち、治

50

療または予防)し得る治療薬を含む、GDF15の活性を低減させる薬剤に関する。本発明は、体内において、異なる2つのGDF15受容体が発見されたことに基づくものであり、したがって、新規GDF15受容体の同定に基づくものであって、より具体的には、本発明は、受容体へのGDF15の結合の防止、および/または受容体のうちの1つまたは両方におけるGDF15の効果(すなわち、GDF15が結合することによる効果)の阻害に用いられる、GDF15受容体の断片、およびGDF15受容体に結合する抗体または他の親和性結合試薬を提供する。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

マクロファージ阻害性サイトカイン1(MIC1)としても知られる、増殖分化因子15(GDF15)は、TGF-スーパーファミリーのメンバーであり、TGF-スーパーファミリーの他のメンバーに対する配列相同性は、比較的低い(24%)。GDF15の高いレベルは、癌、神経性食欲不振、骨粗鬆症、腎臓障害、肺動脈高血圧症、および心疾患に関連していることが示され、また、悪液質や、より一般的には食欲不振または食欲抑制に関連していることが示されている。GDF15は、あらゆる原因による死亡に対するマーカーである。

##### 【0003】

GDF15は、鎌状赤血球貧血、遺伝性球状赤血球症などの鉄過剰症、I型先天性赤血球生成異常貧血(Tamaryら, 2008. Blood 112, 5241~5244)およびII型先天性赤血球生成異常貧血、地中海貧血症(Tannoら, 2007. Nat Med 13, 1096~1101)、環状鉄芽球を伴う不応性貧血(RARS)(Ramirezら, 2009. Br J Haematol 144, 251~262)、ならびにピルビン酸キナーゼ欠損症(Finkenstedtら, 2009. Br J Haematol 144, 789~793)において、過剰発現していることも見出されている。

##### 【0004】

GDF15は、1997年に初めてクローニングされたが、GDF15受容体は、今のところ不明なままである。

##### 【0005】

GDF15は、腫瘍病理において2つの役割を有する。初期腫瘍においては、このリガンドによってアポトーシスが誘導されるが、リガンドは、前立腺癌、乳癌、胃癌(Kimら, 2008. Carcinogenesis 29, 704~712)、大腸癌、および膠芽細胞腫(Albertoniら, 2002. Oncogene 21, 4212~4219)などの末期がんにおいて、大量に分泌されている。末期の疾患において、GDF15は、腫瘍の転移に寄与しており、転移性前立腺癌における骨への転移に対する最も重要なバイオマーカーである(Selanderら, 2007. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16, 532~537; Wakchoureら, 2009. Prostate 69, 652~661)。

##### 【0006】

文献では、転移箇所に応じてGDF15の発現の上方制御が行われ、骨に浸潤する前立腺癌細胞の副次集団においてそのレベルが著しく高いということが証明されている。GDF15は、破骨細胞および骨芽細胞の両方に影響を及ぼすことも知られている(Wakchoureら, 2009. Prostate 69, 652~661)。

##### 【0007】

GDF15は、悪液質、すなわち慢性疾患による身体の消耗にも関与しており、特に、末期がんにおける食欲不振および悪液質に関係している。末期がんの患者の食欲不振を補うために、通常、食欲増進剤が用いられるが、今までのところ、GDF15の分子機構を対象とした臨床的に利用可能な薬剤は、現存しない。したがって、腫瘍によって誘発された悪液質は、回復が困難である。最近では、がんにおける致死的転帰のうち、最大で25%が悪液質によるものであり得ると推定されている。

10

20

30

40

50

## 【0008】

GDF15は、視床下部回路に作用することによって、中枢神経系機構を通じて、悪液質におけるその効果を発揮すると考えられる。GDF15を全身投与することによって、視床下部の弓状核において、重要な食欲刺激性ペプチドであるNPYの発現が減少し、食欲抑制物質 - MSHの前駆体であるPOMCの発現が増加することが見出されている。弓状核は、摂食行動を調節するものであり、血液脳関門(BBB)が全身性要因に対して寛容である最後野に隣接している。このように、GDF15の高いレベルが、食欲抑制に関連していることが示されている。さらに、進行した前立腺癌の患者における体重減少の程度は、TNF- $\alpha$ 、IL-6、またはIL-8などの、悪液質に関係している他の要因の血清レベルではなく、6ヶ月間のGDF15の血清レベルと相関する。

10

## 【発明の概要】

## 【0009】

US2009/000481において、ブライト(Breit)は、食欲および体重を調節する手段として、体内におけるGDF15の量または活性を増加または減少させるGDF15(MIC-1)調節試薬を用いることを提案した。これは、GDF15が過剰発現されているがんまたは他の疾患に関連する食欲減少および/または体重減少を治療するために、抗GDF15抗体またはその断片を用いることを含むものである。このような、またその他の、GDF15の生理学的役割および病理学上の役割が、これまでに明らかになっているが、この生理学的に重要なタンパク質に対する受容体(または複数の受容体)が何であるかは、不明なままである。発明者らは、タンデムアフィニティ精製(TAP)アッセイを用いて、構造的に無関係な異なる2つのGDF15受容体を初めて同定した。これらの知見に基づいて、GDF15の効果を低減させる新規の治療薬を提案する。

20

## 【0010】

本出願において、GDF15受容体が2つ同定されている。1つは、ピログルタミル化RFアミドペプチド受容体(QRFR)であり、もう1つは、口唇口蓋裂膜貫通タンパク質1(CLPTM1)である。

## 【0011】

食欲増進性神経ペプチドQRFR受容体またはGタンパク質結合受容体103(GPR103)としても知られるQRFRは、N末端細胞外ドメインと、さらに3つの細胞外ドメイン(またはループ)とを含む、7回膜貫通型のGタンパク質結合タンパク質受容体である。ヒトQRFRのアミノ酸配列を、配列番号1に示す。QRFRのトポロジーのインシリコ予測によって、QRFRの細胞外N末端ドメイン(ECD1)は、残基1~46(配列番号3)を含み、細胞外ドメイン2(ECD2;ループ1)は、残基103~120(配列番号4)を含み、細胞外ドメイン3(ECD3;ループ2)は、残基184~212(配列番号5)を含み、細胞外ドメイン4(ECD4;ループ3)は、残基293~311(配列番号12)を含むことが示唆されている。QRFRは、視床下部の弓状核において高発現されている、食欲増進性、すなわち食欲刺激性の受容体である(Bruzzoneら, 2007. J Comp Neurol 503, 573~591; Ukenaら 2013. Gen Comp Endocrinol 190, 42~46)。リガンドであるRFアミド43がQRFRに結合すると、食欲刺激性ペプチドであるNPYの発現が誘導され、またPOMC(食欲抑制物質)の発現が阻害されて、摂食行動が刺激され、血圧が調節される(Takayasuら, 2006. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 7438~7443)。このように、RFアミド43とGDF15とは、NPYおよびPOMCの発現において、ひいては食欲の調節において、反対の役割を有している。このように、GDF15が、この受容体においてアンタゴニストとして作用し、内因性の作動性リガンドの効果に拮抗し得るといふ、本発明の基盤を成し、以下でより詳細に報告する、知見は、食欲/悪液質の低下を伴うGDF15の高いレベルと矛盾しない。

30

40

## 【0012】

発明者らは、GDF15とQRFRとの相互作用が、QRFRの食欲刺激機能に干

50

渉し、摂食行動の負の調節に関係するということを提案する。このことから、さらに、GDF15とQRFPRとの相互作用に干渉する薬剤を治療に用いることによって、食欲抑制および/または体重減少に関連する悪液質などの疾患を治療または予防し得るという、本発明の基盤を成す提案を行う。

#### 【0013】

食欲の調節に加えて、受容体QRFPRは、骨形成の調節を行う(Baribaultら, 2006. Mol Cell Biol 26, 709~717)。QRFPRノックアウトマウスは、やせており、骨質量の低下を示す。また、破骨細胞の数も減少している。QRFPRは、特に、骨芽細胞などの骨の細胞において発現されることが知られており、発明者らは、いくつかの異なる原発性骨がんおよび二次性骨微小転移巣のいずれにおいても、QRFPRが上方制御されていることを示した。したがって、発明者らは、ここでさらに、原発性骨がんおよび他のがん(前立腺癌など)の骨への転移のいずれをも含む、骨の障害または骨に関連する障害において、GDF15とQRFPRとの相互作用が重要であるということ、また、この相互作用に干渉する薬剤は、このような疾患を治療または予防するための新規の治療法となるということ提案するものである。

10

#### 【0014】

本発明に至る研究において、発明者らは、GDF15が、QRFPRに結合し、2つの機構によって、細胞表面におけるその発現量を低下させ得るということを示した。GDF15は、受容体の内在化およびプロテアソームによる分解を誘導し、また、QRFPR陽性エクソソームの分泌による、細胞表面からの受容体の放出も誘導する。理論に拘束されることを望むものではないが、細胞表面において利用可能なQRFPRのレベルを下方制御することによって、GDF15とQRFPRとの相互作用がQRFPRの活性に干渉すると考えられる。したがって、上述したような、GDF15の高いレベルに関連する病状に対する可能な治療として、GDF15とQRFPRとの相互作用を阻害することを提案する。

20

#### 【0015】

GDF15受容体として同定された第2の受容体は、CLPTM1である(ヒトにおけるこの受容体のアミノ酸配列を、配列番号2に示す)。CLPTM1は、細胞外ドメインが350アミノ酸以下である膜貫通タンパク質である(ヒトCLPTM1のECDのアミノ酸配列を、配列番号14に示す。これは、353アミノ酸を有する(配列番号1のアミノ酸2~354である))。CLPTM1の発現パターンは他とは異なり、例えば、免疫系の細胞において発現される。特に、CLPTM1は、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)およびマクロファージにおいて発現されることが知られており、発明者らは、さらに、様々なクラスのリンパ球などの他の免疫系の細胞、特に、様々なクラスのTリンパ球によって発現され得ること、すなわち、CD4+T細胞、CD8+T細胞の特定のサブセットがCLPTM1を発現し得、また、CD3-CD45+非T細胞の特定のサブセットもCLPTM1を発現し得るということを示した。このように、CLPTM1は、様々な免疫細胞によって発現され得る。

30

#### 【0016】

QRFPRとは異なり、GDF15がCLPTM1に結合した場合は、細胞表面から受容体は失われない。むしろ、GDF15がNK-92細胞を刺激することによって、TGFBRI(ALK5)およびTGFBRIIのCLPTM1との共局在化が誘導されることが、本発明の基盤を成す研究において見出され、また、この刺激によって、GSK3bがリン酸化される。GDF15は、先に、GSK3のリン酸化に関わり、リン酸化された(9/21)GSK3bは、自然免疫系の細胞の活性化の低減および細胞毒性の低減に関わる。したがって、GDF15からの刺激を受けると、CLPTM1がTGBb受容体複合体と会合するという観察結果によって、GDF15がどのようにNK細胞の細胞毒性を低下させ得るのかが説明される。このことは、GDF15と、受容体、特に、様々な免疫細胞で発現され得るCLPTM1などとの相互作用を阻害することによって、GDF15の免疫抑制効果が低減され得るという提案を支持するものである。

40

50

## 【 0 0 1 7 】

通常の生理学においては、高レベルの G D F 1 5 は、胎盤細胞によって分泌される。発明者らは、G D F 1 5 は、胎盤の免疫調節において、胎盤細胞に対する免疫応答の下方制御や免疫攻撃からの胎盤の保護などの生理学的役割を果たすと考えている。マクロファージおよびナチュラルキラー細胞（NK細胞）のいずれもが、胎盤の「異物」細胞にとって大きな脅威となり、局所的に抑制されなければならない。G D F 1 5 は、プロペプチドを含む未処理の形態であるプロ G D F 1 5 として分泌される場合があり、プロ G D F 1 5 は、プロ G D F 1 5 を分泌する細胞の細胞外基質の成分と会合して、潜在性 G D F 1 5 として細胞の近傍に貯蔵されると考えられる。発明者らは、胎盤細胞表面において局所的に高濃度な G D F 1 5 は、マクロファージおよび NK 細胞の両方、ならびに他の潜在的 G D F 1 5 応答性免疫細胞の活性を低減させる潜在能力を有しているということを提案する。重要なことには、発明者らは、さらに、G D F 1 5 は、がんによる免疫回避において同様の役割を果たし得ると考えている。多くの腫瘍において G D F 1 5 が分泌されており、胎盤の場合と同様に、腫瘍間質および転移部位における G D F 1 5 の局所濃度を効果的に上昇させる。Q R F P R および / または C L P T M 1 を標的とすることによって、腫瘍は、NK 細胞、マクロファージ、および / または他の免疫細胞の活性を低減させて、細胞性免疫応答から腫瘍自体を保護し得る。したがって、発明者らは、ここで、G D F 1 5 と受容体である Q R F P R および / または C L P T M 1 との相互作用を阻害する薬剤を、さらに、がんの免疫回避を阻害する、またはがんによって誘導される免疫寛容を阻害するのに、特に、転移を阻害するのに、利用すること、ならびに、より一般的に、G D F 1 5 によって誘導される免疫抑制を阻害するのに利用することを提案する。

## 【 0 0 1 8 】

特に、発明者らは、下記実施例において、Q R F P R の第 3 および第 4 の細胞外ドメイン（E C D）（Q R F P R のループ 2 およびループ 3）に由来するペプチドのいずれもが、G D F 1 5 に結合できることを示している。したがって、発明者らは、内因性の作動性リガンド（endogenous agonistic ligands）の結合部位とは異なると考えられる、Q R F P R における G D F 1 5 結合部位が、E C D 3（配列番号 5）および E C D 4（配列番号 1 2）の両方に存在しているということを提案する。これらのタンパク質ループは、それぞれ、20 以下のアミノ酸を含み、G D F 1 5 がこの受容体に結合する場合は、これらのループの両方に同時に結合すると考えられる。下記実施例において報告する研究では、さらに、これらのループのアミノ酸配列に対して高い配列同一性を有する配列を含むペプチドが、固有のリガンドによって活性化される Q R F P R の能力を残しながら、G D F 1 5 が誘導する、細胞表面での Q R F P R の減少を防止するのに有効であることを実証しており、このことは、これらのペプチドが、G D F 1 5 に結合することによって、G D F 1 5 と Q R F P R との相互作用を特異的に阻害できることを示している。したがって、Q R F P R の細胞外ドメイン 3 および細胞外ドメイン 4（ループ 2 およびループ 3）由来のペプチドは、G D F 1 5 とその受容体との相互作用を阻害する有望な治療薬として期待される。さらに、下記実施例において、Q R F P R の細胞外ドメインに結合する抗体も、受容体の活性に影響を与えずに、G D F 1 5 が誘導する、細胞表面での Q R F P R の減少を防止できることが示されており、これによって、G D F 1 5 - Q R F P R 相互作用を阻害する、追加的または代替的な、有望な薬剤が提供される。したがって、Q R F P R の細胞外ドメインに結合可能な薬剤は、G D F 1 5 に対して、その細胞外ドメインが及ぼす作用を阻害する、さらなる有望な治療薬である。

## 【 0 0 1 9 】

下記実施例において、C L P T M 1 の細胞外ドメイン領域（配列番号 1 4）を含むペプチドが、「プルダウン」アッセイにおいて G D F 1 5 と相互作用し、Q R F P R の領域を含むペプチドよりも高い親和性で G D F 1 5 に結合することが示されている。したがって、C L P T M 1 の細胞外ドメイン領域を含むペプチドは、G D F 1 5 とその受容体との相互作用を阻害する、さらなる治療薬である。実施例では、C L P T M 1 の細胞外ドメインに結合する抗体をブレインキュベートすることによって、G S K 3 b のリン酸化を阻害で

きることも実証されており、このことは、CLPTM1に結合する、GDF15-CLPTM1相互作用を特異的に阻害できるということを示している。CLPTM1の細胞外ドメインに結合可能な薬剤は、GDF15に対して、その細胞外ドメインが及ぼす作用を阻害する、さらなる有望な治療薬である。

【0020】

したがって、GDF15が、本出願において同定された2つの受容体を介して、骨の発達、悪液質、がんの確立および転移、ならびに免疫機能の低減などに対して、少なくとも部分的に生理的効果を発揮し得るということは、明らかである。よって、特に、GDF15のレベルが高い場合に、上述した疾患、または実際には、GDF15の高い、または望ましくないレベルに関連するあらゆる疾患、を治療または予防するために、GDF15とこれらの受容体との相互作用を阻害することが望ましい。本発明は、この必要性に応えるものであり、したがって、GDF15とその受容体との相互作用、または相互作用の効果を阻害する治療薬を提供する。

10

【0021】

第1類の治療薬は、本明細書で同定されたGDF15受容体のリガンド結合ドメインに基づくポリペプチドである。これらのポリペプチドは、「デコイ(decoy)」受容体分子(「デコイペプチド」)として働き、循環血液中に遊離しているGDF15、またはECMおよび/または間質に会合しているGDF15に結合し、GDF15が受容体に結合することを防止することができる。第2類の治療薬は、GDF15受容体の細胞外ドメインに結合して受容体へのGDF15の結合を阻害し、これによってGDF15とその受容体との相互作用を阻害する結合剤、または受容体のうちの1つもしくは両方において、他の方法でGDF15の効果を阻害する結合剤である。

20

【0022】

したがって、第1の態様においては、本発明は、GDF15に結合して、受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1に対してGDF15が及ぼす作用を阻害することができるポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、

(i) 配列番号5(QRFPRの細胞外ドメイン3)、配列番号12(QRFPRの細胞外ドメイン4)、もしくは配列番号14(CLPTM1の細胞外ドメイン)に示すアミノ酸配列、または配列番号5、12、もしくは14に対する配列同一性が少なくとも75%であるアミノ酸配列、を有する、または含む、ポリペプチド、あるいは、

30

(ii) 配列番号5、12、もしくは14における少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む、配列番号5、12、もしくは14の一部であるか、またはそのような一部を含む、ポリペプチド、あるいは、

(iii) 配列番号5、12、または14における少なくとも6つの連続したアミノ酸に相当する少なくとも6つのアミノ酸を含み、配列番号5、12、または14と同等のアミノ酸配列に対する配列同一性が少なくとも75%である、ポリペプチドである。

【0023】

このような本発明のポリペプチドは、受容体である天然型QRFPR自体、また天然型CLPTM1自体を含まない(より具体的には、あらゆる種由来の、受容体である天然型または野生型の全長QRFPRまたはCLPTM1が、除外される)。したがって、このポリペプチドは、配列番号1もしくは2からなる、または配列番号1もしくは2を含む、ポリペプチドを含まない。また、配列番号1または2のホモログまたはオルソログである、すなわち他の種に由来する受容体である、天然型または野生型の全長(すなわち、無傷または全体の)QRFPRまたはCLPTM1であるアミノ酸配列からなる、またはそのようなアミノ酸配列を含む、ポリペプチドを含まない。したがって、このような本発明のポリペプチドは、配列番号287または配列番号288からなるものではなく、また、これらを含まない。以下で述べるように、ある特定の実施形態においては、このような本発明のポリペプチドは、さらに、配列番号243~249のうちのいずれか1つのアミノ酸配列からなるポリペプチドではない。

40

【0024】

50

この点に関して、配列番号243～245は、受容体QRFP Rの断片であり、これらの断片は、WO01/87930において配列番号2、4、および5として開示されている細胞外ドメイン（すなわち、QRFP RのECD3またはECD4を含む受容体断片である）のそれぞれよりも大きい。したがって、一実施形態においては、本発明のポリペプチドは、QRFP RのECD3またはECD4よりも大きい受容体断片、あるいはCLPTM1のECD（以下でさらに述べるように、CLPTM1のECDは、例えば配列番号2または配列番号315に示すように、N末端のメチオニンを含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい）よりも大きい受容体断片を含まない。WO01/87930は、一実施形態において少なくともQRFP Rに相当すると思われる、「ガラニン様G CPR（Gタンパク質結合受容体）」と称する受容体に関するものであるが、この文献では、受容体へのガラニンの結合を調節することに焦点を合わせており、GDF15に対して、受容体が及ぼす作用については開示されていない。配列番号246～249は、WO2005/124342で同定された異なる2つの受容体GPR103の配列（QRFP Rは、GPR103としても知られている）の断片、すなわちそれらの配列に由来するポリペプチドであり、それぞれWO2005/124342の配列番号409、411、422、および426に相当する。本出願の配列番号287および288は、それぞれ、WO2005/124342において配列番号106および107として同定された受容体GPR103の配列に相当する。この文献は、軟骨細胞における軟骨合成を誘導する化合物を同定するためのスクリーニングにおいて、他の多くの受容体配列の中から、これらの受容体配列を用いることに関するものである。この文献には、GDF15に対して、GPR103/QRFP Rが及ぼす作用については開示されていない。したがって、前記ポリペプチドは、QRFP Rの細胞外ドメイン全体、すなわち完全な細胞外ドメインや、細胞外ドメイン3および4（ECD3または4）の断片または一部、あるいはCLPTM1のECDの断片または一部以外に、QRFP RのECD3もしくはECD4、またはCLPTM1のECDに基づく、または由来するが、天然型の分子の配列を基準にして、例えば1つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失などの改変が行われているアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよいし、そのようなポリペプチドを含んでいてもよい。したがって、その配列が、ECDまたはその一部の天然型の配列を基準にして、変異を有していてもよいし、改変されていてもよい、機能的に同等な分子が含まれる。「機能的に同等な」とは、ポリペプチドが、GDF15に結合し、かつ受容体に対してGDF15が及ぼす作用を阻害する能力を保持しているということの意味する。

#### 【0025】

特に、本発明のポリペプチドは、アミノ酸を少なくとも6つ含み、かつ配列番号5、12、もしくは14のいずれか1つに示すアミノ酸配列の、少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む一部、あるいは配列番号5、12、もしくは14のいずれか1つまたは前記一部に対する配列同一性が少なくとも75%であるアミノ酸配列の一部、からなってもよいし、そのような一部を含んでいてもよい、ポリペプチドである。一実施形態においては、配列番号5、12、もしくは14のいずれか1つに示すアミノ酸配列の一部は、少なくとも6つの連続したアミノ酸を含み、かつ配列番号5、12、または14を基準にして、少なくとも2つの連続したアミノ酸、または少なくとも2つの連続していないアミノ酸が欠失している。同様に、配列番号5、12、または14のいずれか1つに対する配列同一性が少なくとも75%であるアミノ酸配列の一部であるポリペプチドは、少なくとも6つの連続したアミノ酸を含み、かつ配列番号5、12、または14に相当する機能的に同等な変異型配列を基準にして、少なくとも2つの連続したアミノ酸、または少なくとも2つの連続していないアミノ酸が欠失していてもよい。

#### 【0026】

したがって、配列番号5、12、または14の一部は、以下でさらに述べるように、同定されてもよく、かつ本発明に係るポリペプチドとして用いられてもよいし、そのようなポリペプチドに用いられてもよい。あるいは、本発明のポリペプチドは、例えば以下で同定するように、該一部のいずれかに対する配列同一性が少なくとも75%であるアミノ酸

配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。

【0027】

配列番号5、12、または14のいずれか1つの一部である、代表的な、または例示的な配列を以下に挙げるが、例えば、配列番号6～9および11（配列番号5に示すQRFP RのECD3の一部）、配列番号13（配列番号12に示すQRFP RのECD4のC末端部分）、および配列番号15～18（配列番号14に示すCLPTM1のECDの一部）が含まれる。本発明のポリペプチドは、配列番号5、12、または14の一部である前記配列に対する配列同一性が少なくとも75%であるアミノ酸配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。さらなる実施形態においては、本発明のポリペプチドは、以下、例えば表1または下記実施例のいずれかに挙げる配列番号5、12、または14の一部である配列のいずれかに対する配列同一性が、少なくとも75%であるアミノ酸配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。

10

【0028】

本発明のさらなる態様は、受容体であるQRFP Rおよび/またはCLPTM1に結合することができる、治療における使用のための結合剤を提供し、該結合剤は、GDF15と該受容体との相互作用を阻害することができる。

【0029】

特に、前記ポリペプチドおよび/または結合剤は、GDF15の高い、または望ましくないレベルに関連する疾患を、治療または予防するためのものである。

【0030】

このような疾患については、以下でより詳細に述べるが、ある好ましい実施形態においては、がん、悪液質、免疫抑制、および骨障害が挙げられる。

20

【0031】

結合剤は、タンパク性分子であってもよいし、非タンパク性分子であってもよいが、以下でさらに述べるように、好ましくは抗体である。

【0032】

好ましい実施形態においては、結合剤は、本明細書で定義される本発明のポリペプチドに結合しない。さらなる好ましい実施形態においては、結合剤は、追加的に、または代替的に、内因性の作動性リガンドが受容体に結合することを阻害せず、ここで、特に、受容体はQRFP Rである。

30

【0033】

本発明のまたさらなる態様は、GDF15の高い、または望ましくないレベルに関連する疾患を治療または予防するための医薬品の製造における、前記定義された本発明のポリペプチドおよび/または前記定義された本発明の結合剤の使用を提供する。

【0034】

本発明によると、薬学的に許容される少なくとも1つの担体または賦形剤と共に、前記定義された本発明のポリペプチドおよび/または前記定義された本発明の結合剤を含む、医薬組成物も提供される。

【0035】

本発明のまたさらなる態様は、前記定義された本発明のポリペプチドおよび前記定義された本発明の結合剤を含むキットを提供する。

40

【0036】

キットの構成要素は、薬学的送達（すなわち、治療目的の使用）のために提供または処方されてもよく、したがって、ポリペプチドまたは結合剤と、1つ以上の薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む、医薬組成物の形態で提供されてもよい。構成要素は、順次投与または同時投与を含む、個別投与のために処方または提供されてもよい。キットは、GDF15の望ましくないレベルに関連する疾患の治療または予防に用いられてもよい。

【0037】

したがって、本発明の別の態様は、GDF15の望ましくないレベルに関連する疾患の

50

治療または予防に、個別に、または順次に、または同時に、用いられる組み合わせ製剤として、前記定義された本発明のポリペプチドおよび前記定義された本発明の結合剤を含む製品を提供する。

【0038】

G D F 1 5 の高い、または望ましくないレベルに関連する疾患を治療または予防する方法も提供され、当該方法は、治療または予防を必要とする被験体に対して、前記定義された本発明のポリペプチドおよび/または前記定義された本発明の結合剤の有効量を投与することを含む。

【0039】

本発明は、また、非医学的に用いられてもよく、したがって、受容体である Q R F P R および/または C L P T M 1 に対して G D F 1 5 が及ぼす作用を阻害する非治療的な方法は、本発明のさらなる態様を形成する。このような方法は、本発明に係る受容体を含む細胞または無細胞系と G D F 1 5 とを、本発明に係るポリペプチドおよび/または結合剤に接触させることを含んでいてもよい。したがって、この態様においては、本発明は、受容体である Q R F P R および/または C L P T M 1 に対して G D F 1 5 が及ぼす作用をインビトロにおいて阻害するための、前記定義された本発明のポリペプチドおよび/または前記定義された本発明の結合剤の使用を提供する。

10

【発明を実施するための形態】

【0040】

「ポリペプチド」なる語は、本明細書において、ペプチド分子、ポリペプチド分子、またはタンパク質分子を含んで広く用いられ、例えばタンパク質/ペプチド/ポリペプチド部が存在するのであれば、他の化学基または化学的部分を含んでいてもよいあらゆるタンパク質分子を含む。上記の通り、本発明のポリペプチドは、アミノ酸残基を少なくとも6つ含む。

20

【0041】

「阻害する」なる語は、防止することのみならず、低減させることも含んでおり、したがって、例えば、受容体のうちのいずれか1つもしくは両方に対して G D F 1 5 が及ぼす作用、または本明細書で述べる治療効果、生物学的効果、生理学的効果もしくは活性などの所定の活性または性質を低減、低下、または降下させる効果を含む。したがって、換言すると、本発明のポリペプチドおよび/または結合剤は、受容体のうちのいずれか1つもしくは両方に対して G D F 1 5 が及ぼす作用を阻害し得るが、このことは、必ずしも、受容体の結合および/または機能を完全に阻害することを伴ったり、必要としたりはせず、単に低減させていればよい。代表的な例としては、受容体への G D F 1 5 の結合、および/あるいは、このような結合によって生じる、またはこのような結合によって誘導もしくは刺激される、受容体機能の効果または態様が、本発明のポリペプチドおよび/または結合剤の非存在下において見られる結合および/または受容体活性もしくは受容体機能と比較して、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、または70%以上低減されてもよい。したがって、受容体への G D F 1 5 の結合が阻害されようがされなかりょうが、受容体における G D F 1 5 の効果は阻害され得るといことがわかるであろう。よって、本発明のポリペプチドは、G D F 1 5 が受容体に結合するか結合しないかに関わらず、受容体に対して G D F 1 5 が及ぼす作用、またはその作用の効果を阻害し得る。

30

40

【0042】

「相互作用」なる語は、受容体のうちの1つもしくは両方に G D F 1 5 が結合すること、および/または受容体の活性もしくは受容体におけるあらゆる効果を、刺激もしくは誘導することを含む。したがって、受容体である Q R F P R および/または C L P T M 1 に対して G D F 1 5 が及ぼす作用を阻害することは、上述したように、受容体への G D F 1 5 の結合を必ずしも阻害することなく、G D F 1 5 が受容体に結合することの(すなわち、結合することによって生じる)効果を阻害することを含む。

【0043】

50

受容体への G D F 1 5 の結合は、下記実施例において説明する結合アッセイなどの、文献において広く説明され、かつ報告されている公知のリガンド結合アッセイを用いて評価または決定され得る。G D F 1 5 が受容体に結合することの効果、または、より具体的には、G D F 1 5 が受容体に結合する際の本発明のポリペプチドもしくは結合剤の効果は、G D F 1 5 および / または本発明のポリペプチドもしくは結合剤が受容体に結合することによって生じる、または誘導される、または刺激される、効果を決定または評価することによって、評価または決定され得る。したがって、例えば、G D F 1 5 が Q R F P R に結合することによって、受容体の内在化および / または細胞表面からの受容体の放出が起こり得る。このような効果は、例えば、Q R F P R 陽性エキソソームまたは Q R F P R 陽性エンドソームの有無またはその量を、下記実施例で説明するように決定することなどにより、エキソソームおよび / または Q R F P R 陽性エンドソームにおける受容体の有無および / またはその量を決定することによって、評価または決定され得る。本発明のポリペプチドまたは結合剤は、このような Q R F P R 陽性エンドソームまたはエキソソームを減少させ得る。

10

#### 【 0 0 4 4 】

受容体活性の他の態様は、G D F 1 5 の存在下で、かつ本発明のポリペプチドまたは結合剤の存在下または非存在下で、評価または決定され得、例えば、G D F 1 5 の免疫抑制効果の低減は、受容体を発現する免疫細胞（NK細胞またはマクロファージなど）が発揮する細胞媒介性細胞毒性の程度または量を決定することによって、評価または決定され得る。あるいは、G D F 1 5 による受容体の刺激によって生じるシグナル伝達の他の態様は、本発明の結合剤またはポリペプチドの存在下または非存在下で、例えば G S K 3 b のリン酸化を評価および比較することによって、評価および比較され得る。

20

#### 【 0 0 4 5 】

「治療する」なる語は、本明細書において広く用いられ、ある疾患を発症している、またはある疾患に罹患している被験体の、疾患または臨床状態を改善または向上させるあらゆる態様を含む。したがって、疾患が完全に治癒することは必要ではなく、「治療する」は、疾患の態様、パラメータ、または症状を改善することを含む。

#### 【 0 0 4 6 】

同様に、「予防する」なる語は、本明細書において広く用いられ、ある疾患を減速または遅延させる、またはある疾患の発症もしくは進行を減速または遅延させる、あらゆる態様を含む。したがって、予防することは、疾患の発症を完全にまたは絶対的に予防することは求められず、疾患の態様、症状、またはパラメータの進行または開始を遅延または減速させることを含み得る。症状、パラメータ、または態様の重症度は低減され得、かつ / または発症時に遅延され得る。特定の実施形態においては、予防することは、がんの転移、より具体的には、骨へのがんの転移を予防する（または低減する）ことを含み得る。他の実施形態においては、疾患の1つ以上の症状または態様の進行または発症が遅延または低減され得、あるいは、実際には発症が防止され得る。例えば、慢性疾患または慢性病（例えば、がん、または関節リウマチなどの炎症性疾患）を発症している被験体の悪液質は、発症が防止され得るか、または、そのような悪液質は、遅延され得る、かつ / もしくは重症度が低減され得る。

30

40

#### 【 0 0 4 7 】

上記の通り、本発明のポリペプチドは、受容体の細胞外ドメイン（E C D）に基づくものであって、天然型 E C D の断片のみならず、天然型 E C D の配列変異体（E C D の一部由来の配列変異体を含む）も含み得る。

#### 【 0 0 4 8 】

したがって、別の定義では、本発明のポリペプチドは、G D F 1 5 に結合して、受容体である Q R F P R および / または C L P T M 1 に対して G D F 1 5 が及ぼす作用を阻害することができるポリペプチドであってもよく、該ポリペプチドは、

配列 ( a )  $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$  ( 式 I ) であって、

式中、

50

$X_1$  は芳香族アミノ酸であり、  
 $X_2$  は脂肪族アミノ酸であり、  
 $X_5$  は塩基性アミノ酸であり、  
 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_8$ 、および $X_9$ は、それぞれ独立して任意のアミノ酸であってもよい、配列（配列番号337）を有する、または含む、ポリペプチド、あるいは、  
 配列（b） $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ （式II）であって、  
 式中、  
 $X_1$  は、DまたはEなどの酸性アミノ酸であり、  
 $X_2$  は、K、R、またはHなどの塩基性アミノ酸であって、好ましくはKまたはRであり、  
 $X_3$  は、DまたはEなどの酸性アミノ酸であり、  
 $X_4$  は、F、W、またはYなどの芳香族アミノ酸であり、  
 $X_5$  は、DまたはEなどの酸性アミノ酸であり、  
 $X_6$  は、DまたはEなどの酸性アミノ酸であり、  
 $X_7$  は、L、V、I、A、またはMなどの脂肪族アミノ酸であって、好ましくはL、V、またはIであり、  
 $X_8$  は、A、S、またはTであり、  
 $X_9$  は、L、V、I、A、またはMなどの脂肪族アミノ酸であって、好ましくはL、V、またはIであり、  
 $X_{10}$  は、R、K、またはHなどの芳香族アミノ酸であって、好ましくはRまたはKである、配列（配列番号404）を有する、または含む、ポリペプチドである。

10

20

30

40

50

## 【0049】

芳香族アミノ酸は、独立して、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、tert.-ブチルグリシン、シクロヘキシルアラニン、tert.-ブチルフェニルアラニン、ピフェニルアラニン、およびトリtert.-ブチルトリプトファンから選択され得る。

## 【0050】

塩基性アミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、オルニチン（Orn）、メチルリジン（MeK）、およびアセチルリジン（AcK）から選択され得る。

## 【0051】

脂肪族アミノ酸は、独立して、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、バリン（V）、アラニン（A）、メチオニン（M）、およびノルロイシン（Nor）から選択され得る。

## 【0052】

より具体的な実施形態においては、式Iのポリペプチドにおいて、

$X_1$  は、F、W、またはYであり、

$X_2$  は、L、V、I、A、またはMであって、好ましくはL、V、またはIであり、

$X_5$  は、K、R、またはHであって、好ましくはKまたはRである（配列番号338）。

## 【0053】

追加的に、または代替的に、式Iのポリペプチドにおいて、

$X_3$  は、芳香族アミノ酸であって、好ましくはF、W、またはYであり、かつ/あるいは、

$X_4$  は、酸性アミノ酸であって、好ましくはEまたはDである（配列番号339～344）。

## 【0054】

さらに、追加的に、または代替的に、式Iのポリペプチドにおいて、

$X_6$  は、酸性アミノ酸であって、好ましくはEまたはDであり、かつ/あるいは、

$X_7$  は、塩基性アミノ酸であって、好ましくはK、R、またはHであり、より好ましくはKまたはRである（配列番号345～369）。

## 【0055】

さらに、追加的に、または代替的に、式Iのポリペプチドにおいて、

$X_8$ は、脂肪族アミノ酸であって、好ましくはL、V、I、A、またはMであり、より好ましくはL、V、またはIであり、かつ/あるいは、

$X_9$ は、任意のアミノ酸であって、好ましくはCである（配列番号370～402）。

## 【0056】

特定の実施形態においては、式Iのポリペプチドは、配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ （配列番号403）を有していてもよいし、含んでいてもよい、ポリペプチドであって、

$X_1$ は、F、W、またはYであり、

$X_2$ は、L、V、またはIであり、

$X_3$ は、F、W、またはYであり、

$X_4$ は、DまたはEであり、

$X_5$ は、K、R、またはHであり、

$X_6$ は、DまたはEであり、

$X_7$ は、K、R、またはHであり、

$X_8$ は、L、V、またはIであり、

$X_9$ は、Cである、ポリペプチドである。

10

## 【0057】

さらなる実施形態においては、式Iのポリペプチドにおいて、配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ は、その一方側または両側に並んで、1～10個のアミノ酸が位置しており、好ましくは、該並んだアミノ酸配列は、ヘリックスまたはシートを形成できるアミノ酸を含む。

20

## 【0058】

このような式Iのポリペプチドの代表的な実施形態においては、残基 $X_1$ に並んで、ヘリックスを形成できるアミノ酸を含むアミノ酸配列が位置し、かつ/または、残基 $X_9$ に並んで、シートを形成できるアミノ酸を含むアミノ酸配列が位置しており、好ましくは、 $X_9$ に並んで、Cが位置している。

## 【0059】

式Iの特定の実施形態においては、 $X_1$ は、DまたはEであり、 $X_2$ は、K、R、またはHであり、 $X_3$ は、DまたはEであり、 $X_4$ は、F、W、またはYであり、 $X_5$ は、DまたはEであり、 $X_6$ は、DまたはEであり、 $X_7$ は、L、V、またはIであり、 $X_8$ は、A、S、またはTであり、 $X_9$ は、L、V、またはIであり、 $X_{10}$ は、R、K、またはHである（配列番号405）。

30

## 【0060】

本発明に係るポリペプチドの任意の態様の特定の実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号210に示す配列（FLYEK）を含んでいてもよい。

## 【0061】

本発明に係るポリペプチドの任意の態様のさらなる実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号211に示す残基配列（配列番号1の残基255～257のWTSに相当）を含んでいてもよい。

40

## 【0062】

上記の通り、代表的な実施形態においては、本発明のポリペプチドは、配列番号5、12、または14のECD配列のうちのいずれか1つの一部であるか、または一部に相当する、配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。このような配列は、配列番号5、12、または14のアミノ酸配列のうちのいずれか1つの一部に対する配列同一性が少なくとも75%であってもよく、例えば、QRFPRのECD3に由来する配列である配列番号11、配列番号7、または配列番号6、8、もしくは9、QRFPRのECD4に由来する配列である配列番号13、CLPTM1のECDに由来する配列である配列番号17、配列番号18、配列番号15（YISEHEH）、または配列番号16（LFWEQH

50

)などが挙げられる。

【0063】

さらなる実施形態においては、本発明のポリペプチドは、配列番号15に示す配列(Y I S E H E H)、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、および配列番号16に示す配列(L F W E Q H)、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、を含んでいてもよい。

【0064】

本発明に係る他の代表的なポリペプチドは、下記表1に挙げたようなアミノ酸配列、またはそのような配列のうちのいずれかの配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、または、該当する場合は、そのような配列のうちのいずれかの配列の一部であって、少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む、配列、を有していてもよいし、含んでいてもよい。

【0065】

【表 1】

表 1

配列番号	ポリペプチド配列
配列番号 2 0	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQ
配列番号 2 1	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVH
配列番号 2 2	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPV
配列番号 2 3	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSP
配列番号 2 4	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSP
配列番号 2 5	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWT
配列番号 2 6	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEEW
配列番号 2 7	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLEE
配列番号 2 8	QQLEIKYDFLYEKEHEICCLE
配列番号 2 9	QQLEIKYDFLYEKEHEICCL
配列番号 3 0	QQLEIKYDFLYEKEHEICC
配列番号 3 1	QQLEIKYDFLYEKEHEIC
配列番号 3 2	QLEIKYDFLYEKEHEICC
配列番号 3 3	LEIKYDFLYEKEHEICCL
配列番号 3 4	EIKYDFLYEKEHEICCLE
配列番号 3 5	IKYDFLYEKEHEICCLEE
配列番号 3 6	KYDFLYEKEHEICCLEEW
配列番号 3 7	YDFLYEKEHEICCLEEWT
配列番号 3 8	DFLYEKEHEICCLEEWTSP
配列番号 3 9	QLEIKYDFLYEKEHEI
配列番号 4 0	LEIKYDFLYEKEHEIC
配列番号 4 1	EIKYDFLYEKEHEICC
配列番号 4 2	IKYDFLYEKEHEICCL
配列番号 4 3	KYDFLYEKEHEICCLE
配列番号 4 4	YDFLYEKEHEICCLEE
配列番号 4 5	DFLYEKEHEICCLEEW
配列番号 4 6	QLEIKYDFLYEKEHEIC
配列番号 4 7	LEIKYDFLYEKEHEIC
配列番号 4 8	EIKYDFLYEKEHEIC
配列番号 4 9	IKYDFLYEKEHEIC
配列番号 5 0	KYDFLYEKEHEIC
配列番号 5 1	YDFLYEKEHEIC
配列番号 5 2	DFLYEKEHEIC
配列番号 5 3	QLEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 5 4	LEIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 5 5	EIKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 5 6	IKYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 5 7	KYDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 5 8	YDFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 5 9	DFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 6 0	FLYEKEHEICCLEEWTSPVHQK
配列番号 6 1	DFLYEKEHEICCLEEWTSPVHQ
配列番号 6 2	YDFLYEKEHEICCLEEWTSPVH
配列番号 6 3	KYDFLYEKEHEICCLEEWTSPV
配列番号 6 4	IKYDFLYEKEHEICCLEEWTSP

10

20

30

40

配列番号65	E I K Y D F L Y E K E H I C C L E E W T S
配列番号66	L E I K Y D F L Y E K E H I C C L E E W T
配列番号67	Q L E I K Y D F L Y E K E H I C C L E E W
配列番号68	F L Y E K E H I C C L E E W T S P V H Q
配列番号69	F L Y E K E H I C C L E E W T S P V H
配列番号70	F L Y E K E H I C C L E E W T S P V
配列番号71	F L Y E K E H I C C L E E W T S P
配列番号72	F L Y E K E H I C C L E E W T S
配列番号73	F L Y E K E H I C C L E E W T
配列番号74	F L Y E K E H I C C L E E W
配列番号75	F L Y E K E H I C C L E E
配列番号76	F L Y E K E H I C C L E
配列番号77	F L Y E K E H I C C L
配列番号78	F L Y E K E H I C C
配列番号79	M M I E Y S N F E K E Y D D V T I K
配列番号80	M I E Y S N F E K E Y D D V T I K
配列番号81	I E Y S N F E K E Y D D V T I K
配列番号82	E Y S N F E K E Y D D V T I K
配列番号83	Y S N F E K E Y D D V T I K
配列番号84	S N F E K E Y D D V T I K
配列番号85	N F E K E Y D D V T I K
配列番号86	F E K E Y D D V T I K
配列番号87	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D W T
配列番号88	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D W
配列番号89	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D
配列番号90	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G
配列番号91	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y
配列番号92	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V
配列番号93	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L
配列番号94	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D
配列番号95	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H
配列番号96	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q
配列番号97	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E
配列番号98	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W
配列番号99	Y I S E H E H F T D F N A T S A L F
配列番号100	Y I S E H E H F T D F N A T S A L
配列番号101	Y I S E H E H F T D F N A T S A
配列番号102	Y I S E H E H F T D F N A T S
配列番号103	Y I S E H E H F T D F N A T
配列番号104	Y I S E H E H F T D F N A
配列番号105	Y I S E H E H F T D F N
配列番号106	Y I S E H E H F T D F
配列番号107	Y I S E H E H F T D
配列番号108	Y I S E H E H F T
配列番号109	Y I S E H E H F
配列番号110	I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D W T S
配列番号111	S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D W T S
配列番号112	E H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D W T S
配列番号113	H E H F T D F N A T S A L F W E Q H D L V Y G D W T S

10

20

30

40

配列番号114	EHFTDFNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号115	HFTDFNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号116	FTDFNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号117	TDFNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号118	DFNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号119	FNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号120	NATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号121	ATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号122	TSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号123	SALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号124	ALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号125	LFWEQHDLVYGDWTS
配列番号126	LFWEQHDLVYGDWT
配列番号127	LFWEQHDLVYGDW
配列番号128	LFWEQHDLVYGD
配列番号129	LFWEQHDLVYG
配列番号130	LFWEQHDLVY
配列番号131	LFWEQHDLV
配列番号132	LFWEQHDL
配列番号133	LFWEQH
配列番号134	FTDFNATSALFWEQH
配列番号135	TDFNATSALFWEQH
配列番号136	DFNATSALFWEQH
配列番号137	FNATSALFWEQH
配列番号138	NATSALFWEQH
配列番号139	ATSALFWEQH
配列番号140	TSALFWEQH
配列番号141	SALFWEQH
配列番号142	ALFWEQH
配列番号143	ISEHEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号144	SEHEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号145	EHEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号146	HEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号147	EHFTDFNATSALFWEQH
配列番号148	HFTDFNATSALFWEQH
配列番号149	FTDFNATSALFWEQH
配列番号150	TDFNATSALFWEQH
配列番号151	DFNATSALFWEQH
配列番号152	FNATSALFWEQH
配列番号153	NATSALFWEQH
配列番号154	ATSALFWEQH
配列番号155	SALFWEQH
配列番号156	ALFWEQH
配列番号157	ISEHEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号158	SEHEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号159	EHEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号160	HEHFTDFNATSALFWEQH
配列番号161	EHFTDFNATSALFWEQH
配列番号162	HFTDFNATSALFWEQH

10

20

30

40

配列番号163	FTDFNATSALFWEQHDLVYGDW
配列番号164	TDFNATSALFWEQHDLVYGDWT
配列番号165	DFNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号166	SALFWEQHDLVYGDW
配列番号167	TSALFWEQHDLVYGD
配列番号168	ATSALFWEQHDLVYG
配列番号169	NATSALFWEQHDLVY
配列番号170	FNATSALFWEQHDLV
配列番号171	DFNATSALFWEQHDL
配列番号172	TDFNATSALFWEQHD
配列番号173	FTDFNATSALFWEQH
配列番号174	GIEYSNFEKEYDDVTIK
配列番号175	QQLEIKYDFLYEKEHI
配列番号176	QQLEIKYDFLYEKEH
配列番号177	QLEIKYDFLYEKEH
配列番号178	LEIKYDFLYEKEHICC
配列番号179	LEIKYDFLYEKEHI
配列番号180	LEIKYDFLYEKEH
配列番号181	QRLEIKYDFLYEKEHICC
配列番号182	QRLEIKYDFLYEKEHIC
配列番号183	QRLEIKYDFLYEKEHI
配列番号184	QRLEIKYDFLYEKEH
配列番号185	RLEIKYDFLYEKEHICC
配列番号186	LEIKYDFLYEKEHICC
配列番号187	RLEIKYDFLYEKEHIC
配列番号188	RLEIKYDFLYEKEHI
配列番号189	RLEIKYDFLYEKEH
配列番号190	SALFWEQHDLVYGDWT
配列番号191	FNATSALFWEQHDLVYGDWTSGEN
配列番号192	FNATSALFWEQHDLVYGDWTSGE
配列番号193	FNATSALFWEQHDLVYGDWTSG
配列番号194	FNATSALFWEQHDLVYGDWTS
配列番号195	FNATSALFWEQHDLVYGDWT
配列番号196	NATSALFWEQHDLVYGDWTSGEN
配列番号197	ATSALFWEQHDLVYGDWTSGEN
配列番号198	TSALFWEQHDLVYGDWTSGEN
配列番号199	SALFWEQHDLVYGDWTSGEN
配列番号200	YFNDYWNLQ
配列番号201	YPIIYFNDYWNLQKDYY
配列番号202	YPIIYFNDYWNLQKDY
配列番号203	YPIIYFNDYWNLQKD
配列番号204	YPIIYFNDYWNLQK
配列番号205	YPIIYFNDYWNLQ
配列番号206	PIIYFNDYWNLQKDYY
配列番号207	IYFNDYWNLQKDYY
配列番号208	IYFNDYWNLQKDYY
配列番号209	YFNDYWNLQKDYY
配列番号210	FLYEK
配列番号211	WTS

10

20

30

40

配列番号 2 1 2	PKDT
配列番号 2 1 3	APRVASRNLFPKDT
配列番号 2 1 4	PRVASRNLFPKDT
配列番号 2 1 5	RVASRNLFPKDT
配列番号 2 1 6	VASRNLFPKDT
配列番号 2 1 7	ASRNLFPKDT
配列番号 2 1 8	SRNLFPKDT
配列番号 2 1 9	RNLFPKDT
配列番号 2 2 0	NLFPKDT
配列番号 2 2 1	LFPKDT
配列番号 2 2 2	FPKDT
配列番号 2 2 3	PRVASRNLFPKDTL
配列番号 2 2 4	VASRNLFPKDTLM
配列番号 2 2 5	ASRNLFPKDTLMN
配列番号 2 2 6	SRNLFPKDTLMNL
配列番号 2 2 7	RNLFPKDTLMNLH
配列番号 2 2 8	NLFPK DTLMNLHV
配列番号 2 2 9	LFPKDTLMNLHVY
配列番号 2 3 0	FPKDTLMNLHVYI
配列番号 2 3 1	PKDTLMNLHVYIS
配列番号 2 3 2	PKDTLMNLHVYI
配列番号 2 3 3	PKDTLMNLHVY
配列番号 2 3 4	PKDTLMNLHV
配列番号 2 3 5	PKDTLMNLH
配列番号 2 3 6	PKDTLMNL
配列番号 2 3 7	PKDTLMN
配列番号 2 3 8	PKDTLM
配列番号 2 3 9	PKDTL
配列番号 2 5 0	AAAQEADGARS AVVAAGGGSG
配列番号 2 5 1	SGQVTSNGS IGRDPPAETQPG
配列番号 2 5 2	QNPPAQ PAPANAWQVIKGV LFG
配列番号 2 5 3	RIFI IWA I SSWFRRGPAPQDG
配列番号 2 5 4	QAGPGGAPRVASRNLFPKDTG
配列番号 2 5 5	LMNLHVYI SEHEHFTDFNATG
配列番号 2 5 6	SALFWEQHDLVYGDWTSGENG
配列番号 2 5 7	SDGCYEHFAELDIPQSVQQNG
配列番号 2 5 8	GS IYI HVYFTKSGFHPDPRQG
配列番号 2 5 9	KALYRRLATVHMSRMINKYKG
配列番号 2 6 0	RRRFQKTKNLLTGETEADPEG
配列番号 2 6 1	MIKRAEDYGPVEVISHWHPNG
配列番号 2 6 2	ITINI VDDHTPWVKGSVPPPG
配列番号 2 6 3	LDQYVKFDAVSGDYYP I IYFG
配列番号 2 6 4	NDYWNLQKDYPINESLASLG
配列番号 2 6 5	PLRV SFCPLSLWRWQLYAAQG
配列番号 2 6 6	STKSPWNFLGDELYEQSDEEG
配列番号 2 6 7	YEQSDEEQDSVKVALLETNPG
配列番号 2 6 8	LWRWQLYAAQSTKSPWNFLGG
配列番号 2 6 9	YPINESLASLPLRV SFCPLSG
配列番号 2 7 0	GDYYP I IYFNDYWNLQKDY YG

10

20

30

40

配列番号271	WQVIKGVLFRI F I I W A I S S W G
配列番号272	RNLFPKDTLMNLHVY I S E H E G
配列番号273	FTDFNATSALFWEQHDLVYGG
配列番号289	AAAEADGARS AVVAAGGGS
配列番号290	SGQVTSNGS IGRDPPAETQP
配列番号291	QNPPAQ P A P N A W Q V I K G V L F
配列番号292	R I F I I W A I S S W F R R G P A P Q D
配列番号293	QAGPGGAPRVASRNLFPKDT
配列番号294	LMNLHVY I S E H E H F T D F N A T
配列番号295	SALFWEQHDLVYGDWTSGEN
配列番号296	SDGCYEHFAELDIPQSVQQN
配列番号297	GSIYIHVYFTKSGFHPDPRQ
配列番号298	KALYRRLATVHMSRMINKYK
配列番号299	RRRFQKTKNLLTGETEADPE
配列番号300	MIKRAEDYGPVEVISHWHPN
配列番号301	ITINIVDDHTPWVKGSVPPP
配列番号302	LDQYVKFDAVSGDYYP I I Y F
配列番号303	NDYWNLQKDYYPINESLASL
配列番号304	PLRVSF C P L S L W R W Q L Y A A Q
配列番号305	STKSPWNFLGDELYEQSDEE
配列番号306	YEQSDEEQDSVKVALLETNP
配列番号307	LWRWQLYAAQSTKSPWNFLG
配列番号308	YPINESLASLPLRVSF C P L S
配列番号309	GDYYP I I Y F N D Y W N L Q K D Y Y
配列番号310	WQVIKGVLFRI F I I W A I S S W
配列番号311	RNLFPKDTLMNLHVY I S E H E
配列番号312	FTDFNATSALFWEQHDLVYGG
配列番号316	QLEIKYDFLYEKEHEICCLEE
配列番号317	QLEIKYDFLYEKEHEICCLE
配列番号318	QLEIKYDFLYEKEHEICCL

10

20

30

## 【0066】

したがって、本発明は、GDF15とその受容体との相互作用を阻害することによって、被験体におけるGDF15の活性または効果を低減することができる、治療薬（結合剤およびポリペプチド）を提供する。このような薬剤は、GDF15の受容体であるQRFP RまたはCLPTM1の細胞外ドメイン、あるいはECDに基づく、もしくはECDに由来するポリペプチド、またはその一部から得られる部分、特に可溶性の部分と、これらのGDF15受容体のうちの一方の細胞外ドメインに特異的に結合する結合剤と、からなる群から選択される。

## 【0067】

QRFP RまたはCLPTM1の細胞外ドメインの一部に対する配列同一性が高いポリペプチドのことを、GDF15受容体の細胞外ドメインに「基づいている」または「由来している」と言ってもよいし、GDF15受容体の細胞外ドメインに「基づいている」または「由来している」配列を有する、もしくは含むと言ってもよい。したがって、このようなポリペプチドは、ECDまたはその一部に相当するが、配列番号5、12、または14に示す天然型ヒトECDの配列と比較して、配列の変異または改変をいくらか含む、配列を含んでいてもよいし、有していてもよい。よって、「相当する」配列は、配列番号5、12、または14のECDに含まれる配列（すなわち、該配列の一部）と相関関係があってもよいし、整合されていてもよいが、該配列を基準にして、1つ以上の配列の変異を含み得る。

40

## 【0068】

50

本発明のポリペプチドは、他の種由来の受容体 Q R F P R もしくは C L P T M 1 から得られる、またはこれらに由来する、変異体またはホモログを含んでいてもよい。したがって、ポリペプチドは、他の種由来の、特に、イヌまたはマウスなどの他の哺乳動物種由来の、同等な、または相当する受容体の E C D に由来していてもよいし、それらに基づくものであってもよい。

**【 0 0 6 9 】**

本発明で同定された受容体は、いずれも膜貫通タンパク質であるので、本発明の様々な態様の好ましい実施形態においては、本明細書に記載のポリペプチドは、このタンパク質の1つまたは複数の細胞外ドメインの細胞外にある一部であるか、またはこの一部を含むものである。したがって、好ましくは、ポリペプチドは、全長タンパク質ではなく、また全長タンパク質を含まない。特に、全長の野生型受容体タンパク質でも天然型受容体タンパク質でもなく、またこのようなタンパク質を含まないものであり、例えば、ポリペプチドは、配列番号1または2に示す配列も、マウス、ラットなどの他の種由来の同等の配列も有さない（または、このような配列からなるものではない）。他の実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号287に示す配列も配列番号288に示す配列も有さず、また含まない。

**【 0 0 7 0 】**

ある好ましい実施形態においては、ポリペプチドは、受容体（すなわち、受容体配列に相当するアミノ酸配列）に由来するか、またはそれから得られるアミノ酸配列であって、それぞれの受容体タンパク質の細胞外ドメインの一部を形成しない、アミノ酸配列を含まない。すなわち、アミノ酸配列は、それぞれの受容体タンパク質の膜貫通ドメインおよび/または細胞内ドメインを形成するものである。具体的には、好ましい実施形態においては、Q R F P R に由来するポリペプチドは、Q R F P R の N 末端および/または C 末端から細胞外ドメインまでの残基（アミノ酸配列）、あるいはその一部、を含み得ず、特に、Q R F P R の N 末端および/または C 末端から E C D 3 および/または E C D 4 の残基（アミノ酸配列）（すなわち、配列番号1内の、N末端またはC末端から、配列番号5または12で表される配列までの残基/配列、あるいはその一部）を含み得ない。また、C L P T M 1 に由来するポリペプチドは、C L P T M 1 の C 末端から細胞外ドメインまでの残基（アミノ酸配列）、またはその一部（すなわち、配列番号2内の、C末端から、配列番号14で表される配列までの残基/配列、またはその一部）を含み得ない。したがって、ある実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号1の1~183、213~292、または312~431のアミノ酸を含まない（Q R F P R に由来するポリペプチドの場合）。他の実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号2の355~669のアミノ酸を含まない（C L P T M 1 に由来するポリペプチドの場合）。

**【 0 0 7 1 】**

本発明の様々な態様のうちのいずれかにおけるある実施形態においては、ポリペプチドは、天然型細胞外ドメインの全長アミノ酸配列からなるものではない。すなわち、このような実施形態においては、ポリペプチドは、Q R F P R の E C D 3 および E C D 4、または C L P T M 1 の E C D からなるものではない。したがって、このような一実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号5、12、または14のいずれか1つの配列からなるものではない。他の実施形態においては、ポリペプチドは、Q R F P R 配列または C L P T M 1 配列に由来せず、またこれらの配列に相当しない1つ以上の追加的なアミノ酸配列と、天然型細胞外ドメインの全長とを含んでいてもよい。換言すると、ポリペプチドは、受容体である天然型 Q R F P R または天然型 C L P T M 1 由来の配列ではないアミノ酸配列の1つ以上、より具体的には、天然型受容体におけるそれぞれの E C D に並んで位置している、または隣接している、配列ではないアミノ酸配列の1つ以上と、Q R F P R の E C D 3 もしくは E C D 4、および/または C L P T M 1 の E C D（または、実際には、このような E C D のうちのいずれかの一部）とからなるものであってもよい。この場合、追加的なアミノ酸配列は、アミノ酸を2つ以上含んでいてもよい。このような実施形態においては、ポリペプチドは、Q R F P R の E C D 3 および/もしくは E C D 4 またはその一

部、ならびに／あるいは、CLPTM1のECDまたはその一部に由来する、またはそれに相当する配列以外の、受容体である天然型／野生型QRFPRまたはCLPTM1に由来する、またはそれに相当するアミノ酸配列を含有しないということがわかるであろう。

【0072】

したがって、より長いアミノ酸配列の一部として、ポリペプチドがECDまたはその一部を含む、ある実施形態においては、ECDまたはその一部の配列は、「非天然型」配列構造に含まれていてもよい。すなわち、ECDまたはその一部に相当するアミノ酸配列の一方側または両側に並んで位置する配列は、ECDまたはその一部が得られるまたは由来する、あるいは相当する全長天然型受容体において（例えば、配列番号1（全長QRFPR）またはCLPTM1（全長CLPTM1）において）、ECDまたはその一部の配列（例えば、配列番号5、12、または14、あるいはその一部）に並んで位置する配列ではない。したがって、ある実施形態においては、（N末端および／またはC末端から）配列番号5または12に並んで位置する、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つの連続したアミノ酸は、配列番号1由来のものではない。他のある実施形態においては、（C末端から）配列番号14に並んで位置する、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つの連続したアミノ酸は、配列番号2由来のものではない。このことから、並んで位置するアミノ酸は、配列番号1において配列番号5、12で定義される細胞外ドメイン、または配列番号2において配列番号14で定義される細胞外ドメインに隣接しているアミノ酸であることが理解されるであろう。

10

【0073】

本発明の様々な態様のうちのいずれかにおけるまたさらなる実施形態においては、本発明のポリペプチドは、QRFPRのECD3および／またはECD4の一部、ならびに／あるいはCLPTM1のECDの一部であってもよいし（すなわち、このような一部からなるものであってもよいし）、このような一部を含むものであってもよい。特定の実施形態においては、このような一部は、ECDから、少なくとも2つの連続したアミノ酸、または少なくとも2つの連続していないアミノ酸が欠失したものであってもよい。したがって、代表的な実施形態においては、本発明に係るポリペプチドは、1つ以上（すなわち、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはそれ以上）のアミノ酸（連続していてもよいし、連続してなくてもよい）が欠失した、配列番号5、12、または14に相当する、またはこれらの配列である、アミノ酸配列からなるものであってもよいし、このようなアミノ酸配列を含むものであってもよい。換言すると、欠失させたアミノ酸は、配列番号5、12、または14のN末端および／またはC末端に見られるものであってもよい。

20

30

【0074】

上記の通り、ある実施形態においては、ポリペプチド配列は、配列番号243～249のいずれでもない。またさらなる実施形態においては、ポリペプチド配列は、配列番号287でも、配列番号288でもない。

【0075】

したがって、ある特定の実施形態においては、本発明は、GDF15に結合して、受容体であるQRFPRおよび／またはCLPTM1に対してGDF15が及ぼす作用を阻害することができるポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、

40

(i) 配列番号5（QRFPRの細胞外ドメイン3）、配列番号12（QRFPRの細胞外ドメイン4）、もしくは配列番号14（CLPTM1の細胞外ドメイン）に示すアミノ酸配列を含む、ポリペプチドであって、前記アミノ酸配列は、受容体である天然型のQRFPRもしくはCLPTM1において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、前記アミノ酸配列の端部のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチドであるか、または、配列番号5、12、もしくは14のアミノ酸配列ではないが、配列番号5、12、もしくは14に対する配列同一性が少なくとも75%である、アミノ酸配列を含む、ポリペプチドであって、前記アミノ酸配列は、場合によっては、受容体である天然型のQRFPRもしくはCLPTM1において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、前記アミノ酸配列の端部のいずれか、もしくは両方に並んで位置していな

50

い、ポリペプチド、あるいは、

( i i ) 配列番号 5、12、もしくは 14 の一部であるか、またはそのような一部を含む、ポリペプチドであって、該一部は、配列番号 5、12、もしくは 14 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸を含んでおり、( i ) 配列番号 5、12、もしくは 14 における少なくとも 2 つの連続したアミノ酸、もしくは少なくとも 2 つの連続していないアミノ酸が欠失している、かつ/または、( i i ) 受容体である天然型の Q R F P R もしくは C L P T M 1 において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、該一部の末端のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチド、あるいは、

( i i i ) 配列番号 5、12、もしくは 14 における少なくとも 6 つの連続したアミノ酸に相当する少なくとも 6 つのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 5、12、もしくは 14 における同等のアミノ酸配列に対する配列同一性が少なくとも 75 % である、ポリペプチドであって、( i ) 配列番号 5、12、もしくは 14 における少なくとも 2 つの連続したアミノ酸、もしくは少なくとも 2 つの連続していないアミノ酸が欠失している、かつ/または、( i i ) 受容体である天然型の Q R F P R もしくは C L P T M 1 において該アミノ酸配列に並んで位置するアミノ酸配列が、配列番号 5、12、もしくは 14 に相当する前記アミノ酸配列の末端のいずれか、もしくは両方に並んで位置していない、ポリペプチド、である。

10

【 0 0 7 6 】

上記の通り、Q R F P R の細胞外ドメイン 3 および 4 に由来する配列を含むペプチドは、インビトロにおいて G D F 1 5 と相互作用することが見出されており、このようなペプチドは、G D F 1 5 に結合できるだけでなく、Q R F P R と G D F 1 5 との相互作用を阻害できるということを示すデータが、下記実施例において提供されている。

20

【 0 0 7 7 】

上記式 I または式 I I に示す配列を有する、または含む、ポリペプチドは、それぞれ、Q R F P R の E C D 3 および E C D 4 に由来するポリペプチドであるか、または E C D 3 および E C D 4 に基づくポリペプチドであってもよい。

【 0 0 7 8 】

上記の通り、G D F 1 5 は、Q R F P R の細胞外ドメイン 3 および 4 の両方と、同時に結合することが見出されている。したがって、Q R F P R の G D F 1 5 結合部位は、Q R F P R の細胞外ドメイン 3 および 4 の両方の一部を含むと考えられる。したがって、本発明に係るポリペプチドは、配列番号 5、6 ~ 9、もしくは 11 のいずれか 1 つに示す第 1 の配列、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも 75 % である配列と、配列番号 12 もしくは 13 に示す第 2 の配列、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも 75 % である配列とを含む、Q R F P R の細胞外ドメイン 3 および 4 の両方に由来する配列を含んでいてもよい。さらなる特定の実施形態においては、該第 1 の配列および第 2 の配列は、リンカーによって区別されている。それらは、いずれの順番で存在していてもよい。好ましい実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号 178 または 179 に示す第 1 の配列と、配列番号 12 に示す第 2 の配列とを含んでいてもよい。

30

【 0 0 7 9 】

G D F 1 5 は、Q R F P R を含有するエキソソームの放出を誘導すること、または Q R F P R の内在化を誘導することによって、細胞表面における Q R F P R の発現を下方制御するように作用する。しかしながら、Q R F P R は、作動効果を有し、Q R F P R を介したシグナル伝達を誘導する他のリガンド (例えば、P 5 1 8 および R F アミド 4 3 ) を有する。本発明の好ましい実施形態においては、Q R F P R の細胞外ドメインに由来する配列を有するポリペプチド、またはそのような配列を含むポリペプチドは、Q R F P R アゴニストに結合せず、かつ Q R F P R アゴニストの、Q R F P R を介したシグナル伝達を活性化する能力を低減させない。

40

【 0 0 8 0 】

C L P T M 1 の細胞外ドメインに由来する配列を含むポリペプチドも、G D F 1 5 と相互作用することが見出されており、G D F 1 5 とその受容体との相互作用を阻害するの

50

用いられ得る。特定の実施形態においては、このようなポリペプチドは、配列番号17または18に示す配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。Q R F P Rと同様に、受容体C L P T M 1は、2つのG D F 15結合部位を含み得、すなわち、G D F 15は、受容体C L P T M 1内に、または、より具体的にはそのE C D内に、接点を少なくとも2つ有していてもよい。特に、発明者らは、現在のところ、下記実施例において報告する研究に基づいて、2つのG D F 15結合部位またはG D F 15との接点は、配列番号14（ヒトC L P T M 1のE C D）の108～138のアミノ酸である配列番号17に存在していると考えている。これらは、配列番号15（Y I S E H E H）および16（L F W E Q H）として提供されるが、これらの結合部位の一部であるか、一部を含むか、または一部からなるものである。本発明の代表的なポリペプチドは、これらの配列のうち的一方もしくは両方に相当する、または基づく、または由来する、配列を含んでいてもよい。結合部位を両方含む代表的なポリペプチドは、配列番号18またはそれに対する配列同一性が少なくとも75%である配列を有しているか、または含んでいる。本発明の代表的なポリペプチドは、配列番号14の123～138のアミノ酸である、配列番号18に示す配列を有するポリペプチド、またはこの配列を含むポリペプチドも含み、これは、推定上の結合部位を1つ含んでいる。

10

#### 【0081】

さらなる実験によって、C L P T M 1には、G D F 15の他の結合部位または追加的な結合部位があるということが示唆されている（例えば、実施例19を参照）。したがって、このような追加的な結合部位のうちの一つは、配列番号200（Y F N D Y W N L Q）で表されてもよいし、この配列を含んでいてもよい。本発明の代表的なポリペプチドは、この配列に相当する、または基づく、または由来する、配列を含んでいてもよい。したがって、代表的なポリペプチドは、配列番号200、またはそれに対する配列同一性が少なくとも75%である配列を有しているか、または含んでおり、例えば、ポリペプチドは、配列番号201～209のいずれか一つ、またはそれに対する配列同一性が少なくとも75%である配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。

20

#### 【0082】

一実施形態においては、C L P T M 1から得られる、またはC L P T M 1に由来する、ポリペプチドは、C L P T M 1への内因性のリガンドの結合を阻害せず、かつ/または、内因性のリガンドが受容体を活性化する、または刺激することを阻害しない。しかしながら、他の実施形態においては、内因性のリガンドが結合すること、および/または内因性のリガンドが受容体を活性化する、もしくは刺激することが、望ましい場合、または有利な場合がある。

30

#### 【0083】

さらに、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の配列を含む、Q R F P Rから得られるアミノ酸配列、またはQ R F P Rに由来するアミノ酸配列、および本明細書に記載の配列を含む、C L P T M 1から得られるアミノ酸配列、またはC L P T M 1に由来するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

#### 【0084】

本発明は、異なる受容体および/または異なるE C Dから得られてもよいし、それらに由来していてもよく、大きさが異なってもよく、またG D F 15の結合部位を1つ以上を含有していてもよい、様々な異なるポリペプチドを提供するということがわかるであろう。したがって、異なるポリペプチドのレパートリー、またはパネル、またはライブラリ、またはセットが提供され得る。異なるポリペプチドは、G D F 15に対する親和性が異なってもよく、また、例えばG D F 15に対する結合活性が異なるように、好みに応じて用いられてもよい。それらは、単独で用いられてもよいし、組み合わせで用いられてもよい。したがって、異なるポリペプチドによって、治療が延長され得る、または継続され得る。例えば、治療中の被験体が、特定のポリペプチドに対する免疫応答を起こした場合には、別のポリペプチドを選択して用い得る。より大きな治療効果を得るために、ポリペプチドを組み合わせで用いてもよい。

40

50

## 【0085】

上記の通り、本発明のポリペプチドは、アミノ酸を最小限6つ含む。しかしながら、有利には、より長いポリペプチドの方が、より高い親和性でGDF15に結合し得るので、ポリペプチドは、アミノ酸を少なくとも7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、またはそれ以上、含んでいてもよい。

## 【0086】

例えば、QRFP RのECD3(配列番号5)から得られるポリペプチド、またはそれに由来するポリペプチドに関しては、これらのポリペプチドは、配列番号5もしくはその一部に由来するアミノ酸、またはそれに相当するアミノ酸を、6~29個、例えば6~28個、また例えば、6つ、7つ、8つ、9つもしくは10個のうちのいずれか以上、27個、26個、25個、24個、23個、22個、21個、20個、19個、もしくは18個のうちのいずれか以下、有していてもよいし、含んでいてもよい。ある実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号5のうちの27個以下のアミノ酸からなるものであってもよいし、そのようなアミノ酸を含むものであってもよい。

10

## 【0087】

驚くべきことに、QRFP RのECD3の細胞外ドメインにおける短い一部が、溶液中でGDF15と結合できるということが見出された(実施例16を参照)。マウスQRFP Rに由来するECD3のアミノ酸のうちの15個を含むポリペプチド(配列番号184)を、柔軟なリンカーを有するFc融合タンパク質として供したところ、ブルダウンアッセイにおいて、GDF15とよく結合することが見出された(配列番号240を参照)。このポリペプチドは、配列番号176に示す配列を有する、ヒトQRFP Rに由来する配列に相当する。マウスにおける配列は、ヒトにおける配列と同一性が高く、配列番号176(ヒト)の第2位がグルタミン残基である代わりに、配列番号184(マウス)の第2位がアルギニン残基であることのみが異なっている。この配列に由来する配列、またはこの配列との関係が近い配列を有するポリペプチドが、特に興味深い。したがって、この配列との関係が近い、アミノ酸を13~18個含むポリペプチドは、本発明の特に好ましい実施形態である。特に、配列番号30、31、32、39、46、47、もしくは175~189のいずれか1つに示す配列、またはその配列に対する同一性が少なくとも75%である配列、を有する、または含む、ポリペプチドは、本発明の様々な態様における好ましいポリペプチドである。

20

30

## 【0088】

上記の通り、ECD3に由来するこのようなアミノ酸配列は、QRFP RのECD4に由来する配列と組み合わせられてもよい。したがって、ポリペプチドは、上記段落で定義された、前記ECD3由来の配列である第1の配列を、配列番号12もしくは13に示す第2の配列、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列と共に含んでいてもよい。第1の配列および第2の配列は、場合によってはリンカー配列またはスペーサー配列を介して、いずれの順番で連結されていてもよいし、以下でより詳細に述べるように、Fc融合タンパク質のヘテロダイマーなどのヘテロダイマーとして、組み合わせ提供されてもよい。

40

## 【0089】

QRFP RのECD4(配列番号12)から得られるポリペプチド、またはそれに由来するポリペプチドは、配列番号12もしくはその一部に由来するアミノ酸、またはそれに相当するアミノ酸を、6~19個、例えば6~18個、また例えば、6つ、7つ、8つ、もしくは9つのうちのいずれか以上、19個、18個、17個、16個、もしくは15個のいずれか以下、有していてもよいし、含んでいてもよい。ある実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号12のうちの17個以下のアミノ酸からなるものであってもよいし、そのようなアミノ酸を含むものであってもよい。

## 【0090】

CLPTM1のECD(配列番号14)から得られるポリペプチド、またはそれに由来

50

するポリペプチドは、配列番号14もしくはその一部に由来するアミノ酸、またはそれに相当するアミノ酸を、6～354個、例えば、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、12個、14個、16個、18個、もしくは20個のうちのいずれか以上、354個、353個、350個、320個、300個、280個、260個、250個、240個、220個、200個、180個、160個、150個、140個、120個、100個、90個、80個、70個、60個、50個、40個、30個、もしくは20個のいずれか以下、含んでいてもよい。例えば、ポリペプチドは、配列番号14から得られるかもしくはそれに由来するアミノ酸、またはその一部に相当するアミノ酸を、6つ、7つ、8つもしくは9つ以上、50個、45個、40個、35個、もしくは30個以下、有していてもよいし、含んでいてもよい。

10

**【0091】**

配列番号17に示す配列に相当する、CLPTM1の細胞外ドメインの31アミノ酸からなる部分を含むポリペプチドは、溶液中でGDF15に結合でき（実施例16を参照）、かつCD14+免疫細胞において、CLPTM1活性に対するGDF15の効果を阻害できる（実施例17を参照）ということが見出された。GGGSリンカー配列の3回繰り返し配列を含む柔軟なリンカーによって、CLPTM1に由来する上記ポリペプチドがFcと連結された融合タンパク質を供した（配列番号241を参照）。したがって、配列番号17の配列、またはその配列に対する同一性が少なくとも75%である配列を有する、または含む、ポリペプチド、あるいは、少なくとも6個の連続したアミノ酸を含む、配列番号17の一部である配列を含むポリペプチドは、本発明の様々な態様における好ましいポリペプチドである。

20

**【0092】**

実施例18において、CLPTM1に由来するポリペプチドのうちのいくつかに対するGDF15の結合を、ELISAアッセイで試験した（図32を参照）。ポリペプチドのうちのいくつかは、GDF15と結合することが見出され、したがって、これらは、本発明の好ましいポリペプチドとなり得る。よって、配列番号258、259、261、262、269、270、297、298、301、302、308、309のいずれか1つに示す配列、またはその配列に対する同一性が少なくとも75%である配列を有する、または含む、ポリペプチドは、本発明の様々な態様における好ましいポリペプチドである。

30

**【0093】**

特に、配列番号270に示すアミノ酸配列（すなわち、配列GDYYPPIIYFNDYWNLQKDY YG）または配列番号309に示すアミノ酸配列（すなわち、配列GDYYPPIIYFNDYWNLQKDY Yであり、これはすなわち、天然型のCLPTM1のECDには存在しないC末端のG残基を欠いた配列番号270である）を有する、または含む、あるいはそのようなアミノ酸配列に基づくか由来する（例えば、その一部が、少なくとも6つの連続したアミノ酸を含むか、またはそのようなアミノ酸配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列を含む）、ポリペプチドが好ましい。例えば、ポリペプチドは、配列番号270または309の配列を有するポリペプチド、または少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む、配列番号270または309の一部である配列を有するポリペプチド、または配列番号270または309に対する同一性が少なくとも75%である配列を有するポリペプチド、を含む融合タンパク質の形態であってもよい。別の実施形態においては、ポリペプチドは、融合パートナーを有するのではなく、ネイキッドポリペプチド（naked polypeptide）であってもよいし、ポリペプチドは、以下でさらに述べるような非ペプチド系のポリマーなどの、他の部分と抱合されていてもよい。例えば、ポリペプチドは、少なくとも配列DYYPPIIを含む、配列番号270または309の一部を含んでいてもよい（配列番号326）。

40

**【0094】**

ポリペプチドが、CLPTM1の細胞外ドメインから得られるか、またはそれに由来する、本発明のある実施形態においては、ポリペプチドは、CLPTM1遺伝子にコードされている天然型N末端メチオニン残基を含んでいてもよく、この場合、例えば、天然型C

50

L P T M 1または内因性のC L P T M 1の開始コドンが、ポリペプチドをコードしている核酸配列に含まれている。したがって、ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、1から、137、138、139、140、150、160、180、200、220、240、260、280、288、290、300、320、340、350、または354までのアミノ酸を含んでいてもよい。よって、さらなる実施形態においては、ポリペプチドは、N末端メチオニンを有する、配列番号14に相当するアミノ酸配列を有していてもよいし、含んでいてもよい。このようなポリペプチドを、配列番号315に示す。したがって、本明細書において、例えば配列番号14またはその一部を含むポリペプチドに関連して、配列番号14について言及する場合は、このような言及は、配列番号315についての言及と置き換えられてもよいし、配列番号315についての言及で補足されてもよい。換言すると、本明細書における配列番号14についての言及は、配列番号315についての言及も含むものと見なされてもよい。

10

**【0095】**

実際のところ、本発明のポリペプチドは、上記に含まれる任意の整数間に相当する範囲の長さ、または上記範囲内の任意の範囲の長さを含んでいてもよいし、有していてもよい。さらに、以下でより詳細に述べるように、本発明のポリペプチドは、Q R F P Rおよび/もしくはC L P T M 1から得られる、あるいはそれらに由来する、ペプチド配列に、付加または連結された1つ以上の他のアミノ酸配列を含む、融合形態、またはその他の延長形態もしくは伸長形態で提供されてもよい。

20

**【0096】**

本発明の特定の実施形態においては、ポリペプチドは、Q R F P Rおよび/またはC L P T M 1の細胞外ドメインの全て、または実質的に全て、を含んでいてもよい。

**【0097】**

G D Fとその受容体との相互作用を、ポリペプチドが阻害できるようにするためには、このようなポリペプチドがG D F 15に結合できることが必要である。理論に拘束されることを望むものではないが、G D F 15におけるQ R F P RおよびC L P T M 1に対する結合部位は、(完全に、または部分的に)重複していると考えられるため、G D F 15に結合するこれらの受容体のいずれかの細胞外ドメインに由来するポリペプチドは、いずれかの受容体へのG D F 15の結合を阻害することができると考えられる。換言すると、G D F 15に結合するQ R F P Rの細胞外ドメインから得られる、またはそれに由来する、ポリペプチドは、G D F 15が、Q R F P RまたはC L P T M 1のいずれかに結合することを防止することができ、また、G D F 15に結合するC L P T M 1の細胞外ドメインから得られる、またはそれに由来する、ポリペプチドは、G D F 15が、Q R F P RまたはC L P T M 1のいずれかに結合することを防止することができる。

30

**【0098】**

このことは、Q R F P RのE C D 3と、C L P T M 1のE C Dとの間に、配列が類似した領域が存在していることを示す、下記実施例20で報告されているさらなる研究によって支持される。E C D 4との配列類似性についても、いくらか示されている。興味深いことに、これらは、2つの受容体を比較した場合にバックグラウンドにおいて類似性を有する唯一の領域であり、その類似性は、G D F 15の結合を媒介する部位または領域に存在している。

40

**【0099】**

本発明のポリペプチドは、例えば可溶性ポリペプチドとして、すなわち、可溶化基および/または可溶化部を備えたペプチドとして、可溶性形態で提供されてもよい。

**【0100】**

ポリペプチドは、単量体の形態で提供されてもよいし、二量体の形態で提供されてもよいし、より高次の多量体の形態で提供されてもよい。すなわち、ポリペプチドは、本明細書に記載の、または本明細書で定義される、ポリペプチドのうちのいずれかの二量体またはより高次の多量体であってもよいし、それらを含むものであってもよい。下記実施例で提供されるデータによって、ポリペプチドが、単量体の形態または二量体の形態のいずれ

50

かにおいて、活性を有し得ることが示される。G D F 1 5 は、二量体として存在しているので、二量体の形態でポリペプチドを提供することが有利な場合がある。

【 0 1 0 1 】

二量体またはより高次の多量体は、当該技術分野において公知の技術によって、簡便に形成され得る。例えば、二量体は、融合タンパク質の形成中に、自発的に形成されてもよいし、工学的に形成されてもよい。

【 0 1 0 2 】

ポリペプチドを、さらなる部位を有する融合タンパク質、コンストラクト、または抱合体の形態で提供することが有利である、または望ましい場合がある。

【 0 1 0 3 】

ある実施形態においては、タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド、または多糖などの天然高分子または合成高分子に、ポリペプチドを抱合または連結させて、その薬物動態学的性質を改良してもよい。したがって、様々な実施形態においては、ポリペプチドは、その全ての開示が参照により本明細書に援用される、S t r o h l . 2 0 1 5 . B i o D r u g s 2 9 , 2 1 5 ~ 2 3 9 に記載されているように、直鎖状もしくは分岐鎖状モノメトキシポリエチレングリコール ( P E G ; P E G 化 )、ヒアルロン酸、デキストランもしくはデキストリン、ホモアミノ酸ポリマー ( H A P ; H A P 化 )、プロリン - アラニン - セリンポリマー ( P A S ; P A S 化 )、またはエラスチン様ペプチド ( E L P ; E L P 化 ) に抱合させてもよい。実際のところ、当該技術分野において公知であり、治療効果のあるタンパク質と共に用いられる、公知の融合パートナーまたは抱合パートナーが用いられ得る。

【 0 1 0 4 】

例えば、ポリペプチドの血清半減期を増加させ、かつ/またはポリペプチドにさらなる機能を付加するために、本発明のポリペプチドは、いずれも、融合タンパク質またはキメラタンパク質として提供されてもよい。「融合タンパク質」なる語は、2つ以上の異なる供給源由来のポリペプチド配列を含む、単一ポリペプチド鎖のことをいう。本発明のポリペプチドは、アルブミン、フィブリノゲン、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、トランスフェリン、ストレプトアビジンもしくはストレプトアビジン様タンパク質、または免疫グロブリン、あるいはその一部、特に、免疫グロブリン ( I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 など ) の F c 部位、またはその一部と組み合わせ、融合タンパク質として ( 例えば、F c 融合タンパク質として ) 提供されてもよい。本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質内において、本発明のポリペプチドは、融合タンパク質の N 末端に位置していてもよいし、融合タンパク質の C 末端に位置していてもよい。あるいは、本発明のポリペプチドは、融合タンパク質の内部、例えば、融合タンパク質のループまたは他の表面形状内に、位置していてもよい。

【 0 1 0 5 】

好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリンの F c 領域と組み合わせ、融合タンパク質として提供されてもよい。すなわち、F c 融合タンパク質として提供されてもよい。F c 融合タンパク質は、二量体を形成するので、この実施形態においては、本発明のポリペプチドの複製物 2 つが、単一体として提供され得る。このような実施形態においては、二量体は、同一の本発明のポリペプチドを 2 つ含むホモ二量体であってもよいし、同一ではない本発明のポリペプチドを 2 つ含むヘテロ二量体として提供されてもよい。例えば、F c 融合タンパク質は、本明細書に記載の Q R F P R の第 3 の細胞外ドメインから得られる、またはそのドメインに由来する、同一のポリペプチドを 2 つ含むホモ二量体であってもよいし、本明細書に記載の Q R F P R の第 4 の細胞外ドメインから得られる、またはそのドメインに由来する、同一のポリペプチドを 2 つ含むホモ二量体であってもよい。また、F c 融合タンパク質は、本明細書に記載の Q R F P R の第 3 の細胞外ドメインから得られる、またはそのドメインに由来する、異なるポリペプチドを 2 つ含むヘテロ二量体であってもよいし、本明細書に記載の Q R F P R の第 4 の細胞外ドメインから得られる、またはそのドメインに由来する、異なるポリペプチドを 2 つ含むヘ

10

20

30

40

50

テロ二量体であってもよい。特定の実施形態においては、Fc融合タンパク質は、QRFP Rの第3の細胞外ドメインから得られる、またはそのドメインに由来する、第1のポリペプチドと、本明細書に記載のQRFP Rの第4の細胞外ドメインから得られる、またはそのドメインに由来する、第2のポリペプチドとを含む、ヘテロ二量体であってもよい。また、Fc融合タンパク質は、本明細書に記載のCLPTM1に由来する、同一のポリペプチドを2つ含むホモ二量体であってもよいし、本明細書に記載のCLPTM1に由来する、異なるポリペプチドを2つ含むヘテロ二量体であってもよい。特定の実施形態においては、Fc融合タンパク質は、配列番号15の配列、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列を含む、第1のペプチドと、配列番号16の配列、またはその配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列を含む、第2のペプチドとを含む、ヘテロ二量体であってもよい。

10

**【0106】**

単量体および二量体と並んで、例えば三量体やそれ以上の、より高次の多量体の形態であるFc融合体も知られており、これらは、本発明に含まれる。

**【0107】**

Fc融合タンパク質は、免疫原性を有するFcドメインを含んでいてもよい。換言すると、Fc融合タンパク質は、例えば自然免疫系の細胞による応答などの、免疫応答を誘導することが知られている配列を含んでいてもよい。したがって、一実施形態においては、Fc融合タンパク質は、免疫原性を有していてもよい。特定の実施形態においては、免疫原性を有する配列は、抗体依存性細胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity、ADCC) および/または抗体依存性細胞媒介性食作用 (antibody dependent cell mediated phagocytosis、ADCP) を誘導し得る。免疫原性を有するFcタグ配列の例は、当該技術分野において公知である (例えば、Lazarら 2006、PNAS 103、4005~4010; Shieldsら 2001、J. Biol. Chem. 276、6591~6604; およびStewartら 2011、Protein Engineering, Design and Selection 24、671~678を参照)。このような用途に限定されないが、このような免疫原性を有するFc融合タンパク質は、GDF15を過剰発現し、細胞表面付近のGDF15濃度が高いがんの治療において特に有用な場合がある。このようなFc融合タンパク質は、被験体の免疫系の細胞を、がんの部位に集めるように作用し、GDF15とその受容体との相互作用を単に阻害するだけでなく、免疫応答を誘導し得る。

20

30

**【0108】**

しかしながら、Fc融合タンパク質において、免疫原性活性が最低限であること、すなわち、免疫応答を誘導することなく、Fc融合タンパク質がGDF15に結合する (ひいては、GDF15を隔離する) ことが、望ましい場合がある。したがって、さらなる実施形態においては、Fc融合タンパク質は、免疫原性を有さない。

**【0109】**

別の好ましい実施形態においては、ポリペプチドは、ビスホスホネートとの抱合体として提供されてもよい。理論に拘束されることを望むものではないが、このようなコンストラクトは、骨において富化する (すなわち、集積する) ものと考えられる。このような集積は、骨において、受容体に対してGDF15が及ぼす作用を防止するのに特に有利な場合があり、このことが、特に、骨へのがんの転移を阻害するのに役立つ場合がある。

40

**【0110】**

本発明において検討される融合タンパク質または抱合体のいずれにおいても、QRFP RまたはCLPTM1に由来するポリペプチドは、N末端および/またはC末端において、リンカー配列および/またはリンカー基もしくはスペーサー基によって、抱合パートナーまたは融合パートナーに連結されてもよい。ポリペプチド/ペプチド系融合パートナーを含む融合タンパク質の場合、リンカーは、好都合にはペプチド/ポリペプチドリンカーであって、その多くが、当該技術分野において公知であり、かつ説明されている。リンカーは、柔軟なリンカー配列 (柔軟なリンカー配列モチーフを繰り返し含んでいてもよい)

50

であってもよい。当該技術分野において公知である典型的なリンカーは、小さな非極性残基（グリシンなど）または小さな極性残基（セリンもしくはスレオニンなど）に富むものであり、一般的に、グリシン残基およびセリン残基（GS）のつながりからなる。一般的に用いられるリンカーは、（GGGS）リンカー（配列番号242）であって、これは、リンカーにおいて、繰り返しユニット（（GGGS）<sub>n</sub>）として用いられてもよく、ここでコピー数nは調整され得る。このようなリンカーは、3回繰り返し（すなわち、（GGGS）<sub>3</sub>）として、実施例16の融合タンパク質コンストラクトに用いられている。

#### 【0111】

非ポリペプチド/ペプチドポリマー（PEGもしくは多糖など）との抱合体、または他の抱合パートナーとの抱合体の場合、本発明のポリペプチドは、公知の、または望ましい、結合化学反応またはリンカー/結合基を用いて、他の部分（抱合パートナー）に結合または連結（抱合）されていてもよい。これらは、様々なものが、当該技術分野において説明されている。

10

#### 【0112】

さらに別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、環状ペプチドとして提供されてもよい。環状ペプチドは、典型的には、タンパク質分解に対する抵抗性が高く、よって、消化管のタンパク質分解酵素によって分解されないので、タンパク質系治療薬またはペプチド系治療薬の経口投与において特に有用である。しかしながら、環状ペプチドは、構造的に関連する直鎖ペプチドと比べると、典型的には、血清半減期の増加も示す。

20

#### 【0113】

本明細書においては、野生型のGDF15受容体の細胞外ドメインの配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の置換を含むが、GDF15に対する結合能は保持している、ポリペプチドについて説明している。好ましくは、本発明のポリペプチドは、天然型タンパク質に見出される同等の配列区画を有するポリペプチドに対する配列同一性が高い。本発明のポリペプチドは、天然型タンパク質に見出される同等の配列区画を有するポリペプチドに対する配列同一性が少なくとも75%であり、好ましくは、配列同一性が少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。しかしながら、本発明の特定の態様においては、GDF15に結合することによって、GDF15と受容体との相互作用を阻害するために用いられるポリペプチドは、天然型タンパク質に見出される同等の配列区画を有するポリペプチドと同一の配列を含んでいてもよい。理論に拘束されることを望むものではないが、このようなポリペプチドの方が、天然型タンパク質と比べて1つ以上の置換を有するポリペプチドよりも、免疫応答を誘発しない（すなわち、免疫原性が低い）という可能性がある。なぜなら、非天然型配列を有するポリペプチドは、被験体の免疫系によって「外来」と認識され得るからである。

30

#### 【0114】

配列同一性は、当該技術分野において公知であって、かつ容易に使用可能な方法およびソフトウェアによって、容易に決定され得る。したがって、配列同一性は、任意の簡便な方法によって評価されてもよい。しかしながら、配列間の配列同一性の程度を決定するためには、例えばClustal W (Thompsonら, (1994) Nucleic Acids Res., 22: 4673~4680)などの、多重配列アラインメントを行うコンピュータプログラムが有用である。ALIGN (Myersら, (1988) CABIOS, 4: 11~17)、FASTA (Pearsonら, (1988) PNAS, 85: 2444~2448; Pearson (1990), Methods Enzymol., 183: 63~98)、BLASTおよびgapped BLAST (Altschulら, (1997) Nucleic Acids Res., 25: 3389~3402)のような、配列対を比較してアラインメントを行うプログラムも、この目的にお

40

50

いて有用であり、初期設定で用いられてもよい。さらに、欧州バイオインフォマティクス研究所のDaliサーバにおいて、構造に基づいたタンパク質配列のアラインメントが提供されている(Holm(1993) J. Mol. Biol., 233:123~38; Holm(1995) Trends Biochem. Sci., 20:478~480; Holm(1998) Nucleic Acid Res., 26:316~9)。多重配列アラインメントおよび同一性パーセントの算出は、標準的なBLASTのパラメータを用いて(例えば、有効な全ての生物の配列と、マトリクスとしてBlosum62と、ギャップコストとしてexistence 11、extension 1とを用いて)決定されてもよい。あるいは、以下のプログラムおよびパラメータが用いられてもよい:

プログラム: Align Plus 4、バージョン4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite); DNA比較: 全体比較、標準的直線スコアリングマトリクス、不一致ペナルティ=2、オープンギャップペナルティ=4、延長ギャップペナルティ=1; アミノ酸比較: 全体比較、BLOSUM62スコアリングマトリクス。本明細書で定義される天然ポリペプチド配列の変異体は、例えば、部位特異的変異導入またはランダム変異導入(例えば、遺伝子シャッフリングまたはエラープロードPCRを用いる)などの標準的な変異導入技術など、当該技術分野において公知の標準的な分子生物学的技術を用いることなどによって、合成的に生成させることができる。このような変異導入技術を用いて、結合性および/または阻害性が向上した、または異なった、ポリペプチドを開発することができる。

10

## 【0115】

20

また、本明細書で定義されるポリペプチドの誘導体が用いられてもよい。誘導体とは、天然のアミノ酸の代わりに、当該アミノ酸の構造類似体を含む、上述したポリペプチドまたはその変異体を意味する。ポリペプチドの機能に悪影響を及ぼさない限りにおいて、誘導体化または改変(ポリペプチドにおけるアミノ酸の標識化、グリコシル化、メチル化など)が行われてもよい。

## 【0116】

「構造類似体」とは、非標準的なアミノ酸を意味する。このような、用いられ得る非標準的なアミノ酸またはアミノ酸構造類似体としては、例えば、Dアミノ酸、アミド等価体(N-メチルアミド、レトロインベルソアミド、チオアミド、チオエステル、ホスホン酸塩、ケトメチレン、ヒドロキシメチレン、フルオロビニル、(E)-ビニル、メチレンアミノ、メチレンチオ、もしくはアルカンなど)、L-Nメチルアミノ酸、D-メチルアミノ酸、またはD-N-メチルアミノ酸などが挙げられる。

30

## 【0117】

ポリペプチドが、天然型タンパク質の配列と比べてアミノ酸置換を含んでいる場合、その置換は、好ましくは、保存的置換であり得る。「保存的アミノ酸置換」なる語は、アミノ酸が、類似の物理化学的性質を有するアミノ酸、すなわち同じ分類/群のアミノ酸と入れ替わった(置換された)アミノ酸置換のことをいう。例えば、小さい残基であるグリシン(G)、アラニン(A)、セリン(S)またはスレオニン(T); 疎水性または脂肪族残基であるロイシン(L)、イソロイシン(I)、バリン(V)またはメチオニン(M); 親水性残基であるアスパラギン(N)およびグルタミン(Q); 酸性残基であるアスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E); 正に荷電した(塩基性)残基であるアルギニン(R)、リジン(K)またはヒスチジン(H); あるいは芳香族残基であるフェニルアラニン(F)、チロシン(Y)およびトリプトファン(W)が、ポリペプチドのGDF15に対する結合能を実質的に変化させることなしに、区別なく置換され得る。

40

## 【0118】

第2類の薬剤は、GDF15受容体に結合でき、かつGDF15とその受容体との相互作用を阻害するのに用いられ得る結合剤を含む。このような結合剤を用いると、受容体の細胞外ドメインに結合し、GDF15が該受容体に結合することを防止することによって、または、受容体に結合したGDF15の効果を阻害もしくは低減する(上記の通り、これは、GDF15の結合を防止することを、必ずしも含まなくてもよい)ことによって、

50

G D F 1 5 とその受容体との相互作用を低減させ得る。

【 0 1 1 9 】

このような結合剤は、受容体における G D F 1 5 の結合、効果、または活性を、阻害または低減するように作用するので、少なくとも、受容体におけるリガンド G D F 1 5 の効果に対して、結合剤を受容体アンタゴニストと見なし得る。このようなアンタゴニストは、部分的アンタゴニストを含む（すなわち、結合剤は、G D F 1 5 に対して所望の拮抗効果を有していてもよいが、受容体において、受容体における他の効果 / 他のリガンドに対する作動活性を発揮してもよい）。

【 0 1 2 0 】

一実施形態においては、本薬剤は、Q R F P R の細胞外ドメインに結合して、G D F 1 5 に対する Q R F P R の結合能、および / または受容体において G D F 1 5 がその効果を発揮する能力を低減させ得る。上述したように、Q R F P R は、細胞外ドメインを 4 つ含む。結合剤は、G D F 1 5 結合部位に直接結合する（ひいては、G D F 1 5 が Q R F P R に結合することを阻害する）こと、または G D F 1 5 が受容体に結合するのを立体的に防止するのに、または阻害するのに、十分なほど、G D F 1 5 結合部位の近くに結合すること、のいずれかによって G D F 1 5 の結合を防止する様式で、これらのドメインに結合することによって、G D F 1 5 と Q R F P R との相互作用を阻害してもよい。

【 0 1 2 1 】

特定の実施形態においては、結合剤は、G D F 1 5 と相互作用することが見出されているのと同じ、Q R F P R の領域（リガンド結合部位）に結合してもよい。すなわち、Q R F P R の第 3 の細胞外ドメインおよび第 4 の細胞外ドメインのうち的一方または両方に結合してもよい。したがって、一実施形態においては、本薬剤は、Q R F P R の第 3 の細胞外ドメイン（すなわち、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド）に結合してもよいし、Q R F P R の第 4 の細胞外ドメイン（すなわち、配列番号 1 2 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド）に結合してもよいし、Q R F P R の第 3 の細胞外ドメインおよび第 4 の細胞外ドメインの両方（すなわち、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわち、より具体的には、配列番号 5 および 1 2 の両方を含むポリペプチド）に結合してもよい。さらなる実施形態においては、本薬剤は、Q R F P R の第 3 の細胞外ドメインおよび / または第 4 の細胞外ドメインの一部のみに結合してもよい。

【 0 1 2 2 】

さらなる実施形態においては、結合剤は、G D F 1 5 結合部位に結合しない場合がある。この実施形態においては、本薬剤は、G D F 1 5 と Q R F P R との相互作用を、この相互作用を立体的に妨げることによって、阻害することができる。したがって、結合剤は、Q R F P R の第 1 の細胞外ドメインおよび / または第 2 の細胞外ドメインに結合することによって、Q R F P R への G D F 1 5 の結合を防止してもよい。一実施形態においては、本薬剤は、Q R F P R の第 1 の細胞外ドメイン（すなわち、配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド）に結合してもよい。さらなる実施形態においては、結合剤は、Q R F P R の第 2 の細胞外ドメイン（すなわち、配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド）に結合してもよい。また別の実施形態においては、結合剤は、Q R F P R の第 1 の細胞外ドメインおよび第 2 の細胞外ドメインの両方（すなわち、配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわち、配列番号 3 および 4 の両方を含むポリペプチド）に結合してもよい。

【 0 1 2 3 】

別の実施形態においては、本薬剤は、C L P T M 1 の細胞外ドメインに結合して、G D F 1 5 に対する C L P T M 1 の結合能、および / または受容体において G D F 1 5 がその効果を発揮する能力を低減させ得る。したがって、第 1 の実施形態においては、本薬剤は、配列番号 1 4 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合してもよい。特定の実施形態においては、本薬剤は、配列番号 1 7 に示すアミノ酸配列を有するか、または含む、

10

20

30

40

50

ポリペプチドに結合してもよい。さらなる実施形態においては、本薬剤は、配列番号 18 に示すアミノ酸配列を有するか、または含む、ポリペプチドに結合してもよい。また別の実施形態においては、本薬剤は、配列番号 15 に示すアミノ酸配列を有するか、もしくは含む、ポリペプチド、および/または配列番号 16 に示すアミノ酸配列を有するか、もしくは含む、ポリペプチド、に結合してもよい。他の実施形態においては、本薬剤は、配列番号 200 に示すアミノ酸配列を有するか、または含む、ポリペプチドに結合してもよい。

#### 【0124】

下記実施例 19 では、CLPTM1 のECD (配列番号 14) における、この受容体に対して拮抗活性を示す抗CLPTM1 抗体の結合部位の解明について述べている。この抗体の共通点は、配列番号 2 の 98 ~ 100 位のPKD (配列番号 322) であることが示されている。したがって、またさらなる実施形態においては、薬剤は、例えば、配列番号 212 に示すアミノ酸配列 (PKDT) を有するか、または含む、ポリペプチド、あるいは配列番号 213 ~ 239 のうちのいずれか 1 つ、または配列番号 275 ~ 278 のうちのいずれか 1 つを有するか、または含む、ポリペプチドなどの、配列PKD (配列番号 322) を有するか、または含む、ポリペプチドに結合し得る。実施例 19 では、第 2 のエピトープも同定されている。よって、またさらなる実施形態においては、薬剤は、配列番号 280 ~ 286 のうちのいずれか 1 つに示すアミノ酸配列を有するか、または含む、ポリペプチドに結合し得る。

10

#### 【0125】

本発明の結合剤は、例えば、QRFPR に対する結合能、特に、QRFPR および/または CLPTM1 の細胞外ドメインに対する結合能を有する化合物、分子、または実在物 (entity) などの、どのような薬剤であってもよい。特に、結合剤は、QRFPR および/または CLPTM1 (あるいはそれらの細胞外ドメイン) に特異的に結合してもよい。「特異的に結合する」とは、薬剤が、非標的分子への結合とは区別される様式で、QRFPR および/または CLPTM1 (あるいはそれらの細胞外ドメイン) に結合できるということの意味する。したがって、非標的分子への結合は、無視してもよいし、QRFPR および/または CLPTM1 への結合と比較して、実質的に低減されていてもよい。よって、結合剤は、QRFPR および/または CLPTM1 に対する結合親和性を有する薬剤であってもよく、すなわち、QRFPR および/または CLPTM1、あるいは、より具体的には、それらの細胞外ドメインに対する親和性結合パートナーであってもよい。

20

30

#### 【0126】

したがって、本発明の結合剤は、抗体またはその断片もしくは誘導体などの、タンパク質またはポリペプチドや、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、またはその他のペプチドディスプレイシステムを組み合わせて得られたポリペプチド、GDF15 の非拮抗的な断片 (GDF15 の一部を含むポリペプチドなど)、アプタマーなどの核酸分子、あるいはそれらの組み合わせから選択されてもよい。

#### 【0127】

本発明の好ましい実施形態においては、結合剤は、タンパク質であり、好ましくは、抗体またはその誘導体もしくは断片である。当該技術分野においても、アフィポディなどの様々な抗体様分子が公知であり、かつ説明されている。

40

#### 【0128】

好ましい実施形態においては、結合剤は、抗体である。抗体は、都合のよいまたは所望の、あらゆる種、分類、またはサブタイプのものであってもよい。さらに抗体は、天然のものであってもよいし、誘導体化されたものであってもよいし、合成されたものであってもよい。したがって、本明細書における「抗体」なる語は、全ての種類の抗体分子および抗体断片を含む。

#### 【0129】

より具体的には、本発明に係る「抗体」は、

(a) 例えば、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、もしくはマウス、または卵黄などの、従来用い

50

られている動物のいずれかである、動物に由来する、I g G、I g A、I g M、I g D、またはI g Eなどの様々なクラスまたはサブクラスの免疫グロブリンのいずれか、

(b) モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体、

(c) 完全なモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはこれらの断片であって、この断片は、例えば、Fc部を欠く断片(Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなど)や、完全な抗体の重鎖成分を結合しているジスルフィド結合を還元的に切断することによって得られる、いわゆる「半分子」断片などの、抗体の結合領域を含有する断片であり、ここで、Fvは、軽鎖の可変領域、および2本の鎖として発現される重鎖の可変領域を含有する断片として定義され得る、完全なモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはこれらの断片、

(d) 組み換え型DNAまたは他の合成技術によって産生または改変された抗体であって、該抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体、キメラ抗体、または合成的に作成された、もしくは改変された抗体様構造体を含み、単鎖抗体などの、抗体の機能的誘導体または機能的「等価物」も含まれる、抗体、を含む、抗体である。

【0130】

単鎖抗体は、適切なポリペプチドリナーで連結された、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する、融合単鎖分子として、遺伝子工学的に作成された分子として定義され得る。

【0131】

このような抗体断片ならびに合成抗体および誘導体化抗体を作成する方法は、当該技術分野においてよく知られている。抗体の相補性決定領域(CDR)または高度可変領域を含有する抗体断片もまた、含まれる。これらの領域は、抗原結合部位の形成に寄与する立体ループ構造を形成する、抗体の軽鎖および重鎖上のアミノ酸配列を含む領域として定義され得る。CDRを用いて、CDR移植抗体を生成してもよい。本明細書における「CDR移植」とは、軽鎖ドメインおよび/または可変ドメインの1つ以上の配列の少なくとも一部が、与えられた抗原に対して異なる結合特異性を有する抗体に由来する、CDR配列の類似した部分で置換されたアミノ酸配列を有する抗体として定義される。当業者であれば、当該技術分野においてよく知られている方法を用いて、このようなCDR移植抗体を容易に産生することができる。

【0132】

キメラ抗体は、ある種の抗受容体抗体の可変ドメインを、異なる種に由来する抗体の定常領域と組み合わせることによって、調製され得る。治療用途で用いるために、このような技術を用いて抗体をヒト化し得る。

【0133】

モノクローナル抗体ならびにその断片および誘導体は、本発明に係る好ましい抗体である。

【0134】

好ましくは、抗体は、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。すなわち、ヒトGDF15受容体を認識する結合ドメイン(相補性決定領域(CDR)など)と、ヒトにおいて自然に生じる抗体変異体に対する類似性が高くなるように改変された固定ドメイン(Fcドメインなど)とを含むように改変または作成された抗体である。特定の態様においては、ヒト化モノクローナル抗体またはキメラモノクローナル抗体は、I g G 4サブタイプのものであってもよい。この種の改変によって、望ましくは、免疫原性効果が最低限となった抗体が提供される。

【0135】

別の好ましい実施形態においては、抗体は、ヒト抗体であってよい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するように改変されたトランスジェニックマウスまたは他のトランスジェニック動物を用いて調製され得る。ヒト抗体は、ファージディスプレイによって得られてもよく、実際のところ、ヒト抗体は、ヒト被験体、すなわち、例えばヒト

10

20

30

40

50

自己免疫患者などの、抗受容体抗体が生まれつき存在している、または抗受容体抗体が存在している（すなわち、抗体産生のために、被験体を免疫化する必要がない）、ヒト被験体から単離されてもよい。

【0136】

Q R F P RまたはC L P T M 1に結合する抗体が報告され、かつ市販されている（例えば、下記実施例を参照）。このような抗体の一例として、バイオス・アンチボディ社（Bioss Antibodies）（米国）から市販されている抗C L P T M 1抗体b s - 8 0 1 8 Rが挙げられる。さらに、受容体に対する抗体は、公知かつ常用の技術を用いて、容易に調製され得る。抗原において、抗体が結合する部位（抗体が結合する部分）を決定する方法も、常法であるので（下記実施例も参照）、Q R F P RまたはC L P T M 1のエピトープ、または抗体結合部位は、容易に決定することができる。

10

【0137】

上記の通り、本発明のポリペプチドおよび結合剤は、組成物の形態で提供されてもよく、特に、G D F 1 5の増加に関連する疾患の治療または予防に用いられ得る、あるいはそのような疾患の治療または予防用に提供され得る、医薬組成物の形態で提供されてもよい。このような組成物は、本発明のポリペプチドを1つ以上、および/または本発明の結合剤を1つ以上、含んでいてもよいし、含有していてもよい。ポリペプチドおよび結合剤は、単一組成物と一緒に含まれていてもよいし、共に、すなわち併用して（すなわち、組み合わせ治療として）用いられる別々の組成物中に含まれていてもよい。ポリペプチドおよび結合剤は、順次に投与されるかまたは用いられてもよいし、同時に投与されるかまたは用いられてもよいし、実質的に同時に投与されるか用いられてもよい。したがって、異なるポリペプチド成分および結合剤成分が、実質的に同時に、一緒にまたは別々に、投与されるか用いられてもよいし、それぞれが別々に、異なる時点または異なる時間間隔で、投与されるかまたは用いられてもよい。

20

【0138】

このような組成物または組み合わせ（上述したようなキットまたは組み合わせ製品など）は、Q R F P Rの細胞外ドメインから得られる、またはこの細胞外ドメインに由来する、ポリペプチドと、Q R F P Rの細胞外ドメインに結合する結合剤とを含んでいてもよい。さらなる実施形態においては、組成物または組み合わせは、Q R F P Rの細胞外ドメインから得られる、またはこの細胞外ドメインに由来する、ポリペプチドと、C L P T M 1の細胞外ドメインに結合する結合剤とを含んでいてもよい。別の実施形態においては、組成物または組み合わせは、C L P T M 1の細胞外ドメインから得られる、またはこの細胞外ドメインに由来する、ポリペプチドと、Q R F P Rの細胞外ドメインに結合する結合剤とを含んでいてもよい。またさらなる実施形態においては、組成物または組み合わせは、C L P T M 1の細胞外ドメインから得られる、またはこの細胞外ドメインに由来する、ポリペプチドと、C L P T M 1の細胞外ドメインに結合する結合剤とを含んでいてもよい。

30

【0139】

本発明の組成物、キット、または組み合わせ製品は、G D F 1 5受容体から得られる、またはこれに由来する、ポリペプチドと、同じ受容体に結合する結合剤とを含んでいてもよいということは、明らかであろう。この場合、結合剤およびポリペプチドが互いに結合すると、G D F 1 5とその受容体との相互作用を阻害することができないので、結合剤は、同じ受容体に由来するポリペプチドには結合しないことが一般的に望ましい。このことは、様々な方法で実現され得る。一実施形態においては、結合剤は、G D F 1 5の結合に直接関わらない、G D F 1 5受容体の一部に結合してもよく（ひいては、上述したように、立体障害によって間接的にG D F 1 5の結合を阻害してもよい）、ポリペプチドは、G D F 1 5に結合する、G D F 1 5受容体の一部に由来するものであってもよい。さらなる実施形態においては、結合剤は、G D F 1 5の結合に関わる、G D F 1 5受容体の一部に結合してもよく、ポリペプチドは、G D F 1 5受容体の異なる一部に由来するものであってもよい。例えば、結合剤は、Q R F P Rの第4の細胞外ドメインに結合してもよく、ポリペプチドは、Q R F P Rの第3の細胞外ドメインに由来するものであってもよい。また

40

50

別の実施形態においては、ポリペプチドは、G D F 1 5 に対する結合能は損なわないが、結合剤への結合を防止する、保存的置換などの配列の改変を含んでもよい。しかしながら、当業者であれば、特定の結合剤が、特定のポリペプチドに結合し得るかどうかを立証するのは、容易であり、このような組み合わせを避け得るということを理解するであろう。

【 0 1 4 0 】

したがって、例えば、G D F 1 5 の受容体における結合部位に対して、エピトープ変化を引き起こす抗体を用いてもよく、このような抗体を、同じ受容体から得られる、または同じ受容体に由来する、ポリペプチドと共に、互いに干渉することなく、同じ被験体に用いることが可能である。

10

【 0 1 4 1 】

本発明のポリペプチドに結合しない、または併用されるポリペプチドに結合しない、結合剤の利点は、両方の成分を併用することができ、また有利には、両方の成分を用いることによって、例えば、循環血液中に遊離している、または腫瘍近辺の部位に位置している、G D F 1 5 と、G D F 1 5 が結合することによって、有害な、または望まない、効果を発揮し得る受容体との両方に結合するので、相補的效果が得られるという点である。

【 0 1 4 2 】

上記の通り、病気、障害、および疾患のいくつかは、G D F 1 5 の高いレベルに関連している。このようなG D F 1 5 の高いレベルは、循環血液中、または体内の組織もしくは臓器において、検出可能であり得る。G D F 1 5 は、腫瘍が存在する部位、または腫瘍の近辺において局所的に増加する場合もあり、例えば、腫瘍の間質または細胞外基質の中、または周囲に集積する場合がある。

20

【 0 1 4 3 】

G D F 1 5 の高いレベルに関連する疾患は、循環血液中、および/あるいは、例えばがん（腫瘍など）または他の損傷もしくは障害（炎症部位など）が存在する部位、またはその近辺などにおいて局所的に、G D F 1 5 のレベルが高いあらゆる疾患、病気、または障害であってもよい。例えば、G D F 1 5 が、がん（腫瘍など）が存在する部位において局所的に増加する場合、その増加は、循環血液中のG D F 1 5 レベルに顕著な影響を及ぼすようなものではないが、G D F 1 5 の局所的な濃度または量が、（例えば、腫瘍の微環境において）上昇するようなものであってもよい。したがって、G D F 1 5 のレベルは、問題となる疾患に罹患していない被験体、例えば健常被験体と比較して、または、疾患が存在しない、または存在していなかった、被験体の体内における部位または位置と比較して、上昇していてもよい。

30

【 0 1 4 4 】

したがって、G D F 1 5 の高いレベルに関連する疾患は、循環血液中であろうと、体内のいずれの部位において局所的にであろうと、G D F 1 5 レベルが異常になる、あらゆる疾患を含み得る。本発明によれば、G D F 1 5 レベルが望ましくない、例えば、被験体に有害な影響または危険な影響を及ぼすことになる、あらゆる疾患もまた含まれる。さらに、G D F 1 5 の活性が高い、または望ましくない、あらゆる疾患が含まれる。

【 0 1 4 5 】

このような疾患は、上昇した、または高いG D F 1 5 のレベルに関連していることが知られている、上記の疾患のいずれかを含み得る。したがって、疾患は、特に、悪液質を含み得、該悪液質は、あらゆる原因に関連する、またはあらゆる原因によって発生する、悪液質を含む。悪液質は、鬱血性心不全、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、慢性閉塞性肺高血圧、慢性腎疾患、嚢胞性線維症、多発性硬化症、運動ニューロン病、パーキンソン病、認知症、H I V / A I D S、関節リウマチなどの炎症性疾患、あるいは、狼瘡、多発性硬化症、もしくは強直性脊椎炎などのその他の炎症性疾患または自己免疫疾患を含む、あらゆる慢性疾患または長期にわたる疾患に起因し得る。

40

【 0 1 4 6 】

特定の実施形態においては、悪液質はがんによって誘導される。

50

## 【0147】

より一般的には、疾患は、望まない、または過剰な、体重減少であってもよいし、食欲抑制および/または体重減少に関連する、またはそれらに起因する、あらゆる疾患であってもよい。体重減少は、患者にとって危険なほどのもの、すなわち臨床的に顕著な体重減少である場合がある。例としては、食欲不振、悪液質、体重減少、または食欲抑制が挙げられ、これらは、循環血液中のGDF15の高いレベルに関連するものであり得る。悪液質、体重減少、または食欲抑制に関しては、結合剤は、特に、受容体QRFP Rに対する結合剤であってもよい。ポリペプチドは、本発明のいずれのポリペプチドであってもよいが、特に、QRFP Rから得られる、またはQRFP Rに由来する、ポリペプチドであってもよい。

10

## 【0148】

さらなる疾患としては、がん、骨障害、心疾患や、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺動脈高血圧症といった慢性肺障害などの肺障害、および腎障害または腎疾患が挙げられる。

## 【0149】

いくつかの血液障害および鉄過剰症も、GDF15の増加に関連しており、このような疾患としては、鎌状赤血球貧血、遺伝性球状赤血球症、I型先天性赤血球生成異常貧血、II型先天性赤血球生成異常貧血、地中海貧血症、環状鉄芽球を伴う不応性貧血(RARS)、およびビルビン酸キナーゼ欠損症が挙げられる。

20

## 【0150】

がんは、本発明に係る特に興味深い疾患である。循環血液中であろうと、がんが存在する部位において局所的にであろうと、GDF15の高いレベルは、幅広く異なるがんにおいて、予後が良いことを示すことが知られており、また多くのがんで、GDF15が過剰発現され、かつ分泌されていることが知られている。例えば、前立腺癌(Karanら Cancer Res 2009; 69(1): 2~5)、多発性骨髄腫(Tannoら Blood. 2014 Jan 30; 123(5): 725~33)、黒色腫(Boyleら J Invest Dermatol. 2009 Feb; 129(2): 383~91)、大腸癌(Barderasら Mol Cell Proteomics. 2013 Jun; 12(6): 1602~20)、胃癌(Baekら Clin Chim Acta. 2009 Mar; 401(1~2): 128~33)、乳癌(Kimら Carcinogenesis. 2008 Apr; 29(4): 704~12)、卵巣癌(Chudecka-Glazら Onco Targets Ther. 2015 Feb 23; 8: 471~85)、子宮体癌(Alonso-Alconadaら Mol Cancer. 2014; 13: 223)、口腔扁平上皮癌(Urakawaら Lab Invest. 2015 May; 95(5): 491~503)、膵癌(Wangら BMC Cancer. 2014 Aug 8; 14: 578)、肺癌(Kadaraら Cancer Biol Ther. 2006 May; 5(5): 518~22)、口腔癌(Schiegnitzら J Oral Pathol Med. 2015 Apr 16)、食道癌(Fisherら Br J Cancer. 2015 Apr 14; 112(8): 1384~91)、睾丸癌(Altenaら PLoS One. 2015 Jan 15; 10(1): e0115372)、および肝癌(Siら PLoS One. 2011; 6(5): e19967)が、GDF15の高いレベルに関連している。したがって、受容体に対するGDF15の結合活性を低減できる薬剤は、腫瘍学の分野において、魅力的で可能性のある治療法となるであろう。

30

40

## 【0151】

特に、GDF15とCLPTM1との相互作用は、多くの異なるがんの病理において、特に、GDF15の高いレベルに関連する免疫機能の調節に関して、特に重要な場合があると考えられる。しかしながら、あるがんにおいて、特に骨癌または他のがんの骨への転移においては、GDF15とQRFP Rとの相互作用が重要な場合がある。

## 【0152】

50

本明細書において、「がん」なる語は、固形腫瘍および造血性がんなどの非固形腫瘍を含む、悪性新生物、非悪性新生物、または前癌性新生物を含んで広く用いられる。体内のあらゆる組織または細胞のがんを含む、あらゆる公知のがんが想定され、上記挙げたがんを含む、異なる種類のがんが想定されるが、これらに限定されない。しかしながら、ある実施形態においては、がんは、直腸癌でも、結腸癌でも、前立腺癌でもない（または、前立腺癌でも直腸癌でもない）。別の実施形態においては、乳癌、子宮頸癌、または子宮体癌のうちの一つ以上ではなく、あるいは、神経膠腫でも、ユーイング肉腫以外の肉腫でも、中皮腫でも、血液細胞癌でもない。他の実施形態においては、このような癌が含まれる。発明者らのデータによると、ユーイング肉腫は、高レベルのGDF15に関連しているように思われる（図25参照）。上述した組み合わせのいずれかを含む、本発明のポリペプチドおよび/または結合剤が、どれでも用いられ得る。したがって、ポリペプチドは、QRFPRおよび/またはCLPTM1から得られてもよいし、これらに由来するものであってもよい。このようなポリペプチドが、QRFPRおよび/またはCLPTM1に対する結合剤と併用されてもよい。しかしながら、ある好ましい実施形態においては、結合剤は、CLPTM1に結合することができる。

10

#### 【0153】

特定の実施形態においては、ポリペプチドは、QRFPRから得られてもよいし、これに由来するものであってもよく、また、CLPTM1に対する結合剤と併用されてもよい。あるいは、CLPTM1から得られる、またはこれに由来する、ポリペプチドが、CLPTM1に対する結合剤と併用されてもよい。

20

#### 【0154】

がんは、原発性がんであってもよいし、二次がん、すなわち、微小転移巣を含む、体内における二次的部位に転移したがんであってもよい。

#### 【0155】

がんは、前立腺癌であってもよいし、膀胱癌であってもよいし、多発性骨髄腫であってもよいし、黒色腫であってもよいし、大腸癌（結腸癌および直腸癌を含む）であってもよいし、腎癌であってもよいし、胃癌であってもよいし、乳癌であってもよいし、卵巣癌であってもよいし、子宮体癌であってもよいし、口腔扁平上皮癌であってもよいし、膵癌であってもよいし、肺癌であってもよいし、口腔癌であってもよいし、食道癌であってもよいし、睾丸癌であってもよいし、肝癌であってもよい。

30

#### 【0156】

上記の通り、発明者らは、特に、QRFPRは、原発性がんおよび転移部、特に、前立腺癌の骨への転移部を含む、様々な骨のがん、または骨に関わるがん、において発現され得ることを示している。したがって、がんは、特に、骨癌であってもよいし、ユーイング肉腫、骨肉腫、または多発性骨髄腫などの、骨に関わるがんであってもよいし、二次性前立腺癌またはその他のがんの骨への転移であってもよい。

#### 【0157】

GDF15は、例えば、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マクロファージ、および/または樹状細胞などの、いくつかの異なる免疫細胞による免疫応答を下方制御することができる。上記の通り、CLPTM1は、CD4およびCD8陽性Tリンパ球、CD14陽性単球/マクロファージ、CD11c陽性樹状細胞、および/またはNK細胞を含む、様々な免疫細胞によって発現されることが示されている。このように、本発明の基盤を成す研究において、発明者らは、T細胞および/または他のリンパ球のサブセットが、CLPTM1を発現し得ることを示している。

40

#### 【0158】

興味深いことに、CD14陽性細胞（単球/マクロファージ）の大多数は、CLPTM1に対して顕著に陽性を示した。GDF15は、マクロファージの活性化を阻害することが以前に報告されており、マクロファージ阻害性サイトカイン1（MIC1）として知られている。GDF15がCLPTM1を刺激することによって、GSK3bのリン酸化が増大し、免疫機能が低下する。本発明へとつながる研究において、GDF15がCLPT

50

M1を刺激することによって、NKGD2Dレベルが低下することも見出されており、また、CLPTM1結合剤(抗体)を用いて、GDF15のCLPTM1への接近性を阻害することによって、NKGD2Dレベルが低下する程度が低減されることが見出されている。NKGD2Dは、NK細胞およびT細胞の両方において発現される。NKGD2Dは、パーフォリンおよびグランザイムBの放出などの、細胞溶解機能における重要なエフェクタータンパク質である。GDF15は、細胞毒性細胞においてNKGD2Dレベルを低下させる(ひいては、パーフォリンおよびグランザイムなどの細胞溶解機能を阻害する)ことが示されているので、発明者らは、腫瘍由来のGDF15によって、NKGD2D陽性NK細胞およびNKGD2D陽性T細胞などの免疫エフェクター細胞の、細胞毒性作用を媒介する能力が低減される、免疫腫瘍学の用途に、CLPTM1結合剤が特に有用であろうと予測している。さらに、発明者らは、GDF15によって誘導される、CLPTM1の、TGFB受容体複合体(TGFB1(ALK5)/TGFBRII)への接近を阻害することが、免疫細胞に対して阻害的である、この複合体を介した下流へのシグナル伝達を阻害するために役立つであろうと予測している。

10

**【0159】**

腫瘍間質または転移部位(微小転移巣を含む)におけるGDF15の高いレベルによって、がん細胞が免疫系を回避するための重要な機構が提供されると考えられる。したがって、本発明の結合剤および/またはポリペプチドは、GDF15の免疫抑制効果を防止または低減するのに有用であろう。

20

**【0160】**

したがって、より一般的には、本発明の治療薬は、GDF15による、またはGDF15によって生じる、免疫抑制を阻害するのに用いられてもよいし、GDF15の高いレベルに関連する免疫抑制を阻害するのに用いられてもよい。

**【0161】**

このような免疫抑制は、特に、細胞媒介性細胞毒性免疫応答の抑制であってもよい。したがって、免疫抑制は、マクロファージ、NK細胞、樹状細胞、好中球、および/またはT細胞などの、1つ以上の免疫細胞の活性を低減させることによって生じる免疫抑制であっても良い。

**【0162】**

より具体的には、免疫抑制は、がんについてののものであってもよい。すなわち、がんに関連する免疫抑制であってもよい。免疫抑制は、循環血液中におけるGDF15の高いレベルによるものであってもよいし、ある好ましい実施形態においては、腫瘍などのがんが存在する部位における、GDF15の高い局所濃度によるものであってもよい。

30

**【0163】**

特に、本発明の結合剤およびポリペプチドは、がん細胞の免疫回避を阻害するのに有用であってもよいし、がん細胞が誘導する免疫寛容を阻害するのに有用であってもよい。GDF15と、QRFPRまたはCLPTM1、特にCLPTM1との相互作用を阻害する本発明の治療薬は、がん細胞による免疫回避を阻害するのに有用であってもよい。したがって、CLPTM1および/またはQRFPRから得られる、またはこれらに由来する、ペプチド、ならびにCLPTM1および/またはQRFPR、特にCLPTM1に結合できる結合剤は、この点において特に有用であってもよい。上述したように、本明細書で述べる治療薬の組み合わせは、いずれも用いられ得る。

40

**【0164】**

本発明の治療薬は、免疫回避を阻害することによって、被験体の体が、がんを攻撃するのに役立つ。したがって、本発明は、がんに対する体の免疫応答を促進する(あるいは、容易にする、もしくは上昇させる、または、どんな形であれ、可能にする、もしくは支援する)ことによって、被験体の体内において、がんを低減または排除することを支援し得る。

**【0165】**

ある特定の態様においては、治療薬を用いて、がんの拡大または転移を阻害してもよい

50

。これは、微小転移巣の発生を阻害することを含んでいてもよいし、微小転移巣の成長または拡大を阻害することを含んでいてもよい。転移は、どのがんが、体内のどの部位に転移することであってもよい。特定の実施形態においては、前立腺癌、乳癌、または肺癌の、例えば骨への転移であってもよい。

【0166】

がんの治療において、例えば、他の免疫療法剤もしくは免疫腫瘍薬、または化学療法薬を含む、他の抗癌剤を用いる他の抗癌療法と組み合わせて、あるいはそのような抗癌療法と併用して、本発明の治療薬を用いてもよい。したがって、例えば、本発明の薬剤は、養子細胞導入療法などの細胞系がん療法、および/または抗体系療法と併用されてもよい。

【0167】

特定の実施形態においては、養子細胞導入療法、特にNK細胞またはT細胞と、本発明の薬剤を併用してもよい。いくつかの実施形態においては、NK細胞またはT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように改変されていてもよいし、T細胞は、がん細胞表面に存在する抗原に対する特異性を有している、T細胞受容体を発現してもよいし、発現するように改変されていてもよい(すなわち、天然型T細胞受容体または非相同のT細胞受容体を含んでいてもよい)。

【0168】

また、本発明は、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックダウン、または遺伝子欠失などによって改変されており、改変されていない細胞と比較して、CLPTM1のレベルおよび/または活性が低下している、細胞毒性免疫細胞も提供する。

【0169】

したがって、遺伝子(すなわち、細胞において、CLPTM1タンパク質をコードしている配列)は、CLPTM1タンパク質の発現量を減少させるように、例えば、細胞表面のCLPTM1受容体の量を減少させる、かつ/または受容体タンパク質の活性を低下させるように、改変されていてもよい。よって、受容体タンパク質は、不活性化されてもよい。これは、例えば、天然型CLPTM1遺伝子のヌクレオチド配列などの、天然型ヌクレオチド配列に対して挿入または置換を行うことによって、遺伝子配列を改変することを含んでいてもよい。これは、当該技術分野で公知の、標準的な突然変異導入技術および/または相同置換によって実現されてもよい。

【0170】

特定の実施形態においては、細胞は、T細胞受容体を発現する、または発現するように改変された、T細胞であってもよいし、CARを発現するように改変されたT細胞であってもよい。さらなる実施形態においては、細胞は、場合によってはCARを発現するように改変された、NK細胞であってもよい。該改変細胞は、がんの治療に特に有用であってもよく、したがって、一実施形態においては、細胞は、がん細胞表面の抗原に対して特異性を有するTCRまたはCARを含む。治療、特にがんの治療における該細胞の使用、さらには、該細胞と、本発明のポリペプチドおよび/または結合剤である治療薬とを含む、がんの治療において別々に、または順次、または同時に用いられる組み合わせ製品または製剤(キットなど)も提供される。したがって、がんを治療するための本発明の方法、または使用は、本発明のポリペプチドおよび/または結合剤と、該改変細胞毒性免疫細胞とを(すなわち、共に、または組み合わせて、または併用して)、被験体(特に、それを必要とする被験体)に投与することを含んでいてもよい。細胞および治療薬(ポリペプチドおよび/または結合剤)は、上述したように、例えば別々の処方として、別々に投与されてもよいし、順次投与されてもよいし、同時に投与されてもよい。したがって、本発明のキットは、上述したように、ポリペプチドおよび/または結合剤、ならびに改変細胞を含んでいてもよい。

【0171】

本発明の薬剤は、がんの治療において、免疫チェックポイントを標的とする免疫療法剤、すなわち免疫チェックポイント阻害剤と併用されてもよい。チェックポイントタンパク質は、どの細胞が健常で、どの細胞が破壊されるべきかを免疫系に示すことによって、免

10

20

30

40

50

疫系を抑制する。チェックポイントタンパク質は、T細胞の活性化を防止することによって、免疫系に対する「ブレーキ」として働く。細胞の表面に、チェックポイントタンパク質が十分に存在しない場合は、その細胞は、免疫系によって破壊される。がん細胞の場合、細胞が癌性であるというシグナルを出す分子が存在するが、細胞表面にチェックポイントタンパク質が十分に存在する場合は、その細胞は免疫応答を回避し得るため、チェックポイントタンパク質のために、いくつかのがんの免疫療法が不成功に終わることが推測される。

【0172】

チェックポイントタンパク質として最もよく知られている例は、PD-L1（プログラム細胞死リガンド1）である。PD-L1の受容体は、PD-1である。PD-L1は、T細胞が健常細胞を攻撃することを防止する。がん細胞は、防御機構として、PD-L1を上方制御し得る。PD-L1が、T細胞表面のPD-1受容体を活性化すると、T細胞は、シグナルを受けて自身を破壊する。T細胞が、がん細胞を選択的に攻撃するようにプログラムされている場合、そのT細胞のセットは破壊され、がんが優勢となる。

10

【0173】

別のチェックポイントタンパク質は、細胞毒性Tリンパ球抗原4、すなわちCTLA4である。細胞毒性T細胞がいったん活性化すると、その表面にCTLA4を発現し、その後、互いに共通するリガンドである、抗原提示細胞のB7-1およびB7-2について、共刺激分子であるCD28と競合する。このバランスによって細胞毒性活性が抑制される一方、T細胞の機能を、自己限定的な様式で進行させる。

20

【0174】

他のチェックポイントタンパク質としては、共刺激チェックポイントタンパク質であるCD-137（4-1BB）；寛容T細胞上のPD-1と共発現されるCD-4関連阻害性受容体である、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3、CD223）；B7スーパーファミリータンパク質であるB7-H3およびB7-H4；T細胞タンパク質TIM3；ならびに、アポトーシスの際に外側構成要素の表面に転位することによって、そうでない場合に、壊れつつある細胞内容物の処理および排除の際に生じるであろう過剰な免疫活性化を抑制する、正常細胞におけるリン脂質であるホスファチジルセリン（PS）が挙げられる。PSの外在化は、間接的に、マクロファージを刺激し、その結果、樹状細胞の抗原提示を抑制する。PD-L1と同様に、外在化PSは、いくつかの腫瘍細胞および腫瘍由来の微小胞によって、異常発現される。したがって、PSは、適応腫瘍免疫を防止するために、腫瘍によって利用されると考えられる。

30

【0175】

これらのチェックポイントタンパク質のいずれかを標的とし得る、または阻害し得る、免疫療法剤は、「チェックポイント阻害剤」として知られている。

【0176】

チェックポイント阻害剤（免疫チェックポイント調整物質、すなわちCPMとしても知られている）は、チェックポイントタンパク質の効力を低下させるように設計されている。理想的には、CPMは、免疫系に健常な組織を攻撃させることなく、がんを免疫系に曝露させるべきである。

40

【0177】

チェックポイント阻害剤がいくつか知られており、がんの治療において、本発明の薬剤と併用することができる。例えば、そのような阻害剤は、参照により本明細書に援用されるCreelan（2014）Cancer Control 21：80～89に記載されている。

【0178】

チェックポイント阻害剤の例としては、CTLA-4に対する親和性が高いヒトIgG2モノクローナル抗体であるトレメリムマブ（CP-675，206）；CTLA-4に対するヒトIgG1モノクローナル抗体であるイピリムマブ（MDX-010）；検出可能な抗体依存性細胞毒性（ADCC）を本質的に欠く、ヒトモノクローナル抗PD1 I

50

g G 4 抗体であるニボルマブ ( B M S - 9 3 6 5 5 8 ) ; F c 媒介性 A D C C を防止するように設計された、C 2 2 8 P の変異を含有する、ヒト化 I g G 4 抗 P D - 1 抗体である M K - 3 4 7 5 ( 旧ランプロリズマブ ) ; 全長ヒト I g G 4 モノクローナル抗 C D 1 3 7 抗体であるウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) ; 抗 L A G - 3 モノクローナル抗体 ( B M S - 9 8 6 0 1 6 ) ; および P S に対するキメラ I g G 3 抗体であるバビツキシマブ ( キメラ 3 G 4 ) が挙げられる。これらのチェックポイント阻害剤は、全て、本発明において用いることができる。

【 0 1 7 9 】

別の方策は、腫瘍細胞表面において、P D - 1 のリガンドである P D - L 1 を阻害することであり、したがって、例えば、ヒト I g G 1 - カッパ抗 P D - L 1 モノクローナル抗体である M P D L 3 2 8 0 A ( R G 7 4 4 6 ) などの、P D - L 1 の阻害剤を、本発明の薬剤と併用してもよい。M E D I 4 7 3 6 は、別の I g G 1 - カッパ P D - L 1 阻害剤である。

10

【 0 1 8 0 】

また別の手法は、B 7 - D C - F c 融合タンパク質を用いて、受容体 P D - 1 を競合的に阻害することであり、したがって、このような融合タンパク質を、本発明において用いることもできる。

【 0 1 8 1 】

さらなる別の手法においては、キラー細胞免疫グロブリン様受容体に対する抗体を、免疫療法剤として用いてもよい。キラー細胞免疫グロブリン様受容体 ( K I R ) は、NK 細胞の細胞毒性活性を下方制御する、NK 細胞上の受容体である。H L A クラス I アリル特異的 K I R 受容体は、細胞溶解性 ( C D 5 6 d i m C D 1 6 + ) NK 細胞において発現されるが、C D 5 6 b r i g h t C D 1 6 - NK サブセットは、これらの K I R を欠いている。この線に沿うと、阻害性 K I R は、腫瘍周囲の NK 細胞浸潤物において選択的に発現されていると考えられ、したがって、P D - L 1 と同様に、腫瘍によって取り込まれるチェックポイント経路であると考えられる。したがって、抗体を用いて特定の K I R を阻害することによって、インビボにおいて NK 細胞の活性化が維持されるはずである。例えば、リリルマブ ( I P H 2 1 0 2 ) は、K I R に対する全長ヒトモノクローナル抗体であり、本発明にしたがって、これを用いることができる。

20

【 0 1 8 2 】

がん抗原を認識し、結合する適切な抗体を、本発明の薬剤と併用してもよい。がん抗原、すなわち治療用抗体の標的としては、例えば、C D 5 2 、 C D 4 7 、 C D 3 0 、 C D 3 3 、 C D 2 0 、 C D 1 5 2 、 および C D 2 7 9 などの多くの「C D」タンパク質；血管内皮成長因子 ( V E G F ) などの成長因子；上皮成長因子受容体 ( E G F R ) またはヒト上皮成長因子受容体 2 ( H E R 2 ) などの成長因子受容体が挙げられる。

30

【 0 1 8 3 】

このような抗原に結合する、またはこのような抗原を標的とする、抗体がいくつか知られており、これらは、がんの治療用として認可されている。これらの抗体のいずれかを、本発明の薬剤と併用してもよい。好ましい抗体は、固形腫瘍の治療に有用な抗体であり、特に、乳癌、卵巣癌、および膵癌などの、E C M が変化している固形腫瘍の治療に有用な抗体である。

40

【 0 1 8 4 】

公知の、認可されている抗体としては、例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ブレソキシマブ・ベドチン、セツキシマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、ハーセプチン、イブリツモマブ・チウキセタン、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、およびトラスツズマブが挙げられる。

【 0 1 8 5 】

アレムツズマブは、フルダラビン耐性慢性リンパ球性白血病 ( C L L ) 、皮膚 T 細胞リンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫、および T 細胞前リンパ球性白血病の治療に適用される、抗 C D 5 2 ヒト化 I g G 1 モノクローナル抗体である。

50

## 【0186】

ベバシズマブ（アバスチン）は、血管内皮成長因子A（VEGF-A）（通常、接尾語なしでVEGFと称される）に結合する、ヒト化IgG1モノクローナル抗体である。ベバシズマブは、VEGFに結合し、これを物理的に阻害することによって、腫瘍の血管成長を招く受容体の活性化を防止する。ベバシズマブは、結腸癌、腎癌、肺癌、卵巣癌、神経膠芽細胞腫、および乳癌に対して認可されている。

## 【0187】

ブレンツキシマブ・ベドチンは、ホジキンリンパ腫および未分化大細胞型リンパ腫（ALCL）の治療に用いられる、第二世代のキメラIgG1抗体薬抱合体である。これは、微小管を破壊することによって細胞分裂を防止する薬物である、モノメチルオーリスタチンEに抱合された抗体である。この抗体は、ホジキンリンパ腫細胞およびALCL細胞の表面において高発現していることがよく見出されるCD30に結合し、次いで内在化され、ここで薬物は、抗体から外れて、細胞に対する効果を発揮する。細胞分裂を防止することによって、プログラム細胞死を誘導し、がん細胞を殺傷する。

10

## 【0188】

セツキシマブ（アービタックス）は、上皮成長因子受容体（EGFR）の細胞外ドメイン（細胞の外側にある受容体の一部）を標的とする、キメラIgG1モノクローナル抗体である。これは、大腸癌および頭頸部癌の治療に用いられる。細胞表面のEGFRにリガンドがいったん結合すると、細胞内において、悪性の性質に関連するシグナル伝達経路が活性化される。その例としては、がん細胞の増殖、浸潤、分化、およびがん幹細胞再生などを引き起こす、PI3K/AKT経路およびKRAS/BRAF/MEK/ERK経路が挙げられる。セツキシマブは、リガンドの結合を競合的に阻害して、EGFRの活性化、ひいては細胞シグナル伝達を防止することによって、機能する。

20

## 【0189】

ゲムツズマブ・オゾガマイシンは、細胞毒性カリケアマイシン誘導体に化学的に連結されたIgG4抗CD33抗体の「免疫抱合体」であり、急性ミエロイド性白血病（AML）の治療に用いられる場合がある。

## 【0190】

イブリツモマブ・チウキセタン（ゼヴァリン）は、放射性同位体イットリウム90（<sup>90</sup>Y）を結合したキレート剤に化学的に連結された、ネズミ抗CD20抗体である。これは、特定の種類の非ホジキンリンパ腫である、B細胞の腫瘍である濾胞性リンパ腫の治療に用いられる。

30

## 【0191】

イピリムマブ（イェルボイ）は、T細胞の活性化を負に調節する役割を有する表面タンパク質CTLA4に結合する、ヒトIgG1抗体である。CTLA4については、チェックポイント阻害剤の観点から、以下で説明する。

## 【0192】

ニモツズマブは、ヒト-マウスキメラ抗EGFRモノクローナル抗体であり、頭頸部の扁平上皮細胞癌（SCCHN）用として認可されている。

## 【0193】

オフアツムマブは、CD20に結合する、第二世代のヒトIgG1抗体である。慢性リンパ球性白血病（CLL）のがん細胞は、通常、CD20を発現するB細胞であるので、オフアツムマブは、CLLの治療に用いられる。CD20タンパク質の大型ループに結合するリツキシマブとは異なり、オフアツムマブは、それとは別の小型のループに結合する。

40

## 【0194】

パニツムマブ（ベクティビックス）は、EGF受容体に結合するヒトIgG2抗体である。セツキシマブと同様に、受容体とそのリガンドとの相互作用を阻害することによって、受容体による細胞シグナル伝達を防止する。パニツムマブは、大腸癌の治療に用いられる。

50

## 【0195】

リツキシマブは、CD20に特異的なキメラモノクローナルIgG1抗体であり、その親抗体であるイブリツモマブから開発された。イブリツモマブと同様に、リツキシマブは、B細胞に存在するCD20を標的とする。このため、癌化B細胞から形成されるある種の悪性腫瘍の治療に有効である。悪性腫瘍の例としては、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫および濾胞性リンパ腫などの中悪性度および低悪性度のリンパ腫、ならびにB細胞性慢性リンパ球性白血病などの白血病が挙げられる。

## 【0196】

トシツモマブは、放射性ヨウ素131に共有結合したネズミIgG2a抗CD20抗体であり、非ホジキンリンパ腫の治療用として認可された「ベクサル」として知られていたが、市場からは自主的に撤退している。

10

## 【0197】

トラスツズマブ(ハーセプチン)は、上皮成長因子受容体2タンパク質(HER2)に特異的な、モノクローナルIgG1ヒト化抗体である。1998年にFDAの認可を受け、臨床的には乳癌の治療に用いられる。HER-2は、膜貫通型チロシンキナーゼの上皮成長因子受容体(EGFR)ファミリーのメンバーである。本発明の好ましい実施形態においては、好ましくは卵巣癌の治療に用いられる免疫療法剤、すなわち抗癌剤は、トラスツズマブである。

## 【0198】

別の実施形態においては、抗体は、抗CD47抗体、すなわち、CD47のシグナル伝達を阻害する抗体である。このような抗体は、実験室における細胞およびマウスの試験において、広範ながんおよび腫瘍を排除する、またはその成長を阻害することが示されている。CD47は、多くのがん細胞および多くの健常細胞に存在している。

20

## 【0199】

さらなる別の実施形態においては、抗体は、がん細胞表面に見出される炭水化物分子に対する抗体である。例えば、このような抗体は、抗GD2抗体であってもよい。GD2は、神経芽細胞腫、網膜芽腫、黒色腫、小細胞肺癌、脳腫瘍、骨肉腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、脂肪肉腫、繊維肉腫、平滑筋肉腫、およびその他の軟組織の肉腫などの多くの種類のがん細胞表面に見出されるガングリオシドである。通常は、正常組織の表面では発現されないため、腫瘍に対する特定の作用、および毒性の低減を可能にする、免疫療法の良い標的となる。さらなる実施形態においては、治療薬は、骨障害の治療または予防に用いられてもよい。このような障害としては、あらゆる骨の障害、または骨に関わる障害を挙げることができ、上述した腫瘍性の障害(すなわち、骨のがんまたは骨に関わるがん)および非腫瘍性の障害の両方を含む。上述したように、受容体QRFPRは、骨芽細胞で発現されることが示されており、QRFPRをロックアウトすると、破骨細胞の数が減少する。ユーイング肉腫および骨肉腫由来の臨床材料におけるQRFPR発現の観察結果と同様に、骨肉腫U2OS細胞におけるQRFPRレベルが、本出願において検出、定量化されており、また、GDF15による刺激によって調節されていることが見出された。

30

## 【0200】

したがって、好ましい実施形態においては、結合剤は、QRFPRに結合することができる。ポリペプチドは、いずれの受容体から得られてもよいし、いずれの受容体に由来するものであってもよいが、一実施形態においては、QRFPRから得られる、またはQRFPRに由来するものである。

40

## 【0201】

特に、骨障害は、骨吸収に関連する障害、例えば、高い、過剰な、または望ましくない、骨吸収に関連する障害であってもよい。一実施形態においては、骨障害は、骨粗鬆症であってもよく、特に、加齢性骨粗鬆症であってもよい。別の実施形態においては、骨障害は、骨減少症であってもよい。被験体は、ヒトであってもよいし、ヒト以外の動物であってもよい。好ましくは、被験体は哺乳動物である。特定の実施形態においては、被験体はヒトであるが、他の実施形態においては、例えば霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ブタ、ウ

50

シ、ウマなどの、飼育された動物であってもよいし、家畜であってもよいし、農場の動物であってもよいし、動物園の動物でもよいし、野生動物でもよいし、実験動物でもよいし、競技用（競走用など）の動物であってもよい。

#### 【0202】

上述したように、G D F 1 5 は、Q R F P R および C L P T M 1 に独立して結合する。G D F 1 5 は、エキソソームが放出されること、およびエンドソームがプロテアソームを標的とすること、による細胞表面における Q R F P R の減少を誘導することが見出されており、また、G D F 1 5 は、T G F - 受容体複合体を介した G S K B のリン酸化を上昇させることが見出されている。したがって、細胞表面における Q R F P R の減少を測定することによって、または G S K B のリン酸化の程度を測定することによって、これらの受容体のそれぞれに対する G D F 1 5 の「活性」、すなわち、G D F 1 5 が細胞に曝露された場合に、その生体機能が実行される程度、を求めることができる。よって、本発明の結合剤またはポリペプチドが、G D F 1 5 の活性を低減させる（すなわち、G D F 1 5 が、その生体機能を実行または発揮することを防止する）能力は、特定の結合剤またはペプチドが、G D F 1 5 の活性を低減させることができるかどうかを測定することによって、求められてもよい。したがって、本発明の結合剤またはポリペプチドは、好ましくは、G D F 受容体または G D F 1 5 に結合し、実質的に、G D F 1 5 の活性を阻害する、または無効にすることができる、すなわち、結合剤またはポリペプチドの非存在下における G D F 1 5 の活性レベルと比較して、G D F 1 5 の活性を 50% 未満、40% 未満、30% 未満、20% 未満、または 10% 未満まで低減させることができる。より好ましくは、結合剤またはポリペプチドは、G D F 1 5 の活性を 9% 未満、8% 未満、7% 未満、6% 未満、5% 未満、4% 未満、3% 未満、2% 未満、1% 未満、またはそれ以下まで低減させる。すなわち、結合剤またはポリペプチドは、好ましくは、G D F 1 5 の活性を効果的に消滅させてもよい。

10

20

#### 【0203】

治療用組成物は、結合剤、およびタンパク質またはペプチドに加えて、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含んでもよい。本明細書における「薬学的に許容される」とは、組成中の他の成分と共存できるだけでなく、受容者に生理学的に許容される、成分のことをいう。組成物、および担体または賦形物質の性質、投与量などは、好みや、望ましい投与経路、pH、温度などに応じて、常用の様式で選択されてもよい。

30

#### 【0204】

治療薬の投与量は、標準的な臨床的慣習にしたがって、常用の様式で決定されてもよい。服用量としては、0.1 ~ 10 mg / kg、例えば、0.1 ~ 0.5 mg / kg、0.1 ~ 1 mg / kg、0.1 ~ 2 mg / kg、0.1 ~ 5 mg / kg、0.5 ~ 1 mg / kg、0.5 ~ 2 mg / kg、0.5 ~ 5 mg / kg、0.5 ~ 10 mg / kg、1 ~ 2 mg / kg、1 ~ 5 mg / kg、1 ~ 10 mg / kg、2 ~ 5 mg / kg、2 ~ 10 mg / kg、または 5 ~ 10 mg / kg が、病気の進行が観察されるまで、または許容できない毒性が観察されるまで、毎日、毎週、10日毎、2週間毎、3週間毎、または毎月、投与されてもよい。

40

#### 【0205】

さらに、治療薬は、簡便な様式、または望ましい様式で、例えば、非経口的に投与されてもよいし、経口的に投与されてもよい。例えば、経口投与（薬剤の性質および/または処方による）などの経腸投与によって投与されてもよいし、静脈注射、皮下注射、筋肉注射、腹腔内注射または点滴によって投与されてもよい。投与は、治療される疾患、薬剤の性質、および/または処方などに応じて、全身投与であってもよいし、局所投与であってもよい。したがって、例えば、薬剤は、点滴または直接的な注射などによって、がんが存在する部位または場所などに、局所的に送達されてもよい。

#### 【0206】

G D F 1 5 と、受容体である Q R F P R および/または C L P T M 1 との相互作用、あるいは G D F 1 5 が受容体のうちの1つまたは両方に結合することによる効果、が検出さ

50

れ得、このような検出方法は、本明細書で開示される治療法または予防法のためのコンパニオン診断の基礎として、用いられてもよい。

【0207】

したがって、その相互作用および/または効果の検出を用いて、被験体が、本発明に係る治療もしくは予防（防止）を必要とする、またはその恩恵を受ける、ということを検出または決定しても、あるいは、本発明に係る治療もしくは予防（防止）を必要とするかどうか、またはその恩恵を受けるかどうか、を検出または決定してもよいし、例えば治療の途中または終了時に、その治療もしくは予防をモニターまたは評価してもよい。したがって、受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1に対してGDF15が及ぼす作用が存在すること、あるいは受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1において検出可能なGDF15による効果が存在することは、例えば、本発明に係る治療または予防における投与予測バイオマーカーなどのバイオマーカーとして用いられてもよいし、その治療または予防の効果モニターまたは評価するために用いられてもよい。さらに、その相互作用および/または効果を検出することによって、被験体が、がん、特に、原発性骨がんまたは骨への転移などの骨がんといった、GDF15の高いレベルに関連する疾患に罹患しているかどうかを決定または検出してもよい。特に、骨への転移を検出するのに用いられてもよい。

10

【0208】

したがって、本発明のさらなる態様は、特に、本発明に係る治療薬（受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1に対してGDF15が及ぼす作用を阻害できるポリペプチドおよび/または結合剤であり、例えば本明細書で定義される薬剤である）を投与することによって、治療または予防を必要とする被験体を検出する方法を提供し、該方法は、被験体において、GDF15と、その受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1との相互作用、ならびに/あるいはこのような相互作用の効果を検出することを含む。

20

【0209】

別の態様においては、本発明は、本発明に係る治療薬（受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1に対してGDF15が及ぼす作用を阻害できるポリペプチドおよび/または結合剤であり、例えば本明細書で定義される薬剤である）を被験体に投与することによって、治療法または予防法を評価またはモニターする方法を提供し、該方法は、被験体において、このような相互作用の効果を検出および/またはモニターすることを含む。

30

【0210】

またさらなる態様は、GDF15の高いレベルに関連する疾患に罹患している、またはそのような疾患を発症するリスクがある、被験体を検出する方法を提供し、該方法は、該被験体において、受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1に対してGDF15が及ぼす作用、あるいは該作用の効果、を検出することを含む。

【0211】

その相互作用または効果は、インビボ（すなわち被験体）において検出されてもよいし、インビトロにおいて検出されてもよい。すなわち、その相互作用または効果は、被験体の体内で検出されてもよいし、好ましくは、該被験体由来の試料において検出されてもよい。試料は、適切な臨床試料であればどのようなものであってもよい。より具体的には、試料は、受容体であるQRFPRおよび/またはCLPTM1を発現する細胞を含む試料であってもよい。したがって、試料は、細胞を含有する、被験体由来の臨床試料であればどのようなものであってもよい。例えば、組織の生検試料、血液試料もしくは血液由来の試料（血漿、血清、もしくはそれらの画分）、尿、CSF、唾液、または糞便などの、組織または体液の試料、あるいはスワブ、洗液またはすすぎ液などの試料であってもよい。

40

【0212】

相互作用は、2つ以上の結合パートナー間における結合または相互作用を検出するための、当該技術分野で公知のいずれの手段によっても検出され得る。したがって、本方法は

50

、G D F 1 5 と受容体との間の結合を検出することに基づくいずれの方法であってもよい。例えば、本方法は、近接アッセイに基づく方法であってもよく、特に、G D F 1 5 および受容体に対する抗体系結合パートナーを用いることに基づく近接アッセイであってもよい。近接アッセイは、当該技術分野においてよく知られており、文献において広く説明されている。直接的にまたは間接的に検体に結合できる結合パートナー（例えば、中間的検体結合抗体または検体に対する他の結合パートナー）と、プローブが近接して結合した場合に（例えば、相互作用対のパートナー同士が相互作用した、または互いに結合した場合に）、他の近接プローブの核酸ドメインと相互作用して検出可能なシグナルを生じる核酸ドメインと、をそれぞれ含む、対となる（またはそれ以上の）近接プローブに基づく近接アッセイが開発され、オーリンク社（Olink AB）（ウプサラ、スウェーデン）によって商品化されている。近接プローブの核酸ドメイン間の相互作用は、核酸のライゲーション反応および/または伸長反応を含んでいてもよく、また、ライゲーション産物および/または伸長産物を検出することによって、その相互作用が検出されてもよい。核酸ドメイン自体が相互作用してもよいし（例えば、共にライゲーションしてもよいし）、さらなる1つ以上のオリゴヌクレオチドに由来するライゲーション産物および/または伸長産物を形成するための鑄型として機能してもよい。細胞試料または組織試料におけるインサイチュでの相互作用を検出するのに用いられ得る、インサイチュ近接ライゲーションアッセイ（PLA）について、特に言及してもよい。このようなアッセイは、オーリンク社によって開発され、デュオリンク（Duolink）（登録商標）のブランド名で販売されている。近接アッセイについては、US 6 8 7 8 5 1 5、US 7 3 0 6 9 0 4、WO 2 0 0 7 / 1 0 7 7 4 3、WO / EP 2 0 1 2 / 0 5 1 4 7 4、およびWO 2 0 1 2 / 1 5 2 9 4 2 に記載がある。

#### 【0213】

G D F 1 5 と受容体との間の結合を検出するさらなる方法としては、酵素結合免疫アッセイ（ELISA）、放射線免疫アッセイ（RIA）、または免疫PCRなどの免疫アッセイが挙げられる。

#### 【0214】

ここまで、G D F が Q R F P R または C L P T M 1 に結合することによる様々な効果について説明したが、これらの効果は、検出され得る。特に好ましい実施形態においては、Q R F P R 陽性エキソソームの生成が、検出されてもよい。Q R F P R 陽性エキソソームは、ウエスタンブロットなどによって、例えば、細胞から得られた調整培地において、検出され得る。あるいは、Q R F P R 陽性エキソソームは、蛍光顕微鏡法または電子顕微鏡法などの顕微鏡法によって、検出され得る。また、Q R F P R 陽性エキソソームに対して G D F 1 5 が及ぼす作用も、例えば、上記の近接系検出アッセイのいずれかによって、検出され得る。特に、インサイチュ PLA が用いられてもよい。さらなる好ましい実施形態においては、G D F 1 5 による C L P T M 1 の活性化によって生じる、G S K 3 b のリン酸化が検出されてもよい。一実施形態においては、これは、例えば、G S K 3 b に結合することができる第1のプローブと、リン酸基に結合することができる第2のプローブとを用いることによって、近接系検出アッセイを用いて行われてもよい。一実施形態においては、検出は、PLAによって行われてもよく、特に、インサイチュ PLA によって行われてもよい。

#### 【0215】

本発明は、以下の実施例および図面によって、さらによく理解されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0216】

【図1】図1は、Q R F P R を含むエキソソームが、G D F 1 5 に曝露された細胞から放出されることを示す。図1Aは、G D F 1 5 に曝露された M C F - 7 乳癌細胞に由来する調整培地から得られた、エキソソームの電子顕微鏡写真である。図1Bは、M C F - 7 細胞に由来する調整培地から得られた、エキソソームのウエスタンブロットであり、Q R F P R が、単一バンドとして 4 9 k D a の位置に検出されている。G D F 1 5 に曝露された

細胞は、調整培地において、GDF15に曝露されていない細胞よりもQRFPRLレベルが高かった。

【図2】図2は、細胞表面のGDF15-QRFPRL複合体を示す。図2Aおよび2Bは、MCF-7細胞表面のGDF15-QRFPRL複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図2Aは、スリダクスルフィド曝露後の細胞を示す。細胞は、siRNAコントロール(スクランブルRNA)で処理した。図2Bは、スリダクスルフィド曝露後の細胞を示し、QRFPRLのsiRNAを用いて処理することによって、細胞に存在するQRFPRLレベルが低減された。

【図3】図3は、GDF15による刺激によって、細胞表面のACTRIIB-QRFPRL複合体レベルが低減され、GDF15によって、初期エンドソーム抗原1(EEA1)がQRFPRLに集められることを示す。図3Aおよび3Bは、MCF-7細胞表面のACTRIIB-QRFPRL複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。細胞を、37で20分間、GDF15で刺激することによって、表面における複合体レベルが低減された。図3Cおよび3Dは、MCF-7細胞表面のQRFPRL-EEA1複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。細胞を、37で5分間、GDF15で刺激することによって、EEA1がQRFPRLに集められた。

【図4】図4は、GDF15による刺激によって、細胞表面において、CD9-QRFPRL複合体が形成されることを示す。図4A~4Dは、MCF-7細胞表面のCD9-QRFPRL複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図4Aおよび4Cは、GDF15を添加しない、ネガティブコントロール細胞を示す。図4Bおよび4Dは、37で30分間、GDF15に曝露した後の細胞を示す。CD9-QRFPRL複合体は、GDF15で30分間刺激された細胞において、より高レベルで検出される。

【図5】図5は、GDF15による刺激によって、Rab11-QRFPRL二重陽性エンドソームが形成されることを示す。図5A~5Dは、MCF-7細胞におけるRab11-QRFPRL複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図5Aおよび5Cは、GDF15を添加しない、ネガティブコントロール細胞を示す。図5Bおよび5Dは、GDF15に曝露した後の細胞を示す。Rab11-QRFPRL複合体は、GDF15で刺激された細胞において、より高レベルで検出される。

【図6】図6は、GDF15による刺激によって、細胞におけるQRFPRLレベルが低減され、また、QRFPRLがプロテアソームによる分解の標的となることを示す。図6A~6Dは、細胞表面におけるQRFPRLの検出を示す。図6Aは、GDF15を添加しない、コントロール細胞を示す。図6Bは、GDF15に一晩曝露した後の細胞を示す。図6Cは、プロテアソーム阻害剤であるMG132で一晩処理したコントロール細胞を示す。図6Dは、プロテアソーム阻害剤であるMG132存在下で、GDF15に一晩曝露した後の細胞を示す。MG132非存在下でGDF15に曝露すると、QRFPRLレベルは低減される(図6B)が、MG132存在下では、QRFPRLレベルはGDF15の影響を受けない。これは、GDF15に誘導されるQRFPRLの分解が阻害されていることを示す。

【図7】図7は、GDF15による刺激によって、Rab4-QRFPRL二重陽性エンドソームが形成されることを示す。図7Aは、細胞をGDF15に曝露した後の、Rab4-QRFPRL複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図7Bは、細胞をGDF15に曝露した後の、Rab4-QRFPRL複合体の、インサイチュPLAによる検出を示し、ここでは、細胞を、QRFPRLの細胞外ドメインに結合する抗体とブレインキュベートした。ブロッキング抗体とブレインキュベートした細胞においては、検出されるRab4-QRFPRL複合体レベルは、低減されている。

【図8】図8は、QRFPRLおよびCLPTM1に由来するペプチドが、GDF15と相互作用できることを示す。図8Aは、QRFPRLおよびCLPTM1の細胞外ドメイン由来の、ビオチン標識したペプチドを、ストレプトアビジン-アガロースビーズに固定化したところ、十分な洗浄を行った後もGDF15と相互作用していることが見出されたことを示す。図8Bは、QRFPRLおよびCLPTM1の細胞外ドメインに由来するペプチド

10

20

30

40

50

を含む、GST融合タンパク質を、GDF15と共にインキュベートしたことを示す。これらのペプチドを含む融合タンパク質は、GDF15と相互作用することが見出された。

【図9】図9は、QRFP Rの細胞外ループ由来のペプチドが、GDF15が媒介する、QRFP Rのエンドソームへの集積を十分に阻害できることを示す。図9A～9Dは、MCF7細胞をGDF15に曝露した後の、Rab11-QRFP R複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図9Aは、コントロールペプチドを添加した場合を示す。図9Bは、QRFP Rの細胞外N末端ペプチドを添加した場合を示す。図9Cおよび9Dは、QRFP Rの細胞外ループ3(ドメイン4)ペプチドを添加した場合を示す。QRFP Rの細胞外ループ3由来のペプチドによって、Rab11-QRFP R複合体レベルが低減される。図9Eは、U2OS骨肉腫細胞における、QRFP Rの、インサイチュPLAによる検出を示す。棒グラフは、QRFP Rの細胞外ループ3由来ペプチドが、細胞表面で検出されたQRFP Rのレベルを、GDF15に曝露されていないコントロール細胞と同レベルまで回復できることを示している。

10

【図10】図10は、QRFP Rの細胞外ループ由来のペプチドは、細胞表面におけるQRFP Rレベルに対してGDF15が及ぼす効果を低減し得るが、内因性アゴニストであるP518によるQRFP Rの活性化には影響を及ぼさないことを示す。図10A～10Cは、細胞表面のQRFP Rの、インサイチュにおける検出を示す。図10Aは、GDF15を添加しない、ネガティブコントロール細胞を示す。図10Bは、GDF15に曝露した後の細胞を示す。図10Cは、GDF15、およびQRFP Rの細胞外ドメイン4に由来する合成ペプチドGEKEYDDVTIKに曝露した後の細胞を示す。ペプチドは、細胞表面からのQRFP Rの除去を逆転させた。図10D～10Fは、細胞表面のACTRIIBの、インサイチュPLAによる検出を示す。図10Dは、P518を添加しないコントロール細胞を示す。図10Eは、P518に曝露した後の細胞を示す。図10Fは、P518、および125モル過剰な、QRFP Rの細胞外ドメイン4に由来する合成ペプチドGEKEYDDVTIKに曝露した後の細胞を示す。P518が、細胞表面におけるACTRIIBレベルを上昇させる能力は、ペプチドによる影響を受けなかった。

20

【図11】図11は、QRFP Rの細胞外ドメインを標的とする抗体が、GDF15によって誘導されるエンドサイトーシスを防止できることを示す。図11A～11Cは、Rab4-QRFP R複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図11Aは、GDF15を添加しないネガティブコントロール細胞を示す。図11Bは、GDF15に曝露した後の細胞を示す。図11Cは、QRFP Rの細胞外ドメインを標的とする抗体とブレインキュベートした後に、GDF15に曝露した細胞を示す。

30

【図12】図12は、ペプチドアレイ上での結合を測定することによって、GDF15への結合に必要なQRFP Rの第3の細胞外ドメイン内の残基を同定する、ペプチドスクリーニングの結果を合わせて示す。図12Aは、固定化したペプチドに対するGDF15の結合結果を示す。図12Bは、ペプチドアレイで試験したペプチドのアラインメントを示す。下線を引いた残基は、アラニンへ置換した場合、または二重置換(AA)を行った場合に、結合が低減される残基を示す。スクリーニングに用いたペプチドの配列番号を示す。

【図13】図13は、一連のペプチドに対する抗体の結合を測定することによる、QRFP Rの細胞外ドメインを標的とするポリクローナル抗体のエピトープの同定を示す。図13Aは、固定化したペプチドに対するpAbの結合結果を示す。図13Bは、リガンド結合部位の位置と比較した、pAbのエピトープを示す結合結果の概要を示す。抗体のうちの1つにおけるエピトープは、リガンド結合部位とよく重複している。スクリーニングに用いたアミノ酸配列を、実施例8に示す。

40

【図14】図14は、CLPTM1を発現するNK細胞をGDF15で処理することによって、CLPTM1-TGFBRI複合体レベルが上昇することを示す。図14Aおよび14Bは、CLPTM1-TGFBRI複合体の、インサイチュPLAによる検出を示す。図14Aは、GDF15を添加しないネガティブコントロール細胞を示す。図14Bは、GDF15に曝露した後の細胞を示す。GDF15に応じて、CLPTM1-TGFB

50

R 1 複合体レベルが上昇する。

【図 15】図 15 は、CLPTM1 を発現する NK 細胞を GDF 15 で処理することによって、CLPTM1 - TGFBR1I 複合体レベルが上昇することを示す。図 15 A および 15 B は、CLPTM1 - TGFBR1I 複合体の、インサイチュ PLA による検出を示す。図 15 A は、GDF 15 を添加しないネガティブコントロール細胞を示す。図 15 B は、GDF 15 に曝露した後の細胞を示す。GDF 15 に応じて、CLPTM1 - TGFBR1I 複合体レベルが上昇する。

【図 16】図 16 は、CLPTM1 を標的とするモノクローナル抗体が、GDF 15 と、NK 細胞の CLPTM1 との相互作用を阻害できることを示す。図 16 A ~ 16 C は、リン酸化された GSK3b (GSK3b - p (9/21)) の、近接プローブ対を用いたインサイチュ PLA による検出を示す。図 16 A は、GDF 15 を添加しないネガティブコントロール細胞を示す。図 16 B は、GDF 15 およびコントロール抗体に曝露した後の細胞を示す。図 16 C は、CLPTM1 の細胞外ドメインを標的とするモノクローナル抗体とプレインキュベートした後に、GDF 15 に曝露した細胞を示す。図 16 D は、リン酸化された GSKb (p - GSKb) のレベルを示すウエスタンブロットである。レーン 1 は、GDF 15 を用いないものである。レーン 2 は、GDF 15 による刺激 (GDF15 stim) を加え、コントロール抗体 (ctrl ab) を添加したものである。レーン 3 は、GDF 15 による刺激を加え、マウスのモノクローナル抗体 (mAb) (インサイチュ PLA の実験で用いる抗体) を添加したものである。マウス mAb 抗体は、GDF 15 に曝露した細胞において、p - GSKb レベルを低減することができる。

【図 17】図 17 は、ペプチドアレイ上での結合を測定することによって、GDF 15 への結合に必要な CLPTM1 の細胞外ドメイン内の残基を同定する、ペプチドスクリーニングの結果を合わせて示す。固定化したペプチドに対する GDF 15 の結合結果を示す。

【図 18】図 18 は、一連のペプチドに対する抗体の結合を測定することによる、QRFPR の細胞外ドメインを標的とするモノクローナル抗体のエピトープの同定を示す。図 18 A は、固定化したペプチドに対する mAb の結合結果を示す。図 18 B は、リガンド結合部位の位置と比較した、mAb のエピトープを示す結合結果の概要を示す。抗体のうちの 1 つにおけるエピトープは、リガンド結合部位とよく重複している。

【図 19】図 19 は、免疫系の細胞が、CLPTM1 を発現することを示す。図 19 A は、フローサイトメトリーによって、SSC - A チャンネルおよびアレクサ (Alexa) - 488 チャンネルにおいて検出された CD4 + T リンパ球を示す。左図は、イソタイプのコントロールである。中図は、0.3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。右図は、3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。図 19 B は、フローサイトメトリーによって、SSC - A チャンネルおよびアレクサ - 488 チャンネルにおいて検出された CD8 + T リンパ球を示す。左図は、イソタイプのコントロールである。中図は、0.3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。右図は、3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。図 19 C は、フローサイトメトリーによって、SSC - A チャンネルおよびアレクサ - 488 チャンネルにおいて検出された CD45 + / CD3 + (非 T リンパ球) を示す。左図は、イソタイプのコントロールである。右図は、抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。CD4 + T リンパ球および CD8 + T リンパ球、ならびに CD45 + / CD3 + 非 T 細胞のいずれにおいても、CLPTM1 の発現が検出された。

【図 20】図 20 は、免疫系の細胞が、CLPTM1 を発現することを示す。図 20 A は、フローサイトメトリーによって、SSC - A チャンネルおよびアレクサ - 488 チャンネルにおいて検出された CD14 + 単球 / マクロファージを示す。左図は、イソタイプのコントロールである。中図は、0.3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。右図は、3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。図 20 B は、フローサイトメトリーによって、SSC - A チャンネルおよびアレクサ - 488 チャンネルにおいて検出された CD11c + 樹状細胞を示す。左図は、イソタイプのコントロールである。中図は、0.3 μg の抗 CLPTM1 - アレクサを用いた場合である。右図は、3 μ

10

20

30

40

50

gの抗CLPTM1-アレクサを用いた場合である。

【図21】図21は、CLPTM1を標的とするモノクローナル抗体が、GDF15と、NK細胞のCLPTM1との相互作用を阻害でき、また、GDF15によるNKGD2Dの下方制御を阻害できることを示す。図21Aおよび21Bは、NK細胞におけるNKGD2Dの検出を示す。図21Aは、GDF15に曝露した後の細胞を示す。図21Bは、CLPTM1の細胞外ドメインを標的とする抗体とプレインキュベートした後に、GDF15に曝露した細胞を示す。

【図22】図22は、CLPTM1-GDF15複合体が、肺扁平上皮細胞癌の転移癌に見出されることを示す。CLPTM1とGDF15との相互作用を、矢印で示す。この相互作用は、免疫系のCD3+細胞と共存していることが見出され、これは、CLPTM1

10

【図23】図23は、前立腺癌の骨への微小転移巣において、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られることを示す。骨への前立腺微小転移巣において、GDF15-QRFP R複合体をインサイチュPLAによって検出すると、骨に浸潤している前立腺癌微小転移巣の境界において、特異的な兆候が見られることが示される。

【図24】図24は、骨肉腫および前立腺癌の骨への転移において、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られることを示す。図24Aおよび24Bにおいては、骨への前立腺微小転移巣において、GDF15-QRFP R複合体をインサイチュPLAによって検出すると、骨に浸潤している前立腺癌微小転移巣の境界において、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られることが示される。図24Cは、原発性前立腺癌

20

【図25】図25は、ユーイング肉腫において、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られることを示す。図25Aにおいては、原発性骨がんにおいて、GDF15-QRFP R複合体をインサイチュPLAによって検出すると、原発性骨がんにおいて、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られ得ることが示される。図25Bは、ユーイング肉腫に隣接する組織のGDF15-CLPTM1複合体の、インサイチュにおける検出を示す(QRFP Rについて解析した図25Aの一部のスライド)。複合体は検出されず、このことは、CLPTM1が存在していないことを示している。

30

【図26】図26は、悪性骨髄腫において、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られることを示す。図26Aにおいては、骨髄腫において、GDF15-QRFP R複合体をインサイチュPLAによって検出すると、骨髄腫において、高いレベルのGDF15-QRFP R複合体が見られ得ることが示される。図26Bは、骨髄腫に隣接する組織のGDF15-CLPTM1複合体の、インサイチュにおける検出を示す(QRFP Rについて解析した図26Aの一部のスライド)。複合体は検出されず、このことは、CLPTM1が存在していないことを示している。

【図27】図27は、QRFP RおよびCLPTM1に由来するポリペプチドを含むFc融合タンパク質は、厳しい洗浄条件を用いたプルダウンアッセイにおいて、GDF15と相互作用することを示す。AP5は、QRFP Rポリペプチドを用いたものであり、AP2は、CLPTM1ポリペプチドを用いたものであり、AP1は、コントロールポリペプチドを用いたものであり、AP0は、ネガティブコントロールである。

40

【図28】図28は、LPSで刺激したCD14+免疫細胞におけるサイトカインの分泌に対する、抗CLPTM1抗体の効果を示す。サイトカインは、LPS存在下において分泌され、GDF15と接触した細胞においては、分泌が低減される。抗CLPTM1抗体は、IL12(図28A)およびTNF(図28B)を分泌する能力を回復させる。

【図29】図29は、LPSで刺激したCD14+免疫細胞におけるサイトカインの分泌に対する、CLPTM1ポリペプチドを含むFc融合タンパク質の効果を示す。サイトカ

50

インは、LPS存在下において分泌され、GDF15と接触した細胞においては、分泌が低減される。CLPTM1ポリペプチドを含むFc融合タンパク質は、IL12(図29A)およびTNF(図29B)を分泌する能力を回復させる。

【図30】図30は、LPSで刺激したCD14+免疫細胞におけるIFNの分泌に対する、CLPTM1ポリペプチドを含むFc融合タンパク質の効果を示す。LPS存在下および非存在下のいずれにおいても、分泌は検出されないが、CLPTM1ポリペプチドを含むFc融合タンパク質と接触させた細胞においては、IFNが検出され、IL12を分泌する能力が回復した。

【図31】図31は、CLPTM1由来のペプチドに対するGDF15の結合を示す。配列番号250~273に示すアミノ酸を有するポリペプチドを、ストレプトアビジンでコーティングしたウェルに固定化し、各ペプチドに対するGDF15の結合を測定した。

【図32】図32は、CLPTM1における、ポリクローナルウサギ抗CLPTM1抗体(バイオス社)に対するエピトープのマッピングを示す。異なる2つのエピトープが同定された。図33Aは、エピトープ1の同定について示し、図33Bはエピトープ2の同定について示す。

#### 【実施例】

#### 【0217】

(実施例1-タンデムアフィニティ精製-質量分析)

発明者らは、相互作用するタンパク質をスクリーニングするために、同一のアフィニティタグを有する異なる一連のタンパク質を用いる、タンパク質-タンパク質相互作用捕捉アッセイを設計し、GDF15を加えた。様々ながんを含む人の病理学において重要な役割を果たし、また、相互作用しているタンパク質および受容体についての科学文献において見解の相違が見られるので、GDF15を選択し、パネルに加えた。

#### 【0218】

<複数のベイト(bait)タンパク質の設計と構築>

生命情報化学(SSPRO、RASMO)解析を行うことによって、ベイトに存在する疎水性アミノ酸を排除して、公知の二次構造要素が破壊されるのを回避した。ベイトのインサートを、PCRによってプラスミドDNAから増幅し、ゲンタマイシンによる選択が可能で真核生物発現ベクターに挿入した。

#### 【0219】

発現ベクターを用いて細胞のトランスフェクションを行い、GDF15を含む一連のベイトタンパク質について、過剰発現を行う安定細胞株を同時に開発した。

#### 【0220】

クローン選択を行い、続く質量分析による解析を行うのに十分な材料を準備できるほど、十分な量( $10^8$ 個の細胞)を得られる範囲まで細胞を増殖させた後、調整培地を、ベクターのフレームにコードされた(したがって、GDF15を含むベイトタンパク質との融合体として発現される)タグに対するアフィニティ精製に供した。このように、ベイトタンパク質は、真核生物の宿主において発現され、正しく折り畳まれる可能性を高くした。さらに、このようにして「人工」自己分泌/傍分泌ループを構築すると、ベイトリガンドで宿主細胞を刺激することによって、例えば、タグ付きのベイトを用いた共精製によって後に捕捉される受容体を含有するエキソソームを放出するなど、ベイトに対する応答が様々な形で行われるようになった。

#### 【0221】

要するに、異なる培養で得られる、GDF15などの、タグ付きのタンパク質は、アフィニティ基質を用いて捕捉され、界面活性剤を含有する高い塩濃度の緩衝液で十分に洗浄された後、アフィニティ基質から溶出され、次いで質量分析による解析のために処理された。GDF15に結合したタンパク質を切断し、MS解析に供した。MSデータに基づいて、タンパク質を同定した。

#### 【0222】

様々なベイトを用いて、複数回解析を行った。同一のタグを用い、ベイトのみを個別に変

10

20

30

40

50

更すると、特定のベイトと特異的に共精製するタンパク質を同定することができる。個別のベイトに対する特異的なヒットを容易に同定するために、ソフトウェアスクリプトを書いた。

**【0223】**

これらの複数の解析から、発明者らは、GDF15のベイトと特異的に共精製するQRFPRおよびCLPTM1を同定した。

**【0224】****<安定細胞株の開発>**

安定細胞株を樹立し、増殖後、収集した。血清を含有しない培地で細胞を洗浄し、血清を含有しない培地中で20時間増殖させた。

**【0225】****<フィルター上でのタンパク質のトリプシン消化>**

試料から500 $\mu$ Lを分取し、3kDaフィルター（ポール・ライフ・サイエンス社（Pall Life Sciences）、アンアーバー、ミシガン州、米国）を用いて、本質的にはWisniewskiらのプロトコール（Wisniewskiら、2009）にしたがって、フィルター上で消化した。トリプシン消化は、暗所にて、一晚、37 $^{\circ}$ Cで行った。その後、試料を遠心分離して、未消化のタンパク質およびトリプシンを濃縮液中に保持しつつ、トリプシンによって生じたペプチドをろ液中に回収した。100 $\mu$ Lの50%ACN、1%HAcを追加し、フィルターを10分間回転させて、最初のトリプシン消化によって生じたペプチドのろ液と共に保存した。最後に、回収したろ液を、スピードバックシステム（Speedvac system）ISS110（サーモ・サイエンティフィック社（Thermo Scientific）、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）を用いて凍結乾燥し、10 $\mu$ Lの0.1%TFAに再溶解して、ナノLC-MS/MSを用いて同定を行った。

**【0226】****<タンパク質同定のためのナノLC-MS/MS>**

ナノエレクトロスプレーイオン化（ESI）イオン源を備えた、7TハイブリッドLTQ FT質量分析計（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社（ThermoFisher Scientific）、ブレーメン、ドイツ）を用いて、タンパク質同定実験を行った。アジレント（Agilent）1100ナノフローシステム（アジレント・テクノロジー社（Agilent Technologies）、ヴァルトブロン、ドイツ）を用いて、オンライン・ナノLC分離を行った。自ら詰めた15cmの溶融石英エミッター（内径75 $\mu$ m、外径375 $\mu$ m）で、ペプチドの分離を行った。加圧パッキング装置を50~60barで運転して、逆相完全末端被覆レプロシル（Reprosil）-Pur C<sub>18</sub>-AQ 3 $\mu$ m樹脂（ドクター・マイシュ社（Dr. Maisch GmbH）、アンマーブーフ-エントリンゲン、ドイツ）のメタノールスラリーをエミッターに詰めた。移動相A（0.5%酢酸を含む水）および移動相B（89.5%アセトニトリル、10%水、および0.5%酢酸）を用い、流速200nL/分で分離を行った。100分間、2%Bから50%Bまでグラジエントをかけ、その後98%Bを用いた洗浄ステップを5分間行った。

**【0227】**

共通のアフィニティタグおよびリンカーを有するベイトタンパク質を、同一のベクターコンストラクトから産生した。発明者らは、これらのベイトを用いて、G418で選択した、安定細胞から調製された調整培地中で相互作用しているタンパク質をスクリーニングし、質量分析（MS）によって、相互作用しているタンパク質を同定した。各ベイトに特異的なヒットを分類するために、発明者らは、自ら、データ・ドラッジャー（Data Drudger）というソフトウェアを開発した。発明者らは、この解析から、GDF15をベイトとして用いた場合にのみ、トリプシン消化によって生じたQRFPR由来のペプチドを同定した。発明者らの初期のTAP-MSスクリーニングにおいて、GDF15のベイトと共精製する第2のタンパク質も見出された。このタンパク質は、口唇口蓋裂膜貫通タンパク質1（CLPTM1）と同定された。

**【0228】**

(実施例 2 - 調整培地からの Q R F P R 含有エキソソームの精製)

<エキソソームの単離>

調整細胞培養液を、細胞を沈殿させるために 3,000 × g で 5 分間、次いで、細胞および細胞片をさらに除去するために 10,000 × g で 10 分間、順次遠心分離した。その後、上清を 0.45 μm フィルターでろ過し、最後に、100,000 × g で 2 時間、4 で沈殿させた。沈殿したエキソソームを P B S に再懸濁し、プロテアーゼ阻害剤 (コンプリート・ミニ (complete mini)、ロシュ社 (Roche)) を添加した。その後、他で述べるように、さらなる解析のために試料を調製した。

【0229】

<電子顕微鏡法によるエキソソームの同定>

沈殿したエキソソームを、20メッシュのフォルムヴァール/カーボン被覆銅製グリッド (ポリサイエンス社 (polysciences, Inc.)) に付着させて、テックナイ (Technai) G 2 (F E I 社 (FEI)) を用いた、80 k V の透過型電子顕微鏡法 (T E M) によって解析した (図 1 A)。

【0230】

<ウエスタンブロットによる Q R F P R 陽性エキソソームの同定>

12.5% S D S - P A G E ゲル (バイオラッド社 (Biorad)) を用いて、150 V で 80 分間、超遠心分離で得られた沈殿由来の物質を分離し、イモビロン (Immobilon) K メンブレンへの湿式転写を行い、5% B S A で 1 時間ブロックした後、対応する Q R F P R 抗体と共に、軽く振盪しながら一晩 4 でインキュベートした。メンブレンを T B S T で洗淨し、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させた対応する二次抗体を室温で 1 時間反応させた後、メンブレンを T B S T で洗淨し、E C L 検出試薬を用いて現像した (図 1 B)。

【0231】

(実施例 3 - 細胞表面の G D F 1 5 - Q R F P R の検出)

G D F 1 5 と Q R F P R との複合体が細胞表面に存在しているかを確認するために、発明者らは、スリダクスルフィド (N S A I D の一種; 量が少ない内因性の G D F 1 5 を増加させるため) で処理した M C F - 7 細胞を、インサイチュ P L A を用いて G D F 1 5 と Q R F P R との相互作用を検出することによって解析した。発明者らは、Q R F P R の s i R N A (図 2 B) またはスクランブル配列を有するコントロール s i R N A (図 2 A) のいずれかで処理された M C F - 7 細胞において、G D F 1 5 と Q R F P R とが近接する事象が起こるレベルを比較した。発明者らは、Q R F P R の s i R N A で処理した細胞において、G D F 1 5 - Q R F P R のレベルが低下していることを発見し、これによって、抗体の特異性と、この細胞株に受容体が存在していることを実証した。細胞は、血清飢餓状態としてから G D F 1 5 処理に供した。

【0232】

(実施例 4 - G D F 1 5 による刺激によって細胞表面の Q R F P R レベルは低下する A C T R I I B - Q R F P R の近接性の検出)

T G F スーパーファミリー (G D F 1 5 が属している) のメンバーは、I 型受容体を 2 つと I I 型受容体を 2 つ含む、ヘテロ四量体である受容体複合体を介して、シグナル伝達を行う。I I 型受容体はリガンドに結合して、これを I 型受容体に提示する。発明者らは、G D F 1 5 に対応する I I 型受容体を同定することを試みた。

【0233】

T G F b スーパーファミリーの I I 型受容体として知られているのは 5 つだけであり、まず、A C T R I I B が、このような対応する I I 型受容体の条件のいくつかを満たすと仮定した。A C T R I I B は、系統的に G D F 1 5 に近い、T G F b スーパーファミリーのメンバーである、G D F 8 の 2 型受容体である。さらに、A C T R I I B は、脂肪の代謝に関わっていることが示唆されている。Q R F P R は、脂肪細胞において発現されると説明されている。

【0234】

10

20

30

40

50

MCF7細胞をGDF15（アブカム社（Abcam）およびバイオビジョン社（Biovision）から購入した、哺乳動物源から単離されたGDF15、または大腸菌（E.coli）由来の組換え体）で刺激した。GDF15の活性をモニターし、また、リガンドによるQRFPRの調節などの、受容体の動態を確認するための、アッセイを行った。

#### 【0235】

血清飢餓状態のMCF7細胞をGDF15で処理した後、デュオリックの二次検出試薬を用いることができるように異なる2つの種由来の抗体を用いて、インサイチュPLA検出アッセイを行い、ACTRIIBとQRFPRとの相互作用を検出した。GDF15非存在下において、存在するQRFPR-ACTRIIB複合体を検出した（図3A参照、矢印で示す）。しかしながら、まず驚いたことには、得られたシグナルは、GDF15処理による短期の刺激（20分）によって低下した。このことは、GDF15による動的な調節を示唆している（図3B参照）。興味深いことには、血清による効果が混同することを回避するために、一晚血清飢餓状態にしたMCF7細胞を用いた実験において、血清飢餓状態の細胞では、QRFPRの発現が増加していることが見出された。

10

#### 【0236】

文献からは、GDF15およびQRFPRは、NPYおよびPOMCという下流の2つの標的に対しての効果が逆であることがわかる。したがって、GDF15が、細胞表面のQRFPRレベルに干渉し得ることが示唆される。QRFPRを細胞表面から除去した場合、その親水性作動性ペプチドリガンド（26RFアミドおよびQRFPR）がNPYおよびPOMCを調節する効果もまた、阻害される。GDF15が、NPYおよびPOMCなどの、哺乳類の代謝の中心となる重要な標的を調節する能力、ならびに悪液質において報告されているGDF15の役割は、GDF15によるQRFPRの阻害で説明され得る。

20

#### 【0237】

<EEA1-QRFPRの近接性の検出>

QRFPRが内在化するのに、GDF15が果たす役割を確認するために、エンドソームの形成をモニターできる一連のインサイチュPLAアッセイを行った。

#### 【0238】

初期エンドソームマーカー1（EEA1）は、急速なエンドソーム形成のマーカーであり、アッセイを行って、EEA1およびQRFPRの近接性を検出した。GDF15非存在下において、シグナルは得られなかった（図3C）。しかしながら、EEA1およびQRFPRに対する抗体を用いた後、デュオリック二次プローブを用いるインサイチュPLAアッセイで測定されたように、GDF15への短時間（5分間）の曝露が、EEA1およびQRFPRが近接することによって生じるRCA産物の数を増加させるのに十分であることが見出された（図3D参照、矢印で示す）。

30

#### 【0239】

発明者らは、また、GDF15が、QRFPR陽性エキソソームの放出を誘導することを観察した。このことは、経路が2つに分かれており、2つの方法によって、GDF15が細胞表面のQRFPRレベルを低下させ得るということを示唆している。そこで、発明者らは、二重の役割を有する、すなわち、エンドソームの輸送およびエキソソームの輸送の両方において役割を有する、ことが知られているマーカーを含むアッセイを行うことを試みた。

40

#### 【0240】

<CD9-QRFPRの近接性の検出>

テトラスパニンCD9は、二重の役割を有する、すなわち、エンドソームの輸送およびエキソソームの分泌の両方において役割を有する（Mazurovら）。CD9およびQRFPRに対する抗体を用いて、インサイチュPLAアッセイを行い、CD9およびQRFPRの近接性を検出した。GDF15非存在下においては、低レベルのシグナルしか観察されない（図4Aおよび4C）。GDF15で30分間刺激すると、高レベルのCD9-QRFPR複合体のシグナルが得られたが、このことは、エンドソームおよびエキソソームが形成されたことを示す（図4Bおよび4D）。

50

## 【0241】

< R A B 1 1 - Q R F P R の近接性の検出 >

R A B 1 1 タンパク質は、エンドソームを再循環させて細胞表面へと戻すマーカであり、また、R A B 1 1 経路は、エキソソームの集合にも関わっている ( S a v i n a ら、2005 ; S a v i n a ら、2002 )。したがって、R A B 1 1 は、G D F 1 5 が誘導する、細胞表面における Q R F P R の減少に関わる候補として有力であると考えられた。

## 【0242】

インサイチュ P L A アッセイを行い、R A B 1 1 および Q R F P R の近接性を検出した。G D F 1 5 非存在下においては、低レベルのシグナルしか観察されない ( 図 5 A および 5 C )。G D F 1 5 で刺激すると、細胞質において、R A B 1 1 - Q R F P R 二重陽性エンドソームが、急速に検出されるようになった ( 図 5 B および 5 D )。

10

## 【0243】

< プロテアソームによる分解の阻害 >

Q R F P R のエンドソームによる輸送によって、エキソソームが集合し、それに続いて放出されるのか、または、Q R F P R が、プロテアソームによる分解の標的となっているのかどうか、を確認するために、長時間、G D F 1 5 で細胞を刺激するアッセイを行った。

## 【0244】

以前の実験において、G D F 1 5 による刺激によって、細胞表面の Q R F P R レベルが低下したことが観察されていた。しかしながら、プロテオソーム阻害剤である M G 1 3 2 ( 最終濃度は 1 0 μ M ) によってプロテオソームを阻害すると、M G 1 3 2 非存在下で、同量の G D F 1 5 で処理された細胞と比較して、Q R F P R レベルが上昇した。図 6 A は、G D F 1 5 非存在下の細胞を示し、一方、図 6 B は、G D F 1 5 で一晩刺激した細胞を示しており、こちらは、細胞表面の Q R F P R が、検出できないレベルである。図 6 C は、プロテアソーム阻害剤である M G 1 3 2 に曝露させたコントロール細胞を示し、図 6 D は、プロテアソーム阻害剤である M G 1 3 2 に曝露させ、G D F 1 5 で一晩刺激した細胞を示す。

20

## 【0245】

本実験によって、G D F 1 5 が、プロテオソームが媒介する Q R F P R の分解を誘導することが実証される。M G 1 3 2 非存在下においては、G D F 1 5 で 1 8 時間処理することによって、Q R F P R レベルが劇的に低下した ( 図 6 B )。この効果は、M G 1 3 2 で処理した細胞では見られない ( 図 6 D )。

30

## 【0246】

< R A B 4 - Q R F P R の近接性の検出 >

R A B 1 1 陽性エンドソームは、R A B 4 を含んでいることも報告されているので、R A B 4 - R A B 1 1 二重陽性エンドソームが存在し得る。R A B 4 および Q R F P R に対する抗体を用いて、アッセイを行い、R A B 4 - Q R F P R の近接性を検出した。G D F 1 5 非存在下においては、R A B 4 - Q R F P R のシグナルは観察されなかった ( 図 7 A 参照 )。G D F 1 5 で刺激すると、R A B 4 - Q R F P R 二重陽性エンドソームの形成が検出された ( 図 7 B 参照 )。

40

## 【0247】

R A B 4 - R A B 1 1 二重陽性エンドソームは、エンドソームの公知の形態であり、よって、発明者らは、独立した 2 つの R A B マーカー ( 4 および 1 1 ) によって、細胞が G D F 1 5 に曝露された後、Q R F P R 陽性エンドソームが形成されることを実証するものである。

## 【0248】

Q R F P R 陽性エンドソームの形成をアッセイに利用することによって、例えば実施例 6 において、様々な G D F 1 5 阻害剤の効果を測定し得る。

## 【0249】

( 実施例 5 - インビトロにおける相互作用アッセイ )

50

G D F 1 5 と相互作用するペプチドの特徴をさらに調べるために、一連の G S T - 融合タンパク質およびビオチン化ペプチドを調製した。G D F 1 5 は、バイオビジョン社および/またはアブカム社から入手した。

【 0 2 5 0 】

< Q R F P R および C L P T M 1 に由来するペプチドを用いた G D F 1 5 のビオチンプルダウン >

Q R F P R および C L P T M 1 タンパク質由来の一連のペプチドを設計した。ペプチドを免疫沈降実験および細胞培養に基づくアッセイの両方に用いるために、各ペプチドの N 末端にビオチンを付加し、対イオンを塩化物イオンに変更した。

【 0 2 5 1 】

一連のビオチン化ペプチドを用いた ( 図 8 A )。レーン 1 は、ビオチン化されていないコントロールであり、レーン 2 は、ビオチン - G E I K Y D F L Y E K E H I C C L E E W T S ( 配列番号 1 0 ; Q R F P R の細胞外ドメイン 3 ) であり、レーン 3 は、ビオチン - G I E Y S N F E K E Y D D V T I K ( 配列番号 1 7 4 ; Q R F P R の細胞外ドメイン 4 ) であり、レーン 4 は、ビオチン - G A L F W E Q H D L V Y G D W T S ( 配列番号 1 9 ; C L P T M 1 の細胞外ドメイン由来のペプチド) であり、レーン 5 は、無関係なタンパク質由来のビオチン - ペプチド ( C t r l ) である。2 つのペプチドが、他のペプチドよりも首尾良く G D F 1 5 を沈降させた ( 図 8 A のレーン 2 および 4 )。

【 0 2 5 2 】

また、ペプチドを組み合わせて用いた。レーン 1 ~ 5 と総量が同じであり、レーン 1 ~ 5 と比較して、各ペプチドが 5 0 % となるように、1 : 1 の比でペプチドを混合した。レーン 6 は、Q R F P R の E C ドメイン 3 および E C ドメイン 4 であり、レーン 7 は、Q R F P R の E C ドメイン 4 および C L P T M 1 の E C ドメイン由来のペプチドであり、レーン 8 は、Q R F P R の E C ドメイン 3 および C L P T M 1 の E C ドメイン由来のペプチドであり、レーン 9 は、分子量マーカーであり、レーン 1 0 は、G D F 1 5 ( ポジティブコントロール ) である。

【 0 2 5 3 】

R A B 1 1 - Q R F P R エンドソームおよびプルダウンを用いた発明者らの以前の実験では、細胞外ループ 4 も、G D F 1 5 と相互作用して沈殿可能であることが示唆されていた。したがって、Q R F P R の細胞外ループ 3 およびループ 4 の両方が、G D F 1 5 と接触する可能性がある。

【 0 2 5 4 】

< Q R F P R および C L P T M 1 の G S T - 融合断片の作成 >

発明者らは、以前に、Q R F P R および C L P T M 1 由来のビオチン化ペプチドを用いることによって、C L P T M 1 に由来するモチーフに、G D F 1 5 がより保持されることを観察した。

【 0 2 5 5 】

次に、発明者らは、細胞外ドメイン 3、4 ( Q R F P R ) または C L P T M 1 のいずれかに由来するモチーフに相当する合成ハイブリッド化オリゴヌクレオチドを用いて、Q R F P R および C L P T M 1 由来の G D F 1 5 結合モチーフを形成した。p G E X 4 T 1 骨格にオリゴヌクレオチドを挿入し、B L 2 1 D E 3 p L y s 細菌株にて発現させ、精製した。正確な配列を、サンガー ( Sanger ) の配列決定法で確認した。

【 0 2 5 6 】

次に、発明者らは、精製した G S T - 融合タンパク質を、同量の G D F 1 5 とインキュベートし、検体を、高塩濃度の緩衝液で十分に洗浄した。

【 0 2 5 7 】

ビオチン化ペプチドを用いた以前の結果と同様に、発明者らは、G D F 1 5 と、C L P T M 1 由来のモチーフとの間に、より強力な親和性があることを観察した。

【 0 2 5 8 】

要するに、選択された受容体断片を合成オリゴマー ( ウルトラマー ( ultramer )、I D

10

20

30

40

50

Tテクノロジー社 (IDT technologies) を用いて構築し、フランキング末端を制限酵素で切断し、pGEX4T-1ベクター (ファルマシア・バイオテック社 (Pharmacia Biotech)) に挿入した。コンストラクトを、ライブラリ・エフィシェンシー細菌株 (library efficiency bacteria) DH5 (インビトロジェン社 (Invitrogen)) でクローン化した。2%アガロースゲルを用いた分析的制限酵素切断によって、正常なクローンを同定し、ウプサラ配列解析センター (Uppsala sequencing centre) において、サンガーの配列決定法によって確認した。

#### 【0259】

確認したクローンを用いて、BL21 pLys細菌株を形質転換した。単一クローンを、100 µg/mLのアンプシリンを添加したLB培地20 mLで一晩培養し、次の日に、100 mLに増やしてから、0.1 mMのIPTGによる誘導を3時間行った。細菌細胞を遠心分離によって沈殿させ、トリトン (Triton) X-100 (1%) を含むPBS中で超音波破碎を行った。溶解産物を遠心分離によって清澄化し、上清を、グルタチオンビーズ (ファルマシア社 (Pharmacia)) と共に一晩インキュベートした。

#### 【0260】

<GDF15のGSTプルダウン>

等量のGST-融合タンパク質を、4 で4時間、等量のGDF15と共に、500 µLのPBST中で転倒混和しながらインキュベートし、グルタチオンセファロース4Bビーズ (GEヘルスケア社 (GE healthcare)) を用いて捕捉した後、3つの異なる洗浄液 (PBST、200 mMのNaClを添加したPBST、および細胞溶解緩衝液 (0.5%デオキシコール酸塩、NP-40)) を用いて十分に洗浄した。洗浄時、チューブ壁への非特異的な結合が残らないようにするために、ビーズを新しいエッペンドルフチューブに移してから、SDS中で煮沸した。

#### 【0261】

<PBS中での最終洗浄>

DDTを添加したSDSローディング用染色液中で5分間煮沸することによって、材料を変性させた後、12%のアクリルアミドゲルを用いて泳動し (120 V、70分間)、ECLおよびCCDカメラ (パイオラッド社) を用いて解析した。

#### 【0262】

レーン3は、GST-EIKYDFLYEKEHICCLEEWTSS (配列番号7に示すGST融合体; QRFPRのECDメイン3) であり、レーン4は、GST-ALFWEQHDLVYGDWTS (配列番号18; CLPTM1のECDメイン由来のペプチド) である。レーン7はGSTコントロール (融合なし) である。QRFPRの細胞外ドメイン3およびCLPTM1の細胞外ドメインの一部に相当するペプチドでは、結合の増加が観察された (図8B、レーン3および4)。

#### 【0263】

(実施例6 - GDF15 - QRFPR相互作用の阻害)

<ペプチドによるMCF7細胞およびU2OS細胞における内在化の阻害>

発明者らは、様々な薬剤によってGDF15の活性を阻害できるかを確認する方法として、本アッセイを選択し用いた。QRFPRの細胞外ループ3由来の受容体断片によって、GDF15がRAB11-QRFPR二重陽性エンドソームを誘導する能力が実質的に低減された (図9参照)。対照的に、関係のないタンパク質由来のコントロール断片は、RAB11-QRFPR二重陽性エンドソームの増加を阻害することはない。GDF15が誘導するRAB11/QRFPRエンドソームの形成は、QRFPRペプチドによって阻害される (図9A~9D)。等量のGDF15のマスターミックスを分取し、様々な受容体断片と共にPBS中でプレインキュベートした後、細胞に添加した。順次、細胞を、PBS、GDF15混合液、またはGDF15/QRFPR由来ペプチド混合液のいずれかで処理した。U2OS細胞において、細胞表面のQRFPRレベルがGDF15によって低下したが、QRFPRペプチドによって、正常レベルに回復した (図9E)。

#### 【0264】

<ペプチドによって内在化は阻害されるが、P518には影響を及ぼさない>

図10A~10Cによって、GDF15が細胞表面のQRFPRレベルを低下させること、およびこの低下は、QRFPRの細胞外ループ3(細胞外ドメイン4)に由来するペプチドによって回復され得ることが確認される。

【0265】

QRFPRのアゴニストであるp518の効果を測定した。端的に言うと、p518/QRFPR-26を、カリフォルニア州のフェニックス・ペプチド社(Phoenix Peptides)から購入し、製造業者の説明書にしたがって処理した。細胞を血清飢餓状態としてから、P518で一晩刺激した。

【0266】

P518を、PBSまたはPBSに溶解したQRFPR受容体断片のいずれかと混合してから、細胞を刺激した。

【0267】

発明者らは、ACTRIIBレベルを上昇させるのは、p518のみで十分なこと、また、興味深いことに、QRFPR断片が存在していても、P518が誘導したACTRIIBレベルは低下しなかったことを実証した。それどころか、発明者らは、p518のみで処理した場合と比較して、p518およびQRFPR受容体断片の両方で細胞を処理した場合に、ACTRIIBがわずかに増加したことを見出した(図10D~10Fを参照)。

【0268】

このように、発明者らは、QRFPR受容体断片は、QRFPRのアゴニストであるP518を阻害しないことを観察したが、QRFPRレベルに関する別のアッセイにおいて実証された、QRFPRレベルに対するGDF15の効果を低減する能力を有している(図10A~10C)。

【0269】

したがって、これらの2つのアッセイを用いることによって、GDF15を阻害するアゴニスト(p518)は阻害しない選択的阻害剤(例えば、本明細書で用いるQRFPR断片、またはp518に干渉しないエピトープに作用するQRFPR抗体など)を発見、開発することが可能になる。

【0270】

<rab4エンドソームを防止する抗体>

端的に言うと、細胞を一晩血清飢餓状態とした後、QRFPRの細胞外部分に対するブロッキング抗体と共に2時間ブレインキュベートしてから、GDF15(1µg/mL)で30分間処理した。形成されたRCA産物を、PLAシステムにおいてデュオリックを用いて可視化することによって、形成されたRAB4-QRFPR複合体のレベルを測定した(図11参照)。ブロッキング抗体によって、RAB4-QRFPRエンドソームの形成が阻害されることが見出された。用いたブロッキング抗体は、ペップスターアレイ(Pep-star array)上において、QRFPRのGDF15結合部位と重なることが実証された。

【0271】

このアッセイは、QRFPRに対する抗体が、GDF15が媒介するエンドソームの形成を阻害できることを証明するのに有用であった。

【0272】

考え得るGDF15に対するII型受容体であるかどうかの可能性を確認するために、まず、ACTRIIBを選択した。これは、GDF15が、ACTRIIBと相互作用するGDF8と密接に関わっているという事実に基づくものであった。GDF15が、エンドソームが媒介する(例えば、RAB4エンドソームおよびRAB11エンドソームが介する)内在化およびQRFPRによるエキソソームの放出という少なくとも2つの機構によって、QRFPRとACTRIIBとが相互作用する程度(近接する事象が起こる回数の減少として同定される)を低下させることが見出された。

10

20

30

40

50

## 【0273】

驚くべきことに、Q R F P Rに対する2つの公知のアゴニスト（p 5 1 8 / 2 6 R F a ( 2 6 m e r ) およびQ R F P ( 4 3 m e r ) が、互いに逆の方法で、A C T R I I B レベルを調節することが見出された。このことによって、作動性リガンドの結合は阻害しない、Q R F P RのG D F 1 5 結合部位に対する選択的阻害剤の開発を可能にするのに有用な、新規のアッセイが提供され得ることが明らかになった。

## 【0274】

好ましくは、このような結合剤（抗体など）は、G D F 1 5 結合部位と重なるエピトープに直接結合することによって、G D F 1 5 がQ R F P Rに接近することを阻害してもよいし、隣接するエピトープに結合することによって、例えば立体阻害により、結合を阻害し、ひいてはG D F 1 5 がQ R F P Rに接近することを間接的に阻害してもよい。

10

## 【0275】

好ましくは、このような結合剤は、内因性リガンドに結合することによって媒介される受容体の作動性機能に干渉しない。したがって、本明細書において提供されるこのA C T R I I B アッセイによって、このような結合剤がリガンドの作動性結合に干渉するかどうかを決定することが可能になる。

## 【0276】

発明者らは、本アッセイを用いて、G D F 1 5 を阻害するのに用いたペプチドが、Q R F P Rに干渉しないことを決定することができた。したがって、A C T R I I B アッセイおよびR A B 1 1 - Q R F P R エンドソームアッセイを用いることによって、Q R F P R のアゴニストおよびアンタゴニストの機能を調節する選択的な手段を見出すことができる。

20

## 【0277】

（実施例7 - ペプチドスクリーニング）

Q R F P Rの第3の細胞外ドメイン（細胞外ループ2）に存在する重要なアミノ酸および最小限のエピトープを決定するために、発明者らは、ペプスタアレイを設計し、J P T ペプチド社（JPT peptides）から購入した。端的に言うと、アレイは、Q R F P Rの細胞外ループ2の全範囲を、1 5 m e r ずつ分割して含んでいた。この長さ（1 5 m e r）のペプチドは、合成効率や、F M O C 化学による純度および収率などの要因に基づいて、製造者によって推奨される長さに基づき、選択された。1 5 m e r は、アミノ酸ウォーク、あるいは1アラニンスキャンまたは2アラニンスキャンのいずれかにしたがって変化させた。各セットにつき、3回ずつ解析を行った。G D F 1 5 をP B S - T（0 . 0 5 % T w e e n - 2 0）で希釈し、オービタルシェーカー上で緩やかに振盪させながら、4で一晩インキュベートした。E L M I 社（ELMI）のスカイライン（Sky line）オービタルシェーカーD O S - 1 0 L 上で振盪させながら、洗浄を行った。

30

## 【0278】

先だってG D F 1 5 をインキュベートしたウェル、およびG D F 1 5 を除いた（P B S - Tのみの）隣のコントロールウェルに、G D F 1 5 に対する一次抗体を添加し、オービタルシェーカー上で振盪させながら、室温で1時間インキュベートした。洗浄を繰り返した後、蛍光色素分子を結合した二次抗体を添加し、最終洗浄後に、アジレント・テクノロジー社のG 2 5 0 2 マイクロアレイスキャナーを用いて、アレイを解析した。技術対照およびコントロールウェル（G D F 1 5 を含まない）の蛍光値を差し引き、3回の測定で得られた値をエクセル（Excel）およびプリズム（Prism）で解析した。

40

## 【0279】

本実験によって、発明者らは、G D F 1 5 とQ R F P Rとの相互作用に重要な、最小限の重要アミノ酸セットを決定することができた。アミノ酸ウォーク、およびアラニンスキャンによって、一続きの区間F L Y E K E H I C（配列番号11）が、G D F 1 5 の結合に必須であることが明らかになった（図12）。本出願において挙げたように、さらなる区間によっても、G D F 1 5 の保持が可能である。

## 【0280】

興味深いことに、Q R F P RなどのG P Rは、細胞外ループ2（E C L 2）においてシ

50

ステイン残基が保存されており、これは、細胞外ループ1のシステインとジスルフィド架橋を形成している。

【0281】

アゴニストリガンドおよびアンタゴニストリガンドの結合によって、ECL2において、保存されているジスルフィド結合周囲に、種々の蓋のような構造の形成が誘導される。これらは、受容体において異なる機能状態を生じることが示唆されている。発明者らは、自身の実験において、GDF15がこの部位に正確に作用して、素晴らしい調節機構を形成する能力を有することを実証した。その部位に正確に作用することによって、GDF15は、QRFPRの食欲増進機能に拮抗し、これによって、NPYおよびPOMCなどの重要な代謝調節ホルモンのレベルを調節する。発明者らは、これが、多くのがんにおいて、他のヒトの障害においても、高レベルのGDF15によって誘導される、悪液質および骨代謝の乱れを理解するための、計り知れないほど重要な機構である（また、FLYEKEHICC（配列番号78）が主要な結合部位である）ことを提案するものである。したがって、発明者らは、QRFPRのECL2（ECD3）、またはそこに隣接する部位に結合し、立体阻害によって、GDF15のQRFPRに対する結合能を阻害する抗体などの薬剤が、GDF15が増加する障害に対する潜在的な治療薬となることを提案する。

10

【0282】

（実施例8 - エピトープマッピング）

細胞培養実験で用いた抗体のエピトープを決定するために、発明者らは、並行するウェルを、様々な受容体結合抗体で処理した。抗体を室温で1時間インキュベートした以外は、図14のGDF15解析に関する実験および解析を行うことによって、発明者らは、GDF15が用いるエピトープに重なる抗体を同定することができた（図13）。アミノ酸ウォークによって、QQLEIK（配列番号335）、特にKがN-15ヤギ抗体の結合に必要であることが実証された。アラニンスキャンによって明らかになったように、N-15抗体は、さらに、FLYEK（配列番号210）を必要とした（赤色で示す）。したがって、抗体は、リガンドが占める部位に、部分的に重なる。

20

【0283】

【表2】

表2 アレイスクリーニング用ペプチドの配列

30

ポリペプチド配列	配列番号
QQLEIKYDFLYEKEH	176
QLEIKYDFLYEKEHI	39
LEIKYDFLYEKEHIC	40
EIKYDFLYEKEHICC	41
IKYDFLYEKEHICCL	42
KYDFLYEKEHICCLE	43
YDFLYEKEHICCLEE	44
DFLYEKEHICCLEEW	45
FLYEKEHICCLEEWT	73
LYEKEHICCLEEWTS	324
YEKEHICCLEEWTSP	325
EKEHICCLEEWTSPV	326
KEHICCLEEWTSPVH	327
EHICCLEEWTSPVHQ	328
HICCLEEWTSPVHQK	329

40

【0284】

（実施例9 - GDF15 - CLPTM1）

50

文献において、GDF15は、ALK5 (TGFBRI) キナーゼドメインが媒介する標準 (SMAD) 経路、および、GSK3bのリン酸化などの、非標準的なTGF 受容体シグナル伝達の両方に類似する、下流のシグナル伝達を媒介することが報告されている。CLPTM1がこれに関わっているかを確認するために、発明者らは、一連のインサイチュPLAを行って、CLPTM1と、TGF 受容体、およびTGF 受容体の下流の要素との間の動態を決定した。NK-92細胞を、GDF15で40分間処理し、SMAD2などの核内のリン酸化SMADタンパク質を検出した。発明者らが、GDF15による刺激を行った場合、NK-92細胞において、C末端がリン酸化されたSMAD2は検出されなかった。TGFB1による刺激を用いた以前の実験から、発明者らは、本アッセイ (pSMAD2) が実用的であったことがわかっている。

10

## 【0285】

驚くべきことに、発明者らは、図14で実証されたように、GDF15による刺激を行った場合、CLPTM1とTGFBRI (ALK5) とが近接することが誘導されることを見出した。

## 【0286】

TGFBRIが、対応するII型受容体であるTGFBRIIとは独立して、CLPTM1と共に局在しているかどうか、または、TGFBRI - TGFBRIIのヘテロ複合体が、GDF15による刺激を行った際に、CLPTM1と会合するかどうかは、不明であった。このことを決定するために、別の種由来のCLPTM1抗体と共にTGFBRIIに対する抗体を用いる、第2のインサイチュPLAアッセイを開発した。そして、発明者らは、GDF15処理によって、CLPTM1がTGFBRIIに近接することも誘導されることを発見した (図15)。

20

## 【0287】

ヘテロ四量体であるTGFBRI - TGFBRII複合体の化学量論および動態に関する、文献における現在の仮説は、細胞表面において、1) リガンドによる刺激 (TGFBRI) など) を行った際に生じる、受容体TGFBRIが2つと受容体TGFBRIIが2つとからなる会合体、または2) 以前から (すなわち、リガンドが結合する前から) 存在するヘテロ四量体複合体という、二つの異なる形態を提案している。

## 【0288】

文献における現在の仮説は、異なる好ましい下流のシグナル伝達経路を提案しており、前者 (リガンドが誘導するヘテロ四量体) は、標準 (SMAD) 経路をより支持するものであり、後者 (リガンドが提示されて、以前から存在するヘテロ四量体に結合する) は、非SMAD基質のリン酸化などの、非標準経路を支持するものである。

30

## 【0289】

SMAD2がリン酸化されていないこと、ならびに、文献における、GDF15によって開始される非標準的な下流のシグナル伝達についての報告、および発明者らによる、受容体のどちらもが、GDF15による刺激を行った際にCLPTM1と会合するという発見に基づいて、発明者らは、CLPTM1が、以前から存在するTGFBRI - TGFBRIIのヘテロ四量体複合体にGDF15を提示するのに関わるという仮説を立てた。

## 【0290】

この理論を確認するために、CLPTM1結合剤を用いて、CLPTM1に結合するGDF15の効果をj確認するアッセイを開発した (実施例10を参照)。

40

## 【0291】

(実施例10 - GDF15 - CLPTM1の阻害)

GDF15が誘導する、TGFβヘテロ四量体複合体を介した下流のシグナル伝達の阻害に及ぼす、CLPTM1に結合する抗体の効果を、インサイチュPLAアッセイにおいて、リン酸化されたGSK3b-pGSK3b (9/21) を検出することによって評価した。GSK3bのリン酸化によって、免疫抑制効果、すなわち、免疫細胞機能の抑制が生じることが知られている。

## 【0292】

50

CLPTM1がGDF15と関わることを立証するために、また、抗体などの阻害剤によって、GDF15が誘導する下流のシグナル伝達を低減できることを初めて実証するために、発明者らは、コントロール抗体およびCLPTM1抗体の存在下において、NK-92細胞をGDF15で処理した(図16参照)。発明者らは、コントロール抗体の存在下において、GDF15が、GSK3bの9/21リン酸化を誘導する(文献の通り)ことを実証した。しかしながら、CLPTM1結合抗体によって、GDF15が誘導するGSK3bのリン酸化が低減された。理論に拘束されることを望むものではないが、このことは、CLPTM1に結合する抗体によって、GSK3bのリン酸化を介したGDF15の免疫抑制の役割を阻害できることを示唆するものである。

【0293】

(実施例11 - ペプチドスクリーニング)

発明者らは、QRFP Rに関して実施例7で説明したのと同様に、CLPTM1の細胞外ドメインに由来するペプチドを用いて、CLPTM1へのGDF15の結合を確認した。2つの受容体間のBLAST相同性から、発明者らは、CLPTM1の細胞外ドメインにおいて、QRFP Rの細胞外ループ2の相当するアミノ酸配列(YISEHEH(配列番号15)およびLFWEQH(配列番号16))を有する、2つの潜在的な部位を同定した。

【0294】

CLPTM1のエピトープは、潜在的に、アレイで用いた15merのペプチドよりも大きい区間を含み得、より長く親和性が高いペプチド区間(四量体および二量体)を用いた(実施例5を参照)ピオチン-ペプチド実験およびGST-融合体実験の両方によって、直鎖15merよりも良好なGDF15の結合が提供される。

【0295】

アレイ実験(図17)から、CLPTM1由来ペプチドのいくつかは、GDF15に結合するものであり、本出願において列挙している。

【0296】

【表3】

表3 CLPTM1スクリーニング用ペプチド

ポリペプチド	配列番号
I SEHEHFTDFNATSA	330
SEHEHFTDFNATSAL	320
EHEHFTDFNATSALF	331
HEHFTDFNATSALFW	332
EHFTDFNATSALFWE	333
HFTDFNATSALFWEQ	334
FTDFNATSALFWEQH	149
TDFNATSALFWEQHD	135
DFNATSALFWEQHDL	171
FNATSALFWEQHDLV	170
NATSALFWEQHDLVY	169
ATSALFWEQHDLVYG	168
TSALFWEQHDLVYGD	167
SALFWEQHDLVYGDW	166
ALFWEQHDLVYGDWT	142

【0297】

比較的短いペプチド、特に、本明細書で同定された結合モチーフを同定することは、GDF15と受容体との相互作用を阻害するのに用いられ得る、治療用製品の出発点となる。特定の実施形態に限定することを望むものではないが、潜在的GDF15デコイペプチドは、環状ペプチドまたはFc融合体として、治療用に提供されるであろう。

10

20

30

40

50

## 【0298】

(実施例12 - エピトープマッピング)

発明者らは、本研究で用いるCLPTM1に対する抗体が、実施例8で説明したように、GDF15結合部位と重なるエピトープを認識することを見出した(図18参照)。

## 【0299】

## 【表4】

表4 CLPTM1抗体エピトープマッピング

ポリペプチド	配列番号
Y I S E H E H F T D F N A T S	1 0 2
I S E H E H F T D F N A T S A	3 3 0
S E H E H F T D F N A T S A L	3 2 0
E H E H F T D F N A T S A L F	3 3 1
H E H F T D F N A T S A L F W	3 3 2
E H F T D F N A T S A L F W E	3 3 3
H F T D F N A T S A L F W E Q	3 3 4
F T D F N A T S A L F W E Q H	1 4 9
T D F N A T S A L F W E Q H D	1 3 5
D F N A T S A L F W E Q H D L	1 7 1
F N A T S A L F W E Q H D L V	1 7 0
N A T S A L F W E Q H D L V Y	1 6 9
A T S A L F W E Q H D L V Y G	1 6 8
T S A L F W E Q H D L V Y G D	1 6 7
S A L F W E Q H D L V Y G D W	1 6 6
A L F W E Q H D L V Y G D W T	1 4 2
L F W E Q H D L V Y G D W T S	1 2 5

10

20

## 【0300】

発明者らは、CLPTM1のGDF15結合部位の外側に結合する抗体も、立体障害によって、CLPTM1に結合するGDF15を阻害し得、したがって、CLPTM1の結合と関連している、GDF15が媒介するTGF $\beta$ 受容体複合体とのクロストークを阻害することが望ましい、免疫腫瘍学などの用途にも有用な場合があることを提案するものである。これによって、GDF15の免疫抑制効果が阻害される。

30

## 【0301】

(実施例13 - 免疫細胞におけるCLPTM1の発現)

CLPTM1がヒトの免疫細胞において発現される程度を確認するために、発明者らは、健常なドナーのPBMC由来の様々な免疫細胞種をFACSを用いて分類し、CD4+Tリンパ球、CD8+Tリンパ球、およびCD45+CD3+非Tリンパ球(図19)、ならびにCD11c+細胞(樹状細胞)およびCD14+細胞(単球/マクロファージ)(図20)におけるCLPTM1発現を検出した。

## 【0302】

CD4+Tリンパ球およびCD8+Tリンパ球においては、発明者らは、CLPTM1を高レベルに発現する細胞のサブセットを検出した。CD14陽性細胞においては、発明者らは、全体的に多量のCLPTM1を検出した(図20)。

40

## 【0303】

健常なドナーのPBMCの利用、および免疫細胞種の選別に用いたFACSにおけるゲーティング法は、ストックホルム、KSの臨床免疫ユニットを通じ、確立されたプロトコールに従って行われた。

## 【0304】

免疫系の細胞においてCLPTM1が発現される程度によって、免疫系の調節に対し広範囲に効果を及ぼし得ること、および広範囲の異なる免疫応答経路において免疫応答を制

50

御できる場合があることが示唆される。

【0305】

(実施例14 - GDF15によるNKG2Dの下方制御の阻害)

TGFb1およびGDF15などのTGFbスーパーファミリーのメンバーは、NKおよびT細胞などの、NKG2Dを発現する免疫細胞の細胞溶解機能を抑制することが報告されている。

【0306】

NKG2Dは、パーフォリンおよびグランザイムなどの重要なエフェクタータンパク質の上流に位置するものであり、TGFb1およびGDF15が、このような細胞溶解タンパク質レベルを抑制することが報告されている。

10

【0307】

CD8+Tリンパ球およびNK-92細胞などの免疫細胞におけるCLPTM1の発現、ならびにGDF15が誘導する、CLPTM1のTGFBRI-TGFBRIIへの近接(これを介してTGFb1がシグナル伝達を行う)に関する文献に基づいて、発明者らは、抗体によるCLPTM1の阻害が、GDF15によって延長刺激されたNK-92細胞において、免疫エフェクターであるNKG2Dのレベルに影響を及ぼし得るかどうかを確認した。図21Aは、GDF15で一晩刺激することによって、NK-92細胞において検出可能なNKG2Dのレベルが低下したことを示す。CLPTM1に結合できる結合剤(抗体)で前処理してからGDF15で刺激したNK-92細胞においては、NKG2Dの減少が回復した(図21B)。したがって、CLPTM1抗体は、NK-92細胞におけるNKG2Dレベルを上昇させることができる。発明者らは、このことによって、細胞毒性が上昇するということを提案する。

20

【0308】

(実施例15 - がんの兆候)

<腫瘍微環境における免疫細胞中のCLPTM1-GDF15の検出>

発明者らは、USバイオマックス社(US Biomax)から購入した、市販の組織マイクロアレイを用いて、様々なヒトのがんにおいて、2つの受容体の存在を確認した。

【0309】

一連のヒトのがんのCLPTM1-GDF15のPLA相互作用に対して陽性である浸潤性細胞の存在の例が、肺扁平上皮細胞癌からの転移を示す図22に示されている。FITCでラベルされたCD3による対比染色によって、発明者らは、二重陽性細胞を検出することができた。しかしながら、発明者らは、CLPTM1-GDF15陰性のCD3+細胞も検出した。これは、恐らく、発明者らのFACSデータにおいて観察されたように、CLPTM1陰性の浸潤性細胞の集団を表している。

30

【0310】

さらに、発明者らは、CLPTM1-GDF15複合体を示すCD3-細胞も検出した。これは、CD14+細胞(単球など)などの他の免疫細胞を表していると考えられた。異なる浸潤性免疫細胞種を有する、腫瘍の転移などの組織の複雑さのために、CD14などの他のマーカーを用いたさらなる研究が必要となる。

【0311】

GDF15に富む腫瘍の微小環境において、GDF15に結合したCLPTM1も検出可能にする、腫瘍浸潤性CD3+細胞の存在が、GDF15のCLPTM1への接近を阻害する、潜在的なCLPTM1結合剤(抗体など)を示唆している。このような産生物が、GDF15が誘導する免疫抑制を低減させるのに役立つ場合がある。

40

【0312】

<骨癌におけるQRFPR-GDF15の検出>

QRFPRに関して、発明者らは、骨における前立腺癌微小転移巣の境界において、QRFPR-GDF15を検出した(図23、24A、および24Bを参照)。原発性前立腺癌においては、前立腺癌の骨への転移において検出された高レベルのシグナルと比較して、低レベルのシグナルが検出された(図24C参照)。

50

## 【0313】

前立腺からの骨への転移に対するバイオマーカーとしてGDF15を用いるので、このことは特に興味深い。さらに、QRFP Rは、骨芽細胞において発現されることが知られており、骨の代謝に関わっている。したがって、QRFP R結合剤(抗体など)またはGDF15のQRFP Rへの接近を阻害できるポリペプチドは、GDF15が誘導する、前立腺癌における骨芽細胞の代謝の異常調節を低減するのに役立つ場合がある。

## 【0314】

このような抗体は、特に、破骨細胞に作用するビスホスホネートなどの、現在の治療計画とは別に、骨代謝の異常調節の態様を治療するのに用いられる場合に、このような障害において特に臨床的価値を有するであろう。

10

## 【0315】

ユーイング肉腫(図25)および骨肉腫(図24D)などの原発性骨癌においても、QRFP Rの発現が見られた。後者における発現は、U2OS骨肉腫細胞におけるQRFP R染色の発明者らによる観察、およびU2OS細胞におけるQRFP RのGDF15による調節と一致する。したがって、QRFP R結合剤またはGDF15とQRFP Rとの相互作用を阻害するポリペプチドは、特に、破骨細胞に作用するビスホスホネートなどの、現在の治療計画とは別に、骨代謝の異常調節の態様を治療するのに用いられる場合に、このような障害において特に臨床的価値を有するであろう。

## 【0316】

最後に、QRFP R-GDF15複合体は、骨髄腫において検出され(図26)、このことは、このような治療薬の、考えられるさらなる兆候を表している。

20

## 【0317】

(実施例16-QRFP RペプチドおよびCLPTM1ペプチドがGDF15に及ぼすブルダウン作用)

20 $\mu$ gのFc融合タンパク質のコンストラクトを、0.5 $\mu$ gのGDF15およびプロテインGビーズと共に混合しながら、1%BSAを添加したPBST中、4で6時間インキュベートした。洗浄は6回行った。PBSTを用いて3回洗浄し、チューブを変更して、220mMのNaClを添加したPBSTを用いて2回洗浄した。最終の洗浄はPBSを用いて行った。洗浄と洗浄の間に、500gで5分間、卓上遠心分離装置を用いて、ビーズを回収した。検出については、材料を4~12%のグラジエントゲルにロードして、100ボルトで泳動し、ターボタンク(Turbo Tank)プロットシステムを用いてPVD膜に転写し、3%BSAを含むPBSを用いて室温で1時間、ブロックし、RDシステムモノクローナル抗GDF15抗体と共に一晩インキュベートした。マウスHRP二次抗体を1:2000に希釈したものを検出に用いた。バンドサイズは、隣のレーンで泳動したシーブルー2(seebblue2)タンパク質ラダーマーカーと比較することによって推定した。

30

## 【0318】

マウス由来の配列を含むFc融合タンパク質を、以下のように設計した。

## 【0319】

(GGGG S) $\times$ 3を柔軟なリンカーとして用いた(配列番号242)。

40

## 【0320】

AP5(QRFP Rペプチド)

FcマウスIgG1-GGGG SGGGG SGGGG SQRLEIKYDFLYEKEH(配列番号240)

AP1(コントロールタンパク質)

AAAEADGARS AVVAAGGGSSGQVTSNGS IGRDPPAETQPQNPPAQPAPNAGGGG SGGGG SGGGG S-FcマウスIgG1(配列番号323)

AP2(CLPTM1ペプチド)

FcマウスIgG1-GGGG SGGGG SGGGG SYISEHEHF TDFNAT

50

S A L F W E Q H D L V Y G D W T S ( 配列番号 2 4 1 )

A P 0

ネガティブコントロール

受容体由来の断片を、G D F 1 5 との直接的な相互作用を示すアレイデータを含む以前の結果に基づいて選択した。アレイにおいては、相互作用は、ペプチドモノマーとリガンドとの間のものである。厳しい洗浄条件を用いるプルダウン実験を行い、G D F 1 5 を、図 2 7 に示すように検出した。

【 0 3 2 1 】

考察：十分に洗浄した後、発明者らは、Q R F P R 由来のペプチドを含む A P 5 コンストラクトおよび C L P T M 1 由来のペプチドを含む A P 2 コンストラクトが、G D F 1 5 をプルダウンできることを見出した。

10

【 0 3 2 2 】

結論：発明者らは、G D F 1 5 が、両方の受容体に対する親和性を有すること、および、増加した G D F 1 5 が病理学的役割を有する障害において、両方のコンストラクトが、リガンドトラップとしての治療用途を想定することができることを示した。データはアレイの結果と一致し、ここで、例えば、A P 1 におけるポリペプチドは G D F 1 5 と相互作用しなかったが、A P 2 配列では相互作用した。

【 0 3 2 3 】

理論に拘束されることを望むものではないが、全長の C L P T M 1 受容体は、潜在的に、より高い親和性を提示し得る。

20

【 0 3 2 4 】

( 実施例 1 7 - G D F 1 5 を阻害する抗体およびペプチド )

免疫細胞に及ぼす G D F 1 5 の効果が立証され、C L P T M 1 を標的とする抗体、および C L P T M 1 の細胞外ドメインの一部を含む F c 融合コンストラクトによって、この効果を阻害することができることを見出された。

【 0 3 2 5 】

C D 1 4 + 細胞を単離し、G D F 1 5 の存在下または非存在下において、L P S による刺激培養で培養した。L P S に応答した T N F および I L 1 2 の分泌は、G D F 1 5 と共にインキュベートした細胞において減少したので、G D F 1 5 は免疫抑制効果を示した。図 2 8 において両方のサイトカインの分泌が増加したことによって示されるように、ウサギポリクローナル抗体 ( バイオス・アンチボディ社が供給する b s - 8 0 1 8 R ) によって、この免疫抑制効果が低減された。

30

【 0 3 2 6 】

G D F 1 5 の免疫抑制効果の同様の反転は、C L P T M 1 の細胞外ドメインに由来するポリペプチド ( 配列番号 1 7 ) によっても実証された。ポリペプチドは、N 末端リンカー配列を含む F c 融合体として提供され、図 2 9 において T N F および I L 1 2 の分泌が増加したことによって示されるように、そのサイトカインの両方に対して同様の効果を示した。リンカー配列を含むペプチドの配列を、配列番号 2 4 1 に示す。

【 0 3 2 7 】

図 3 0 に示すように、C L P T M 1 ポリペプチドを含む F c 融合タンパク質の存在下において、L P S で刺激された C D 1 4 + 細胞をインキュベートすることによって、炎症性タンパク質である I F N が分泌されることも示された。

40

【 0 3 2 8 】

< 材料および方法 >

< 末梢血単核細胞 ( P B M C ) の単離 >

バッフィコート細胞の懸濁液、またはヘパリンを添加した血液試料を、滅菌した室温の P B S で希釈した。末梢血試料を 1 : 1 で希釈し、バッフィコートは、最終体積が 1 2 0 m L となるように希釈する ( 標準的なバッフィコートにおいては、これによって、1 : 1 よりも希釈率がわずかに大きくなる )。希釈した細胞懸濁液を、フィコール・ペーク・プラス ( Ficoll Paque PLUS ) 上に積層した。1 回分のバッフィーに対して、4 x 1 5 m L

50

を分取して用いる（チューブ1本あたり、希釈した細胞懸濁液を30 mL）。細胞を、400 × gで30分間、室温で遠心分離し、新しい50 mLチューブに移した。細胞を一度洗浄し、20 mLのPBSに再懸濁した。

#### 【0329】

< CD14 + 細胞画分の磁気による分類 >

単核細胞の懸濁液を、遠心分離によって沈殿させた。細胞を、 $10^8$ 個/mLの濃度でステムセル（Stemcell）緩衝液に再懸濁し、丸底の14 mLチューブに移した。細胞1 mLあたり100 μLのイージーセップ・ポジティブ・セレクション・カクテル（EasySep Positive Selection cocktail）を添加し、穏やかにピペティングすることによって混合し、室温で15分間インキュベートした。細胞1 mLあたり50 μLのイージーセップ・マグネティック・ナノパーティクル（EasySep Magnetic Nanoparticles）を添加して混合し、室温で10分間インキュベートした。ステムセル推奨培地を添加して、細胞懸濁液の全体積を5 mLとし、穏やかにピペティングすることによって混合した。チューブ（キャップなし）を磁石内に置き、5分間放置した。5分後に、上清を捨てた。CD14 + ラベルされた細胞は、チューブ内に残る。チューブを磁石から取り出し、5 mLのステムセル推奨培地をさらに添加して、穏やかにピペティングすることによって混合した。チューブ（キャップなし）を磁石内に置き、5分間放置した。このステップを繰り返した後、細胞を、5 mLの完全RPMI培地に再懸濁した。CD14 + 細胞懸濁液から50 μLを取り、トリパンブルー溶液で希釈してファスト・リード（Fast Read）102計数スライドに載せ、計数を行い、全細胞数を決定した。

10

20

#### 【0330】

< 培養の手順および刺激 >

##### 0日目

完全RPMI培地中、 $0.833 \times 10^6$ 個/mLの濃度となるようにCD14 + 細胞懸濁液の体積を調整した。300 μLの細胞懸濁液を48穴プレートのウェルに加え（1ウェルあたり $0.25 \times 10^6$ 個）、37 °Cのインキュベータ内で90分間、接着させた。培地を穏やかにピペティングした後、上清を除去することによって、非接着細胞を除去した。あらかじめ温めておいた300 μLの完全RPMI培地で細胞を一度洗浄し、培地を吸引除去した。各ウェルに、あらかじめ温めておいた300 μLの完全RPMI培地を加え、37 °Cの細胞インキュベータ内で一晩（20 ~ 24時間）、細胞をインキュベートした。

30

##### 1日目

所望のGDF15調節物質の17Xの原液を、完全RPMIで希釈した（1ウェルあたり20 μLの物質をアッセイした）。20 μLの調節物質または培地/担体（ネガティブコントロール）を各ウェルに加え、穏やかにピペティングすることによって混合した。37 °Cの細胞インキュベータ内で30分間、細胞をインキュベートした。100 μg/mLの原液を完全RPMIで希釈して濃度を8.5 μg/mL（培養における終濃度は0.5 μg/mL）とすることによって、17XのGDF15溶液を調製した。20 μLの希釈したGDF15を各ウェルに加え、37 °Cの細胞インキュベータ内で一晩（18 ~ 20時間）、インキュベートした。

40

##### 2日目

LPS原液を完全RPMIで希釈して濃度を18 ng/mL（培養における終濃度は1 ng/mL）とすることによって、18XのLPS溶液を調製した。20 μLのLPSまたは培地（ネガティブコントロール）を各ウェルに加え、穏やかにピペティングすることによって混合した。37 °Cの細胞インキュベータ内で4時間、細胞をインキュベートした。各ウェルから、200 μLの上清をV底の96穴プレートに移した。試料を遠心分離し、細胞または破片を除去した。上清をプラスチック製の96穴PCRプレートに移した。すぐにTNF-αの解析を進めるか、またはウェルを接着性プラスチックカバーで覆い、さらなる解析を行うまで-80 °Cで保存した。

#### 【0331】

50

< プロシーク (Proseek) アッセイ >

細胞培養で分泌されたタンパク質を、多重化近接伸長アッセイである、オーリンク・プロテオミクス・AB社 (Olink Proteomics AB) (ウプサラ、スウェーデン) 製のプロシーク (Assarsson Eら Plos One 2014) を用いて定量化した。データは、正規化タンパク質発現 (Normalized Protein Expression) (NPX log2) として表される。オンコロジー v2 92-plex パネル (Oncology v2 92-plex panel) を実行した。重要な炎症誘発性マーカーである IL12、TNF、および IFN $\gamma$  のデータを提示する。

【0332】

(実施例18 - CLPTM1由来ペプチドに結合するGDF15)

< 材料および方法 >

CLPTM1由来のビオチン化合成ペプチドフラグメント (JPTペプチド、ドイツ) を、PBS中1 $\mu$ Mで、4で一晩、ストレプトアビジン96穴プレート (#15500、ピアス社 (Pierce)) に固定化した。プレートを、0.05%のTween-20を含むPBS (洗浄緩衝液) 300 $\mu$ Lを用いて4回洗浄した。PBS、1%BSAおよび0.05%Tween-20 (ブロッキング緩衝液) を用いて、室温で1.5時間、プレートをブロッキングし、洗浄緩衝液で4回洗浄した。GDF15リガンド (アブカム社) を、100ng/mLとなるようにブロッキング緩衝液に添加し、室温で2時間インキュベートした。その後、プレートを、2XのNaClを含む洗浄緩衝液300 $\mu$ Lを用いて、8回洗浄した。GDF15抗体 (RnDシステムヤギポリクローナル) を1 $\mu$ g/mLとなるように加え、室温で1時間、ブロック緩衝液中でインキュベートし、300 $\mu$ Lの洗浄緩衝液を用いて4回洗浄した。HAF017抗ヤギ-HRP抗体を加え、ブロッキング緩衝液中で1時間インキュベートし、洗浄した。TMB基質を加え、15分後にH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を止めた。OD450~620を、ELISAリーダーで測定した。

【0333】

配列番号250~273に示す配列を有するポリペプチドについて、GDF15への結合を評価した (図31において、左から右に示すポリペプチドに相当)。これらのタンパク質は、相当するCLPTM1由来の配列中に存在しない、C末端のグリシン残基を付加して合成された。各ポリペプチドについて測定されたシグナルを、図31に示す。ELISAの値において、約0.1OD以上のカットオフを、固定化したポリペプチドへのGDF15の結合を示すものとして同定した (すなわち、配列番号258に示す配列を有するポリペプチドに結合するGDF15の場合の、0.098OD値を含む)。以下のペプチドが、GDF15への結合を示した (残基の番号は、配列番号2に対してのものである)。

【0334】

GSIIYIHVYFTKSGFHPDPRQG (162~181) (配列番号258)  
 KALYRRLATVHMSRMINKYKG (182~201) (配列番号259)  
 ITINIVDDHTPWVKGSVPPPG (242~260) (配列番号262)  
 LDQYVKFDVSGDYYPPIIYFG (262~280) (配列番号263)  
 YPINESLASLPLRVSFCLSG (292~311) (配列番号269)  
 GDYYPPIIYFNDYWNLQKDYYG (273~292) (配列番号270)

【0335】

C末端のグリシン残基を欠く配列番号258、259、262、263、269、および270に相当するポリペプチドは、それぞれ297、298、301、302、308、および309である。このようなポリペプチドまたはその一部、すなわち、これらの配列を含む、またはその一部を含む、または密接に関わる配列を含む、ポリペプチドは、本発明に係る好ましいポリペプチドの一群を代表するものである。

【0336】

(実施例19 - CLPTM1における「バイオス社」pAbのエピトープマッピング)

< 材料および方法 >

10

20

30

40

50

## ペプチドアレイ

C L P T M 1 の N 末端アミノ酸 1 ~ 3 5 4 アミノ酸の全範囲を、J P T ペプチド・テクノロジー社 (JPT peptide Technologies GmbH) 製の、1 1 アミノ酸が重複する 8 6 個の独自の 1 5 m e r に分割した。バイオス (Bioss) 8 0 1 8 R ポリクローナル抗体を、1  $\mu$  g / m L で、4 で一晩インキュベートし、P B S T で十分に洗浄した後、P B S T 中、1 : 6 0 0 0 0 に希釈したアレクサ・フルオロ (Alexa flour) 6 4 7 (サーモ・サイエンティフィック社) ウサギ I g G (H + L) ポリクローナル二次抗体 (カタログ # : A - 2 1 2 4 4) と共に、室温で 1 時間インキュベートし、P B S T による洗浄を繰り返した後、G 2 5 0 2 マイクロアレイスキャナー (アジレント・テクノロジー社) を用いて検出を行った。用いたポリペプチドおよびその配列参照番号を図 3 2 に示す。

10

## 【0337】

バイオス B S 8 0 1 8 R のエピトープ 1 は、アレイにおいて、中央蛍光強度 (M F I) (シグナル強度) が最も高く、このことは、この部位に対する結合親和性が最も高いことを実証している。アレイにおける様々なペプチド (配列番号 2 7 4 ~ 2 7 9) への抗体の結合を、図 3 2 A に示す。

## 【0338】

最小の共通点は、P K D (配列番号 3 2 2) である。

## 【0339】

最も可能性のあるフランキングアミノ酸も、領域 G G A P R V A S R N L F P K D T L M N L H V Y I S E H (配列番号 3 1 3) に存在する。

20

## 【0340】

エピトープ 2 は、わずかに低い M F I を示したが、このことは、この抗体に対する親和性を有する第 2 の部位であることを示唆する。アレイにおける様々なペプチド (配列番号 2 8 0 ~ 2 8 6) への抗体の結合を、図 3 2 B に示す。発明者らは、この部位が、M I C 1 の結合部位に部分的に重なることを見出した。したがって、この結合パターンを有するバイオス抗体は、エピトープ 2 に結合する M I C 1 と直接競合することによって、またはエピトープ 1 への結合による立体阻害によって、M I C のアンタゴニストになり得る。エピトープ 2 の領域は、

30

L D Q Y V K F D A V S G D Y Y P I I Y F N D Y W N L Q K D Y Y P I N E (配列番号 3 1 4) 内に存在する。

## 【0341】

したがって、2 4 個の異なる C L P T M 1 由来ペプチドのパネルから得られた、M I C 1 に対する親和性が最も高い C L P T M 1 由来のポリペプチド (配列番号 2 7 0) は、このバイオス抗体のエピトープに重なっていると思われる。

## 【0342】

(実施例 2 0 - C L P T M 1 と Q R F P R との間で保存されていると考えられる配列)

実施例 7 で行ったアレイアッセイ (図 1 2 参照) およびプルダウンアッセイにおいて、G D F 1 5 に対する親和性を有することが見出された、Q R F P R の細胞外ドメインに由来する配列は、B L A S T によるアラインメントを行うと、C L P T M 1 の細胞外ドメインの一部と、ある程度の配列同一性を有することが見出された。

40

## 【0343】

## 【表 5】

スコア	期待値	方法	同一性	類似性	ギャップ	フレーム
16.5ビット (31)	1.5 <sup>(1)</sup>	合成マトリクスによる調整。	5/15 (33%)	9/15 (60%)	0/15 (0%)	

## 【0344】

特徴：

C L P T M 1 1 2 3 L F W E Q H D L V Y G D W T S 1 3 7 (配列番号 1 2 5)  
L + + + H + W T S

50

Q R F P R 1 9 3 L Y E K E H I C C L E E W T S 2 0 7 ( 配 列 番 号 3 2 4 )  
【 0 3 4 5 】

【 表 6 】

スコア	期待値	方法	同一性	類似性	ギャップ	フレーム
13.1ビット (22)	1.6()	組成に基づく統計。	4/25 (16%)	12/25 (48%)	0/25 (0%)	

【 0 3 4 6 】

特徴：

C L P T M 1 1 0 7 Y I S E H E H F T D F N A T S A L F W E Q 1 2 7 ( 配 列 番 号 9 6 )

++ E E H ++ ++

Q R F P R 1 9 2 F L Y E K E H I C C L E E W T S P V H Q K 2 1 2 ( 配 列 番 号 6 0 )

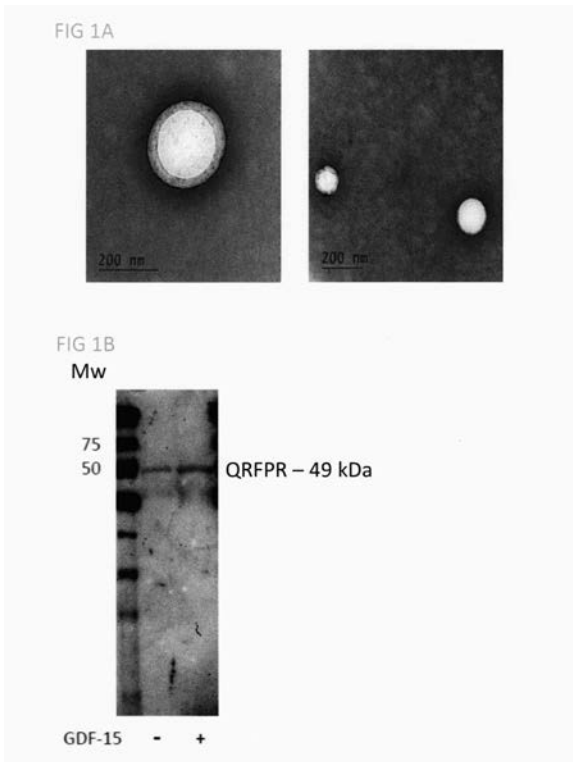
【 0 3 4 7 】

配列番号324に示す配列、もしくはこの配列に対する配列同一性が少なくとも75%である配列、もしくは少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む、配列番号324の一部である配列、を有する、または含む、ポリペプチドは、本発明に係るポリペプチドのさらなる例である。

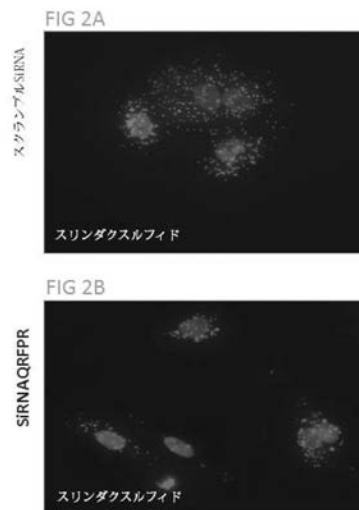
10

20

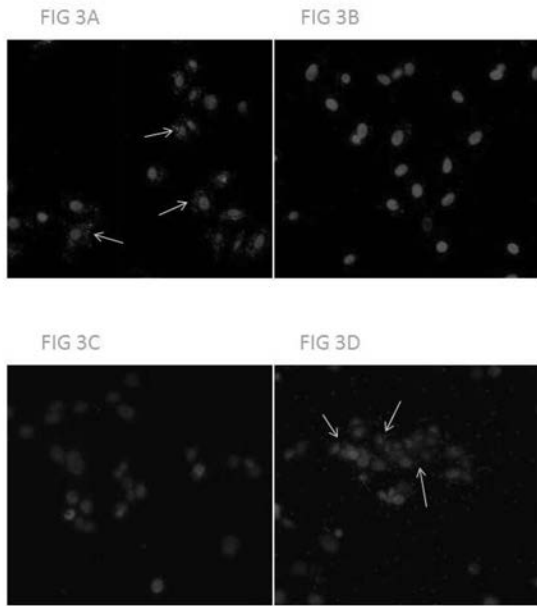
【 図 1 】



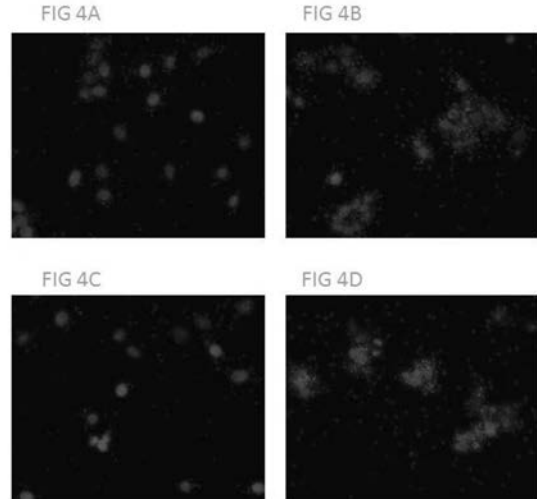
【 図 2 】



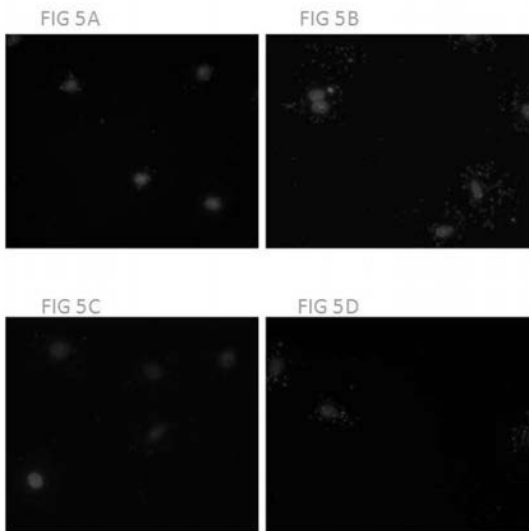
【 図 3 】



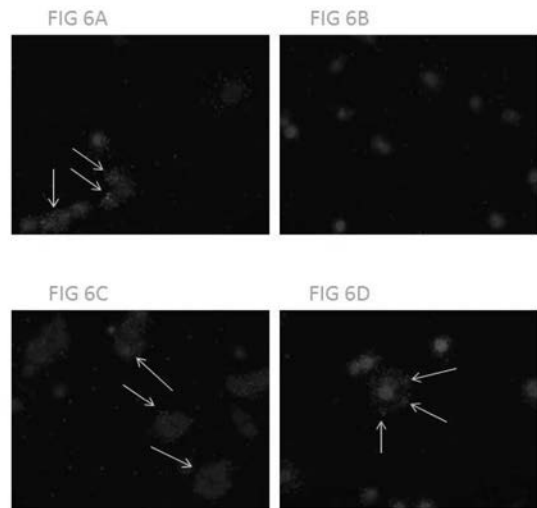
【 図 4 】



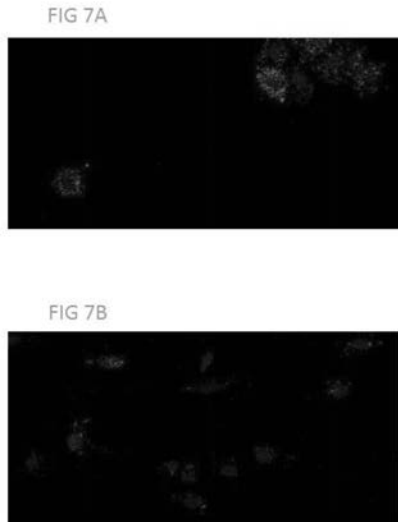
【 図 5 】



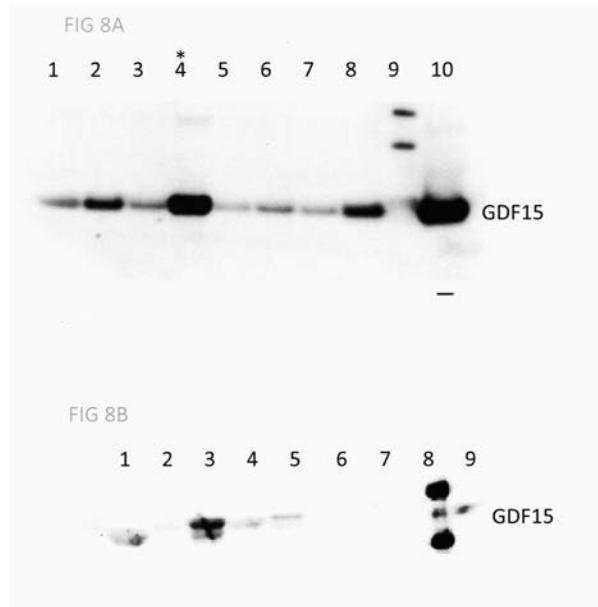
【 図 6 】



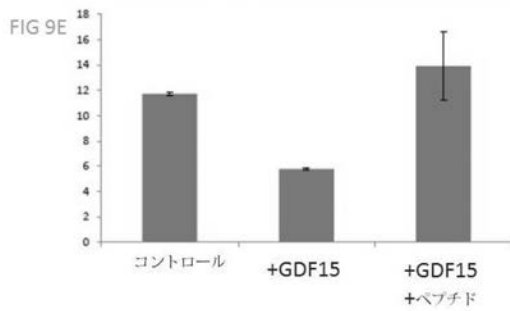
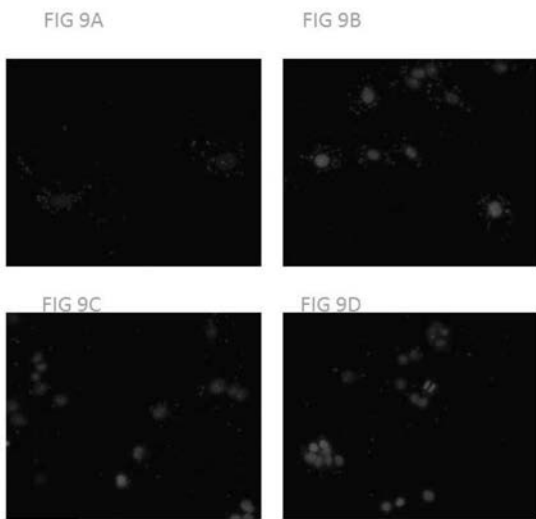
【 図 7 】



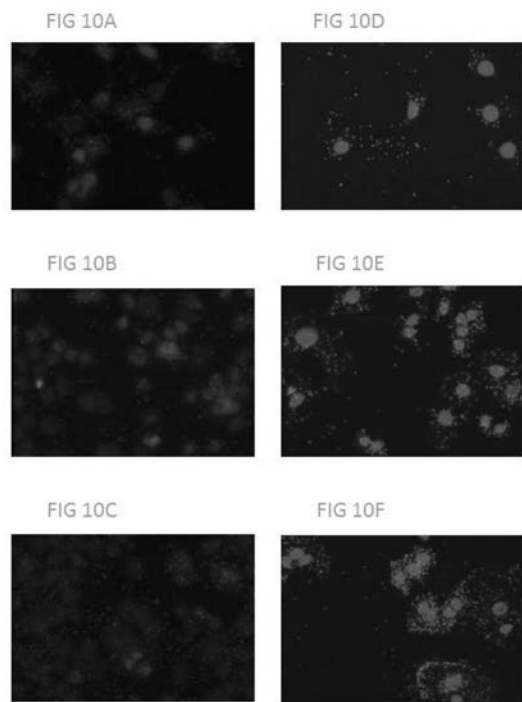
【 図 8 】



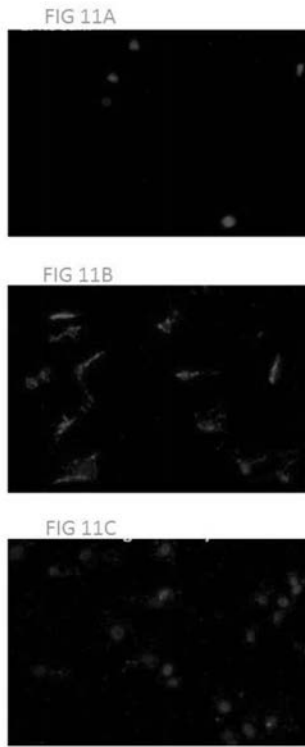
【 図 9 】



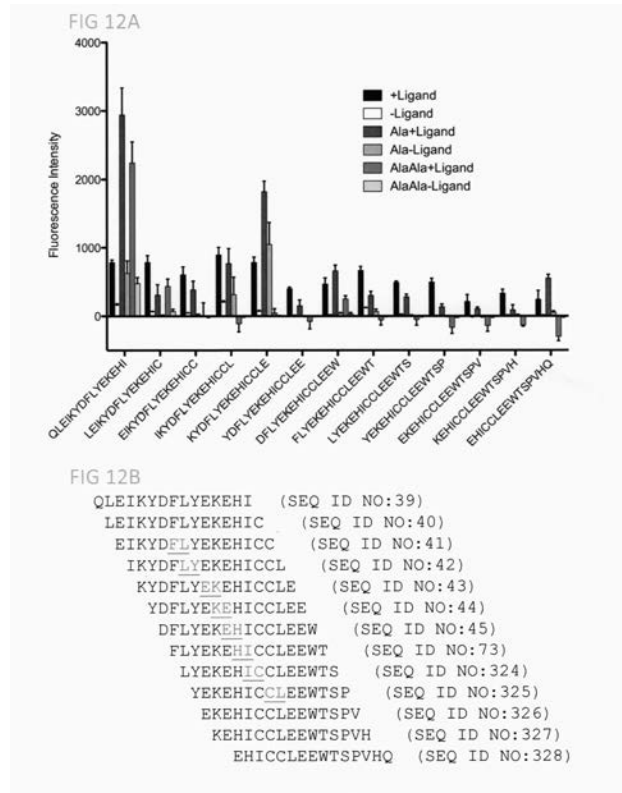
【 図 10 】



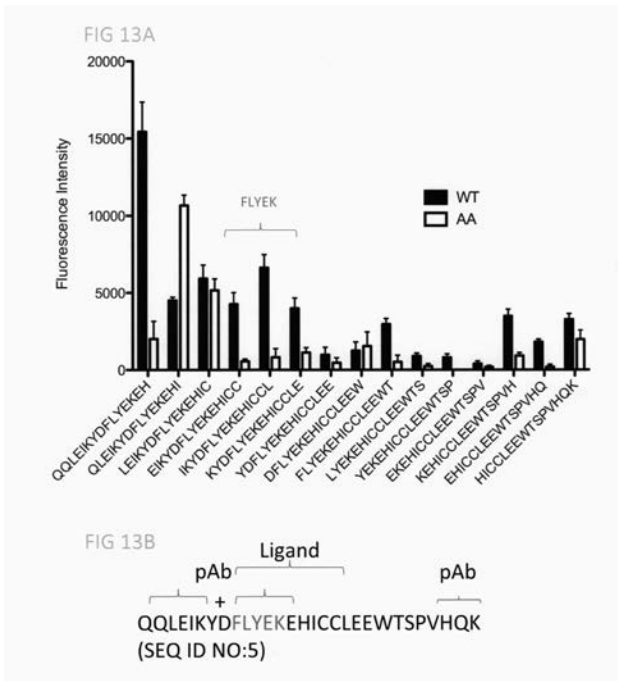
【 図 1 1 】



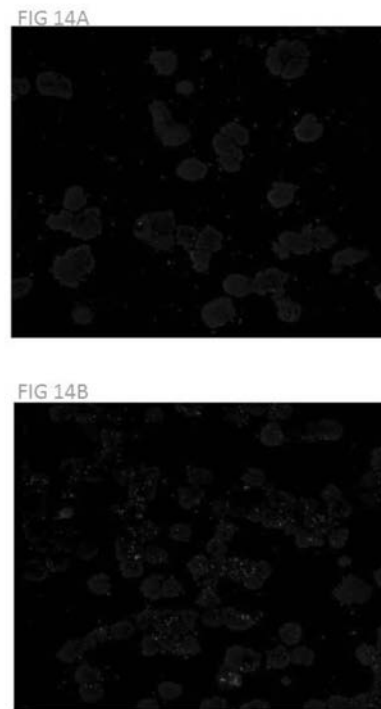
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



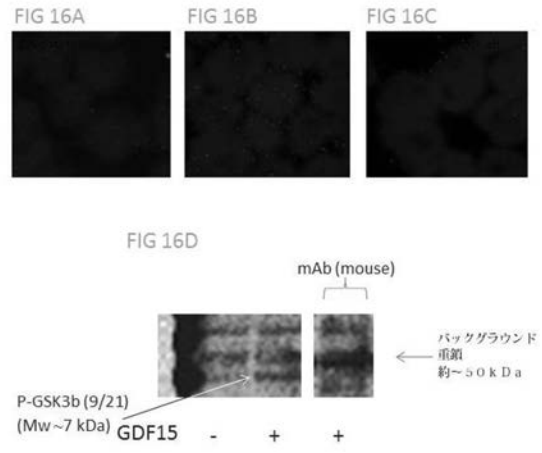
【 図 1 4 】



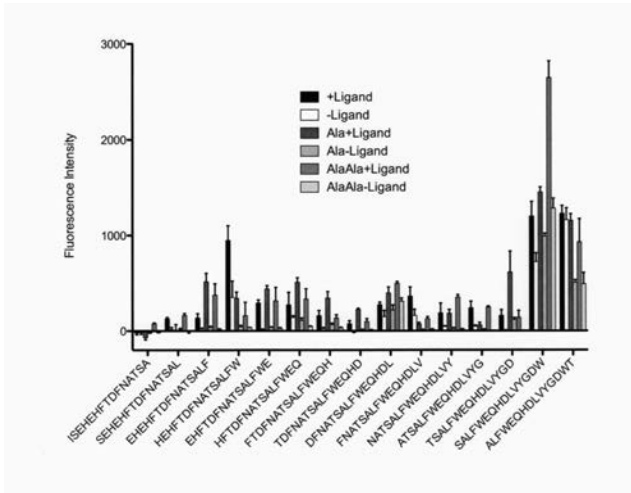
【 図 1 5 】



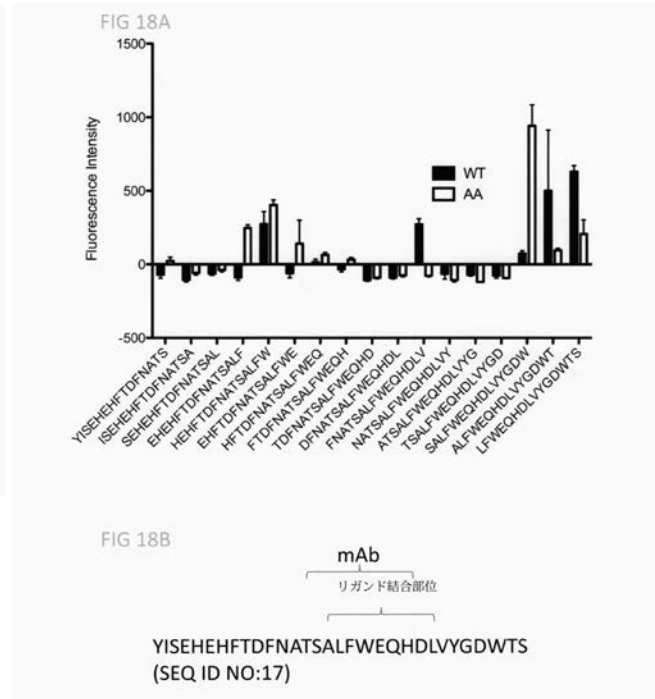
【 図 1 6 】



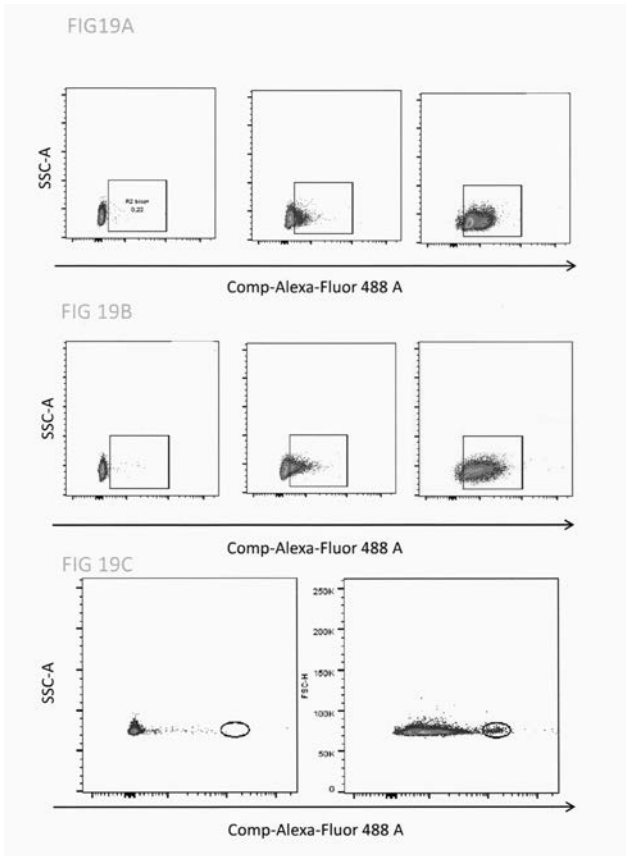
【 図 1 7 】



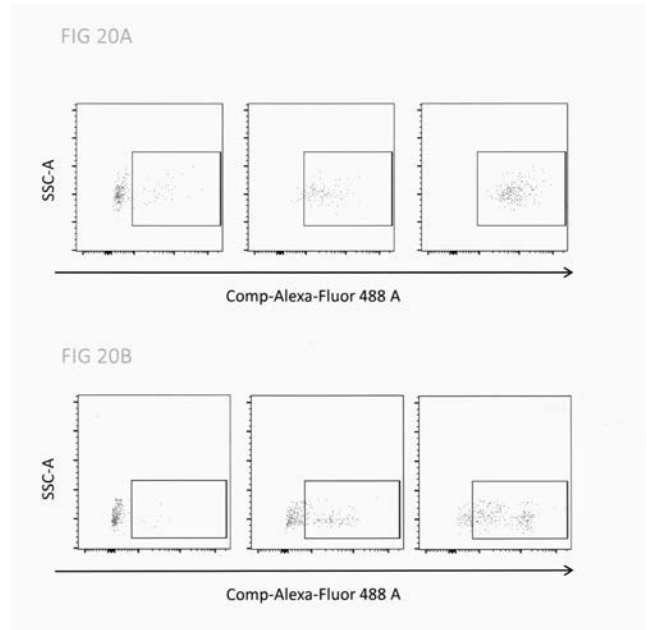
【 図 1 8 】



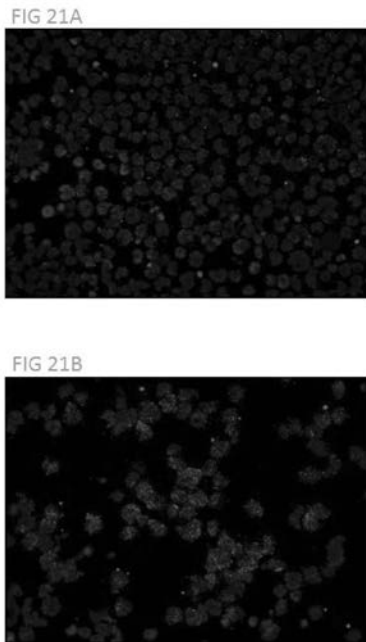
【 図 1 9 】



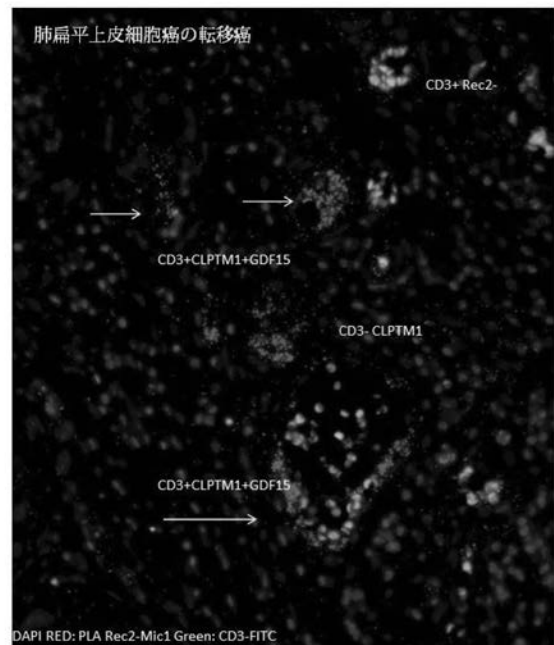
【 図 2 0 】



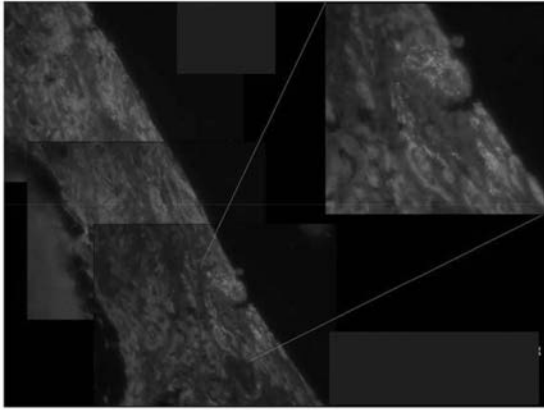
【 図 2 1 】



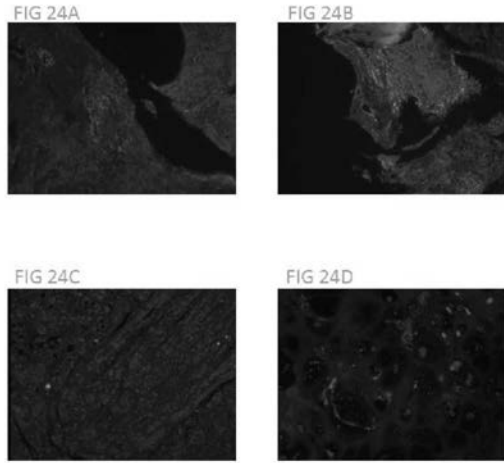
【 図 2 2 】



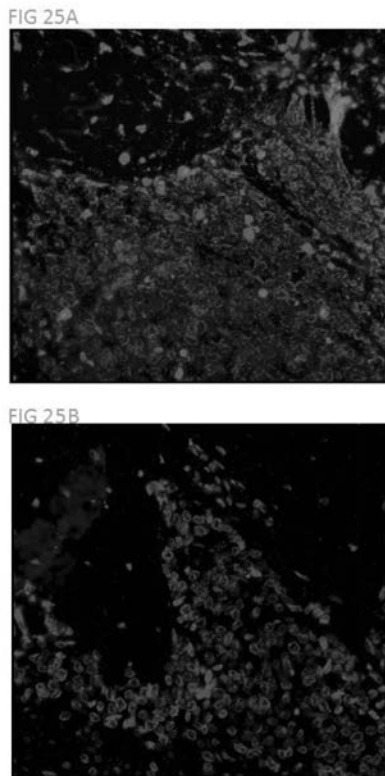
【 図 2 3 】



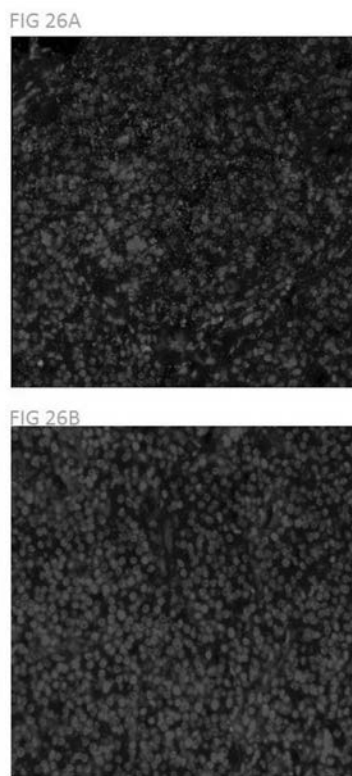
【 図 2 4 】



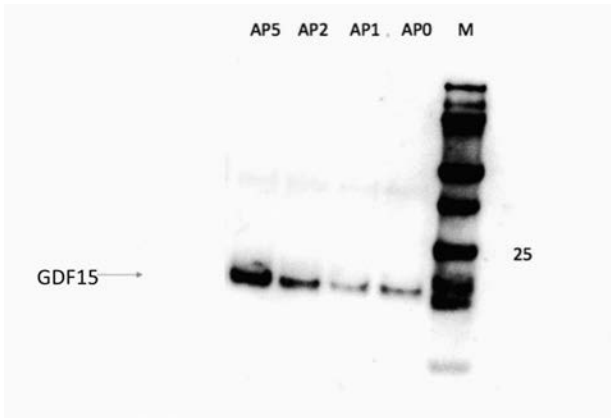
【 図 2 5 】



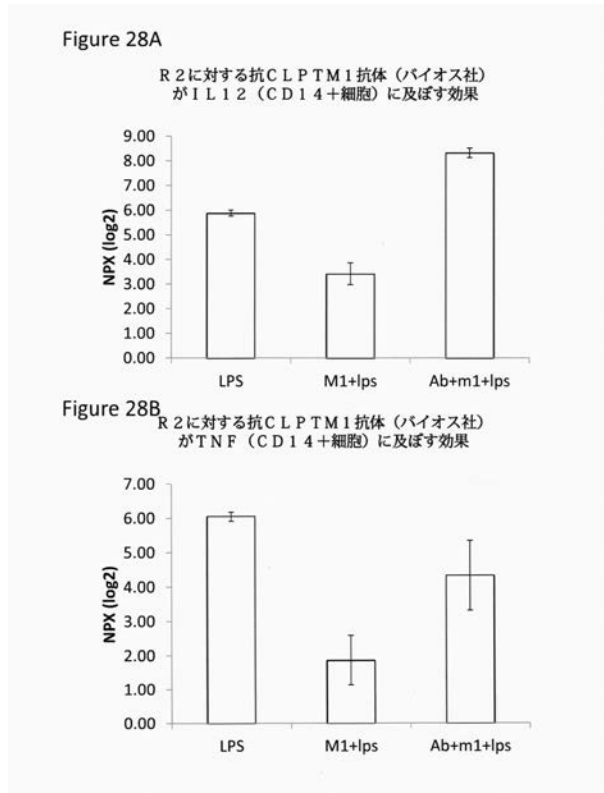
【 図 2 6 】



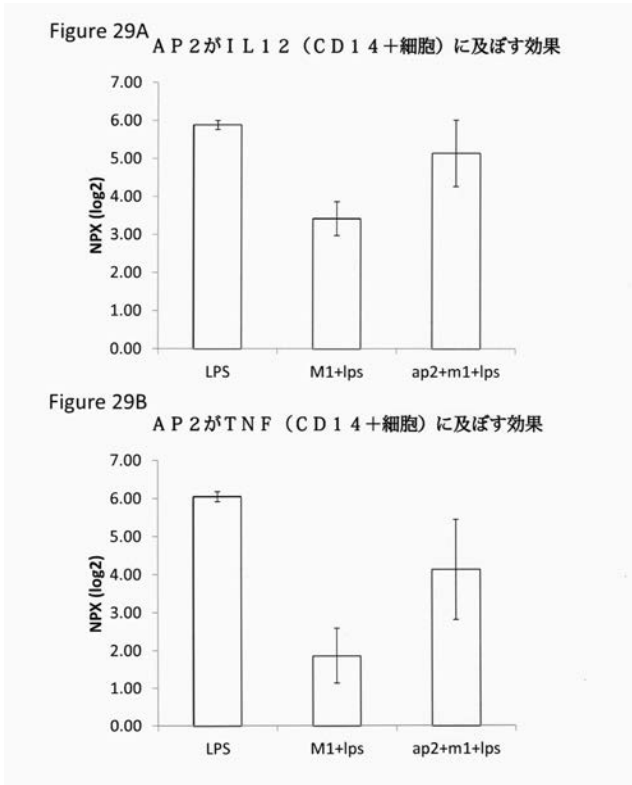
【 図 2 7 】



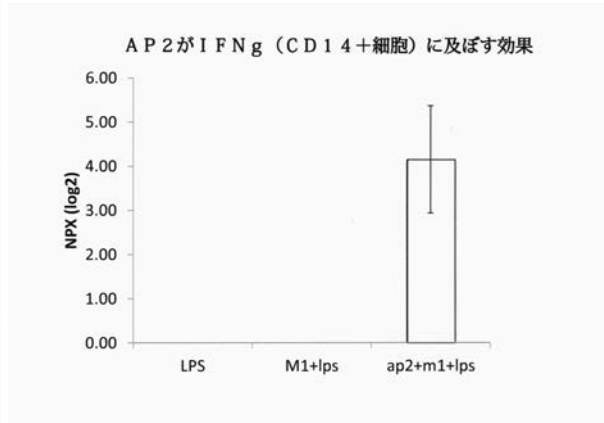
【 図 2 8 】



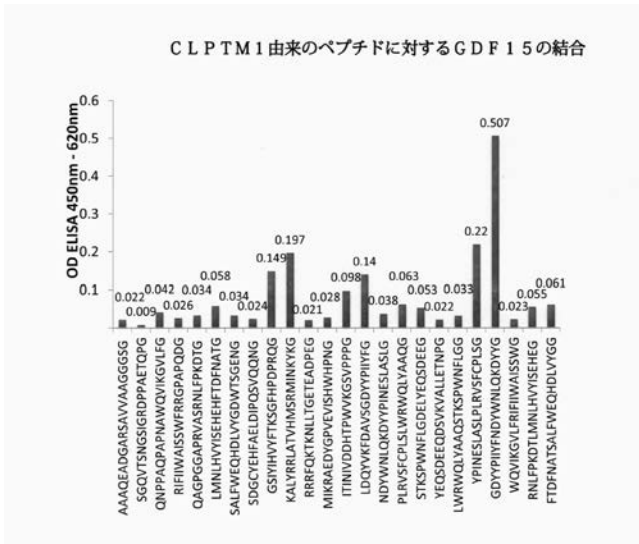
【 図 2 9 】



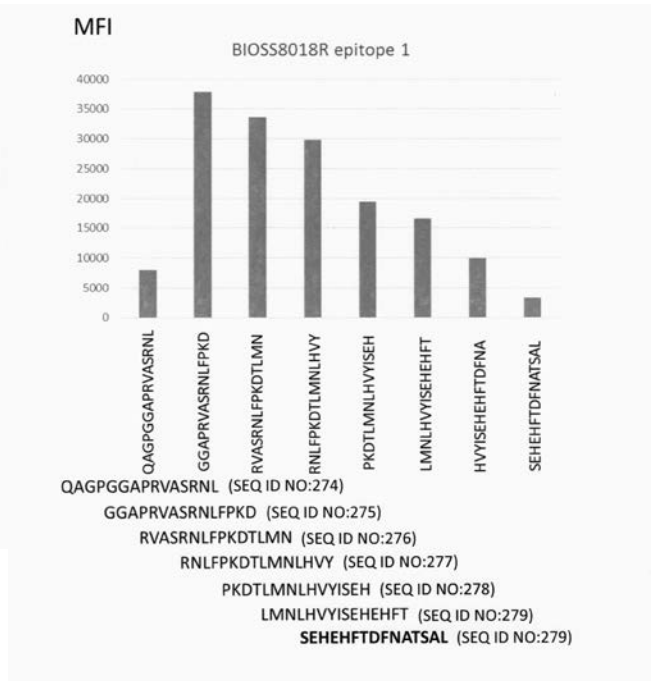
【 図 3 0 】



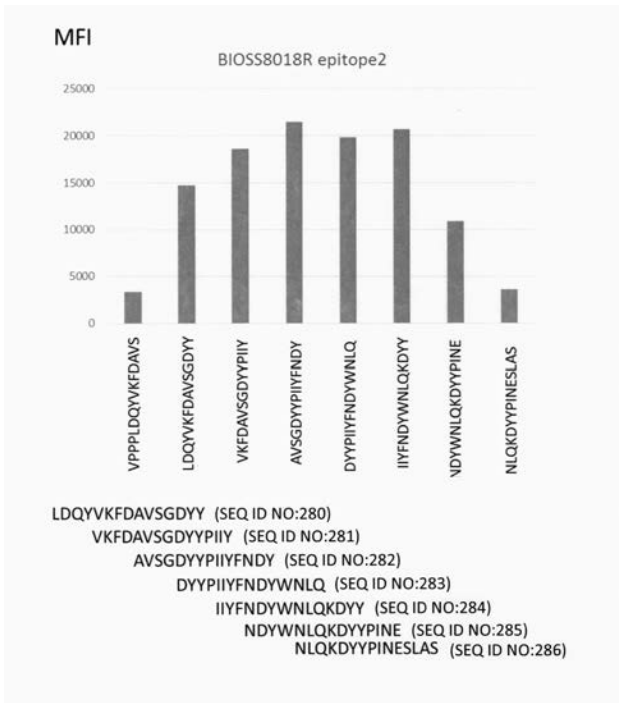
【 図 3 1 】



【 図 3 2 A 】



【 図 3 2 B 】



【配列表】

2018536657000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/067338
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 C07K14/705 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/106935 A2 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; SUM) 9 December 2004 (2004-12-09) the whole document claim 21; figure 2; examples 7-13 -----	1-51,62
X	WO 02/061087 A2 (LIFESPAN BIOSCIENCES INC [US]; BURMER GLENNA C [US]; ROUSH CHRISTINE L) 8 August 2002 (2002-08-08) the whole document page 55 - page 59; claims; sequences 510,1854-1857 -----	1-51,62
X	WO 2004/039333 A2 (GENZYME CORP [US]; NICOLETTE CHARLES A [US]) 13 May 2004 (2004-05-13) page 71; claims 1-10; compound 5; sequence 11 -----	1-51,62
Y		52-61
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  23 November 2016		Date of mailing of the international search report  02/12/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Cervigni, S

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/067338

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/124342 A2 (GALAPAGOS NV [BE]; VANDEGHINSTE NICK [BE]; TOMME PETER HERWIG MARIA [B] 29 December 2005 (2005-12-29) the whole document page 24; claims; table 1A; compounds 106, 107, 409, 411, 422, 426 -----	1-51, 62
X	WO 01/87930 A2 (BAYER AG [DE]; RAMAKRISHNAN SHYAM [US]) 22 November 2001 (2001-11-22) the whole document claims; figure 2; sequences 2,5 -----	1-31, 36-44, 51-62
X	Santa Cruz Biotechnology ET AL: "CLPTM1 (G-7): sc-374619", 13 March 2014 (2014-03-13), XP055302019, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.ld211.com/upload/file/20140313/20140313103017_26443.pdf">http://www.ld211.com/upload/file/20140313/20140313103017_26443.pdf</a> [retrieved on 2016-09-13] the whole document -----	1-51, 62
X	US 2010/029573 A1 (WEINSCHENK TONI [DE] ET AL) 4 February 2010 (2010-02-04) table 1; sequence 575 -----	1-51, 62
Y	GRAZYNA LIPOWSKA-BHALLA ET AL: "Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 61, no. 7, 22 April 2012 (2012-04-22), pages 953-962, XP035074376, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-012-1254-0 the whole document -----	52-61
X	WO 2012/129514 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; RIDDELL STANLEY R [US]; HUDECEK MICHA) 27 September 2012 (2012-09-27) the whole document -----	52-61
X	US 2014/099310 A1 (FANG DONG [US] ET AL) 10 April 2014 (2014-04-10) the whole document page 42 -----	52-61
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/067338

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOBRAL RENATA A ET AL: "Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer", ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 50, no. 1, 4 July 2008 (2008-07-04), page 27, XP021039980, ISSN: 1751-0147 the whole document -----	52-61
A,P	WO 2015/108719 A1 (WISCONSIN MED COLLEGE INC [US]) 23 July 2015 (2015-07-23) the whole document page 15 -----	52-61

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2016/067338**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/ EP2016/ 067338

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

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

1. claims: 2-4(completely); 1, 5, 6, 36-51, 62(partially)

A binding agent capable of binding to the receptor CLPTM1 and/or QRFPR for use in therapy and capable of inhibiting the interaction between and GDF15 and a said receptor, where such a binding agent is an antibody. Medical and diagnostic uses as well as pharmaceutical compositions comprising them. Product comprising such a binding agent for use in treating cancer.

---

2. claims: 1, 5, 6, 36-51, 62(all partially)

A binding agent capable of binding to the receptor CLPTM1 and/or QRFPR for use in therapy and capable of inhibiting the interaction between and GDF15 and a said receptor, where such a binding agent is not an antibody as defined in invention 1. Medical and diagnostic uses as well as pharmaceutical compositions comprising them. Product comprising such a binding agent for use in treating cancer.

---

3. claims: 7-35(completely); 36-51, 62(partially)

Polypeptides per se and for use in therapy, capable of binding to GDF15 and capable of inhibiting its interaction with CLPTM1 and/or QRFPR. Medical and diagnostic uses as well as pharmaceutical compositions comprising them. Product comprising such a binding agent for use in treating cancer.

---

4. claims: 52-61(completely); 62(partially)

A cytotoxic immune cell modified to have a reduced level and/or activity of CLPTM1 and uses thereof are also claimed. A product comprising" a cell as defined above for use in treating cancer.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/067338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004106935	A2	09-12-2004	NONE
WO 02061087	A2	08-08-2002	US 2003113798 A1 WO 02061087 A2
WO 2004039333	A2	13-05-2004	AU 2003286850 A1 US 2006014668 A1 WO 2004039333 A2
WO 2005124342	A2	29-12-2005	EP 1759203 A2 EP 2360474 A2 EP 2386856 A2 ES 2427046 T3 ES 2427136 T3 JP 5595989 B2 JP 2008503712 A JP 2011252922 A JP 2012021995 A US 2007004658 A1 US 2010087514 A1 US 2012190727 A1 US 2014107181 A1 WO 2005124342 A2
WO 0187930	A2	22-11-2001	AU 6901301 A EP 1287021 A2 US 2004053244 A1 WO 0187930 A2
US 2010029573	A1	04-02-2010	AT 446310 T AU 2005247598 A1 AU 2011202473 A1 CA 2568254 A1 CA 2777821 A1 CY 1109672 T1 CY 1112984 T1 DE 102004026135 A1 DK 1761553 T3 DK 2058323 T3 EP 1761553 A2 EP 2058323 A1 ES 2333804 T3 ES 2385532 T3 JP 4764874 B2 JP 5182770 B2 JP 2008500033 A JP 2011224007 A PT 1761553 E PT 2058323 E SI 1761553 T1 SI 2058323 T1 US 2010021441 A1 US 2010029573 A1 WO 2005116051 A2
WO 2012129514	A1	27-09-2012	AU 2012230780 A1 AU 2016238963 A1 BR 112013024395 A2

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/067338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		CA 2830953 A1	27-09-2012	
		CN 103502438 A	08-01-2014	
		CN 106074601 A	09-11-2016	
		EP 2689010 A1	29-01-2014	
		JP 2014510108 A	24-04-2014	
		JP 2016183194 A	20-10-2016	
		KR 20140023931 A	27-02-2014	
		RU 2013147157 A	27-04-2015	
		SG 193591 A1	30-10-2013	
		SG 10201602253S A	30-05-2016	
		US 2014314795 A1	23-10-2014	
		WO 2012129514 A1	27-09-2012	
-----				
US 2014099310	A1	10-04-2014	US 8168586 B1	01-05-2012
			US 2013078253 A1	28-03-2013
			US 2014099310 A1	10-04-2014
-----				
WO 2015108719	A1	23-07-2015	AU 2015206788 A1	28-07-2016
			CA 2936488 A1	23-07-2015
			EP 3094654 A1	23-11-2016
			KR 20160101196 A	24-08-2016
			SG 11201605745V A	30-08-2016
			US 2016333083 A1	17-11-2016
			WO 2015108719 A1	23-07-2015
-----				

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	38/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	35/17	Z
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 11
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
		G 0 1 N	33/53	P
		C 0 7 K	16/46	
		C 1 2 N	15/09	Z

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. トリトン
3. Triton

(72) 発明者 フレドリクソン、ヨハン エリク シモン  
スウェーデン、1 6 8 5 4 ブロンマ、キヴィクスヴァーゲン 2

Fターム(参考) 4B065 AA93Y AA94X AB01 BA02 CA44  
 4C084 AA02 AA03 BA02 BA08 BA16 BA17 BA41 CA56 MA02 NA14  
 ZA36 ZA42 ZA55 ZA59 ZA81 ZB09 ZC54  
 4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB31 DD62 EE03  
 4C087 AA01 AA02 BB37 NA14 ZA36 ZA42 ZA55 ZA59 ZA81 ZB09  
 ZB26 ZC54  
 4H045 AA11 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 BA41 CA40 DA22 DA50  
 DA75 DA76 EA20 EA50

专利名称(译)	降低GDF活性的试剂15		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018536657A</a>	公开(公告)日	2018-12-13
申请号	JP2018522864	申请日	2016-07-20
[标]发明人	ブロクゼイルオロフアンドリース		
发明人	ブロクゼイル、オロフ アンドリース フレドリクソン、ヨハン エリク シモン		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/28 C07K14/71 C07K7/06 C12N5/0783 C12N5/10 C07K19/00 C12Q1/68 A61P35/00 A61P7/00 A61P19/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P9/12 A61P13/12 A61P7/06 A61P37/04 A61P35/04 A61K38/02 A61K35/17 A61P43/00 G01N33/53 C07K16/46 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/22 A61P35/04 C07K14/705 C07K16/2863 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2319/30		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N C07K16/28 C07K14/71 C07K7/06 C12N5/0783 C12N5/10 C07K19/00 C12Q1/68.Z A61P35/00 A61P7/00 A61P19/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P9/12 A61P13/12 A61P7/06 A61P37/04 A61P35/04 A61K39/395.D A61K38/02 A61K35/17.Z A61P43/00.111 A61K39/395.E A61K39/395.T G01N33/53.P C07K16/46 C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA41 4C084/CA56 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA42 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA81 4C084/ZB09 4C084/ZC54 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/DD62 4C085/EE03 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA55 4C087/ZA59 4C087/ZA81 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZC54 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA22 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	2015012733 2015-07-20 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及降低GDF15活性的试剂，尤其涉及这种试剂在治疗或预防与GDF15水平升高或不想要的水平相关的疾病中的用途。本发明基于以下发现：GDF15以能够结合受体并抑制GDF15与受体之间相互作用的结合剂的形式结合其受体CLPTM1和QRFP，提供用于这种用途的药物。另外，该试剂包括能够与GDF15结合并抑制GDF15对受体的作用的源自受体的多肽。还提供了基于检测相互作用或相互作用的影响的诊断方法，以及经过修饰以降低CLPTM1水平和/或CLPTM1活性的细胞毒性免疫细胞。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-536657 (P2018-536657A)
	(43) 公表日	平成30年12月13日(2018.12.13)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	ZNAN 4B065
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4C084
C07K 14/71 (2006.01)	C07K 14/71	4C085
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4C087
C12N 5/0783 (2010.01)	C12N 5/0783	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 94 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-522864 (P2018-522864)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成28年7月20日(2016.7.20)	イェナゴン セラピューティクス アーベ
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月14日(2018.3.14)	スウェーデン、エスー171 76 ソル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/067338	ナ、カロリンスカ ユニバーシティ ホス
(87) 国際公開番号	W02017/013188	ピタル、ビルディング、エム1、グスタフ
(87) 国際公開日	平成29年1月26日(2017.1.26)	ヴェー リサーチ インスティテュート
(31) 優先権主張番号	1512733.5	(74) 代理人
(32) 優先日	平成27年7月20日(2015.7.20)	110000040
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
		(72) 発明者
		ブロクゼイル、オロフ アンドリース
		スウェーデン、11328 ストックホル
		ム、アップランズガタン 69
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	GDF15の活性を低減させるための試薬	