

(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2005-520566

(P2005-520566A)

(43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 21/08</b>	C 1 2 P 21/08	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	C 4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 35/00</b>	A 6 1 K 39/395	D 4 C O 8 5
<b>C O 7 K 16/18</b>	A 6 1 K 39/395	L 4 H O 4 5
<b>G O 1 N 33/15</b>	A 6 1 K 39/395	N
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-580477 (P2003-580477)	(71) 出願人	592221528
(86) (22) 出願日	平成14年10月1日 (2002. 10. 1)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月22日 (2004. 11. 22)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031462		1 4 2、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター 1 4
(87) 国際公開番号	W02003/083041	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成15年10月9日 (2003. 10. 9)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/367, 002	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成14年3月22日 (2002. 3. 22)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	PCT/US02/11950		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成14年4月17日 (2002. 4. 17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 C r i p t o特異的抗体

## (57) 【要約】

本発明は、C r i p t o特異的抗体、またはその生物学的機能的フラグメント、およびそれらの使用を提供する。C r i p t oに結合し、そしてC r i p t o活性を阻害する抗体が提供される。C r i p t oに結合し、そしてC r i p t oとA L K 4との間の相互作用を阻害し、そして/またはC r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用を阻害する抗体が提供される。C r i p t oに結合し、そして腫瘍増殖を阻害する抗体もまた提供される。C r i p t oに結合し、C r i p t o活性を阻害し、そして腫瘍増殖を阻害する抗体もまた提供される。本発明はまた、治療適用、診断適用、および研究適用におけるこれらの抗体の使用方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C r i p t o のリガンド/レセプター結合ドメインにおけるエピトープに特異的に結合する抗体。

## 【請求項 2】

前記 C r i p t o は、配列番号 1 または 2 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

前記エピトープは、E G F 様ドメインに存在する、請求項 2 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

前記エピトープは、c y s - リッチドメインに存在する、請求項 2 に記載の抗体。

## 【請求項 5】

A 6 C 1 2 . 1 1、A 6 F 8 . 6、A 7 H 1 . 1 9、A 8 F 1 . 3 0、A 8 G 3 . 5、A 8 H 3 . 1、A 8 H 3 . 2、A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 1 0 B 2 . 1 7、A 1 0 B 2 . 1 8、A 2 7 F 6 . 1、A 4 0 G 1 2 . 8、A 2 D 3 . 2 3、A 7 A 1 0 . 2 9、A 9 G 9 . 9、A 1 5 C 1 2 . 1 0、A 1 5 E 4 . 1 4、A 1 7 A 2 . 1 6、A 1 7 C 1 2 . 2 8、A 1 7 G 1 2 . 1、A 1 7 H 6 . 1、A 1 8 B 3 . 1 1、A 1 9 E 2 . 7、B 3 F 6 . 1 7、B 6 G 7 . 1 0、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7 および 4 - 1 E 2 からなる群より選択される、請求項 2 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

A 4 0 G 1 2 . 8、A 8 H 3 . 1、A 2 7 F 6 . 1、B 6 G 7 . 1 0、A 1 7 G 1 2 . 1 および A 1 8 B 3 . 1 1 からなる群より選択される、請求項 3 に記載の抗体。

## 【請求項 7】

A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 8 G 3 . 5、A 6 F 8 . 6、A 6 C 1 2 . 1 1、1 - 1 A 4 C . 2 および 2 - 2 C 9 . 2 からなる群より選択される、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 8】

C r i p t o のアミノ酸残基 4 6 ~ 6 2 にわたるドメインを含むエピトープに特異的に結合する抗体。

## 【請求項 9】

A 1 0 B 2 . 1 8、B 3 F 6 . 1 7、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 2 および 3 - 4 E 8 . 3 からなる群より選択される、請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 10】

抗体 A 6 C 1 2 . 1 1、A 6 F 8 . 6、A 7 H 1 . 1 9、A 8 F 1 . 3 0、A 8 G 3 . 5、A 8 H 3 . 1、A 8 H 3 . 2、A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 1 0 B 2 . 1 7、A 1 0 B 2 . 1 8、A 2 7 F 6 . 1、A 4 0 G 1 2 . 8、A 2 D 3 . 2 3、A 7 A 1 0 . 2 9、A 9 G 9 . 9、A 1 5 C 1 2 . 1 0、A 1 5 E 4 . 1 4、A 1 7 A 2 . 1 6、A 1 7 C 1 2 . 2 8、A 1 7 G 1 2 . 1、A 1 7 H 6 . 1、A 1 8 B 3 . 1 1、A 1 9 E 2 . 7、B 3 F 6 . 1 7、B 6 G 7 . 1 0、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7 および 4 - 1 E 2 が結合するエピトープからなる群より選択されるエピトープに特異的に結合する抗体。

## 【請求項 11】

C r i p t o に特異的に結合し、そして C r i p t o 活性を阻害する、抗体。

## 【請求項 12】

C r i p t o の E G F 様ドメインに存在するエピトープに特異的に結合する、請求項 11 に記載の抗体。

## 【請求項 13】

A 4 0 G 1 2 . 8、A 8 H 3 . 1、A 2 7 F 6 . 1、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2

10

20

30

40

50

および 2 - 4 D 1 . 3 からなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

C r i p t o の c y s - リッチドメインに存在するエピトープに特異的に結合する請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

A 6 C 1 2 . 1 1、1 - 1 A 4 C . 2 および 2 - 2 C 9 . 2 からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

A 4 0 G 1 2 . 8、A 8 H 3 . 1、A 2 7 F 6 . 1、および A 6 C 1 2 . 1 1 からなる群より選択される、請求項 1 1 に記載の抗体。

10

【請求項 1 7】

C r i p t o に特異的に結合し、そして腫瘍増殖を阻害する、抗体。

【請求項 1 8】

C r i p t o の E G F 様ドメインに存在するエピトープに特異的に結合する、請求項 1 7 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

C r i p t o の c y s - リッチドメインに存在するエピトープに特異的に結合する請求項 1 7 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

A 2 7 F 6 . 1、A 8 G 3 . 5 および B 6 G 7 . 1 0 からなる群より選択される、請求項 1 7 に記載の抗体。

20

【請求項 2 1】

C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o 活性を阻害し、そして腫瘍増殖を阻害する、抗体

【請求項 2 2】

C r i p t o の E G F 様ドメインに存在するエピトープに特異的に結合する、請求項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

C r i p t o の c y s - リッチドメインに存在するエピトープに特異的に結合する請求項 2 1 に記載の抗体。

30

【請求項 2 4】

A 2 7 F 6 . 1、A 8 G 3 および 1 - 1 A 4 C . 2 からなる群より選択される、請求項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

A 6 F 8 . 6 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 5 )、A 1 0 B 2 . 1 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 1 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 1 7 G 1 2 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 4 )、A 1 8 B 3 . 1 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 2 )、B 3 F 6 . 1 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 9 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7 および 4 - 1 E 2 からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体。

40

【請求項 2 6】

C r i p t o に特異的に結合し、そして C r i p t o と A L K 4 との間の相互作用を阻害する、抗体。

【請求項 2 7】

C r i p t o の c y s - リッチドメインに存在するエピトープに特異的に結合する、請求項 2 6 に記載の抗体。

50

## 【請求項 28】

A 8 G 3 . 5、A 6 F 8 . 6 および A 6 C 1 2 . 1 1 からなる群より選択される、請求項 26 に記載の抗体。

## 【請求項 29】

C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o と A L K 4 との間の相互作用を阻害し、そして腫瘍増殖を阻害する、抗体。

## 【請求項 30】

C r i p t o の c y s - リッチドメインに存在するエピトープに特異的に結合する、請求項 29 に記載の抗体。

## 【請求項 31】

A 8 G 3 . 5 または 1 - 1 A 4 C . 2 である、請求項 29 に記載の抗体。

## 【請求項 32】

C r i p t o を内在化し得る、C r i p t o 抗体。

## 【請求項 33】

前記抗体は、化学療法剤に結合体化されている、請求項 32 に記載の抗体。

## 【請求項 34】

A 2 7 F 6 . 1、B 3 F 6 . 1 7、A 8 G 3、1 - 1 A 4 C . 2 および 3 - 4 E 8 . 3 からなる群より選択される、請求項 32 に記載の抗体。

## 【請求項 35】

C r i p t o を発現する腫瘍を有する哺乳動物に投与するための、請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の抗体の少なくとも 1 つを含む、組成物。

## 【請求項 36】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 35 に記載の組成物。

## 【請求項 37】

薬学的に受容可能な賦形剤をさらに含む、請求項 35 に記載の組成物。

## 【請求項 38】

前記抗体は、化学療法剤に結合体化されている、請求項 35 に記載の組成物。

## 【請求項 39】

結合体化されていない化学療法剤をさらに含む、請求項 35 に記載の組成物。

## 【請求項 40】

サンプルにおいてインビトロで腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、請求項 35 に記載の組成物を該サンプルに添加する工程を包含する、方法。

## 【請求項 41】

哺乳動物においてインビトロで腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、請求項 35 に記載の組成物を該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 42】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 41 に記載の方法。

## 【請求項 43】

C r i p t o を過剰発現する腫瘍を有する哺乳動物を処置する方法であって、該方法は、請求項 35 に記載の組成物を該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 44】

C r i p t o を過剰発現する腫瘍を有する患者を処置する方法であって、該方法は、請求項 37 に記載の組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 45】

C r i p t o を過剰発現する腫瘍を有する患者を処置する方法であって、該方法は、請求項 38 に記載の組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 46】

C r i p t o を過剰発現する腫瘍を有する患者を処置する方法であって、該方法は、請求項 39 に記載の組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 47】

10

20

30

40

50

前記腫瘍細胞が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍細胞からなる群より選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 48】

前記腫瘍が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍からなる群より選択される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 49】

前記腫瘍が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍からなる群より選択される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 50】

前記腫瘍が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍からなる群より選択される、請求項 43 に記載の方法。 10

【請求項 51】

前記腫瘍が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍からなる群より選択される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 52】

前記腫瘍が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍からなる群より選択される、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 53】

前記腫瘍が、脳、胸部、精巣、大腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍からなる群より選択される、請求項 46 に記載の方法。 20

【請求項 54】

組織が C r i p t o を発現するか否かを決定する方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の抗体を使用する免疫アッセイにおいて、哺乳動物由来の組織を分析する工程を包含する、方法。

【請求項 55】

細胞株が C r i p t o を過剰発現するか否かを決定する方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の抗体を使用する免疫アッセイにおいて、該細胞株を分析する工程を包含する、方法。

【請求項 56】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。 30

【請求項 57】

前記抗体は、ヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 58】

前記抗体は、ヒト抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 59】

所望でない細胞増殖に関連した状態について哺乳動物を処置する方法であって、該方法は、請求項 35 に記載の組成物を、該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 60】

前記抗体は、C r i p t o とアクチビン B との間の結合相互作用を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。 40

【請求項 61】

前記抗体は、A 8 G 3 . 5 または 1 - 1 A 4 C . 2 である、請求項 60 に記載の抗体。

【請求項 62】

請求項 60 に記載の抗体および薬学的受容可能な賦形剤を含む、組成物。

【請求項 63】

C r i p t o とアクチビン B との間の結合相互作用を阻害する方法であって、C r i p t o と請求項 60 に記載の抗体とを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 64】

前記接触させる工程が、哺乳動物において行われる、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 C r i p t o は、細胞の表面上に存在する、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記細胞は、C r i p t o を過剰発現している腫瘍細胞である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

哺乳動物における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、請求項 6 2 に記載の組成物を、該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 6 9】

前記腫瘍細胞は、C r i p t o を過剰発現する、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記腫瘍細胞は、ヒト乳癌細胞である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

腫瘍を有する哺乳動物を処置する方法であって、該方法は、請求項 6 2 に記載の組成物を該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 7 3】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記腫瘍は、C r i p t o を過剰発現する、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

C r i p t o とアクチビン B との間の結合相互作用を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下：

候補化合物を得る工程；

該候補化合物の存在下で、C r i p t o とアクチビン B とを接触させる工程；および

C r i p t o とアクチビン B との間の結合相互作用の変化を検出する工程、

を包含し、ここで、該変化の検出は、該候補化合物が C r i p t o とアクチビン B との間の結合相互作用を阻害することを示す、方法。

【請求項 7 6】

前記化合物は、抗体である、請求項 7 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2002年3月22日出願の米国出願番号第60/367,002；2001年6月26日出願の米国出願番号第60/301,091；2001年5月17日出願の米国出願番号第60/293,020；2001年4月26日に提出の米国出願番号第60/286,782に対する優先権を主張する2002年4月24日出願の国際特許出願番号PCT/US02/11950に対する優先権を主張する。これらの全内容は、本明細書中で参考として援用される。

【0002】

一般的に、本発明は、遺伝学および細胞生物学ならびに、分子生物学に関する。さらに詳しくは、本発明は、抗C r i p t o抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

C r i p t o は、188アミノ酸の細胞表面タンパク質である。C r i p t o は、ヒト胚性癌ライブラリのcDNAスクリーンにおいて、思いがけなく単離された(Ciccociollaら, 1989, EMBO J. 8:1987-91)。C r i p t o タンパク質は、少なくとも2つの注目すべきドメインを有する：システインに富む(cys-リ

10

20

30

40

50

ッチ)ドメインおよび、上皮成長因子(EGF)ファミリーで見られるドメインと類似しているとして、最初に特徴付けられたドメイン。C r i p t oとは、もとは、EGFファミリーのメンバーとして分類されていた(C i c c o d i c o l aら, 前出);しかし、その後の分析が、C r i p t oが公知のどのEGFレセプターにも結合しないこととならびに、C r i p t oのEGF様ドメインが実際は、EGFファミリーから相違することを示した(B i a n c oら, 1999, J. Biol. Chem. 274: 8624~29)。

#### 【0004】

C r i p t oシグナル経路は、続行する研究にも関わらず理解されないままである。文献は、種々の異なる経路の活性化を支持している。種々の経路には、MAPキナーゼ経路(DeSantisら, 1997, Cell Growth Differ. 8: 1257~66; Kannanら, 1997, J. Biol. Chem. 272: 3330~35); TGF- 経路(Gritsmanら, 1999, Development 127: 921~32; Schierら, 2000, Nature 403: 385~89); Wnt経路との可能な相互作用(Salomonら, 2000, Endocr. Relat. Cancer. 7: 199~226); およびEGF経路とのクロストーク(B i a n c oら, 1999, J. Biol. Chem. 274: 8624~29)が挙げられる。

#### 【0005】

米国特許第5, 256, 643号およびこれに関する2つの特許(米国特許第5, 654, 140号、米国特許第5, 792, 616号)が、ヒトC r i p t o遺伝子、C r i p t oタンパク質およびC r i p t oに対する抗体を開示している。

#### 【0006】

米国特許第5, 264, 557号およびこれに関する3つの特許(米国特許第5, 620, 866号、米国特許第5, 650, 285号ならびに米国特許第5, 854, 399号)が、ヒトC r i p t oに関する遺伝子およびヒトC r i p t oに関するタンパク質を開示している。そのC r i p t oに関するタンパク質に結合するが、C r i p t oタンパク質自身の結合によって交差反応しない抗体も開示されている。

#### 【0007】

小さなC r i p t oペプチドに対して産生されたウサギポリクローナル抗体でのヒト組織の免疫染色によって示されるように、C r i p t oタンパク質の過剰発現は、多くの組織における癌と関係している(脳、乳房、精巣、結腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓、および胃が挙げられるが、これらに限定されない)。P a n i c oら, 1996, Int. J. Cancer 65: 51~56; Byrneら, 1998, J. Pathology 185: 108~11; De Angelisら, 1999, Int. J. Oncology 14: 437~40。従って、当該分野は、このような過剰発現の調節、制限、および/または防止、C r i p t o活性の阻害、ならびにC r i p t o発現の結果を阻害する方法を必要としている(すなわち、細胞形質転換の促進および/または維持)。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

##### (本発明の要約)

本発明は、C r i p t oに特異的に結合する新規な抗体ならびに、このような抗体の作製方法および使用方法を提供する。本発明はまた、C r i p t oに結合する抗体ならびに、C r i p t oの活性またはタンパク質の相互作用を阻害する(例えば、C r i p t oに結合するため、C r i p t oとタンパク質の相互作用で生じるシグナルが、下方調節される)抗体を提供する。本発明はまた、C r i p t oに結合し、C r i p t oとALK4との間の相互作用をブロックする抗体を提供する。本発明はまた、C r i p t oに結合し、C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用をブロックする抗体を提供する。本発明は

10

20

30

40

50

また、C r i p t oに結合し、腫瘍の増殖を阻害する抗体を提供する。本発明はまた、C r i p t oに結合し、C r i p t oの活性を阻害し、腫瘍の増殖を阻害する抗体を提供する。本発明はまた、C r i p t oに結合し、C r i p t oとA L K 4との間の相互作用および/またはC r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用をブロックするならびに、腫瘍の増殖を阻害する抗体を提供する。

**【0009】**

本発明の1つの局面において、本発明の抗体は、抗体A 6 C 1 2 . 1 1、A 6 F 8 . 6 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 7 H 1 . 1 9、A 8 F 1 . 3 0、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 5 )、A 8 H 3 . 2、A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 1 0 B 2 . 1 7、A 1 0 B 2 . 1 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 1 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 2 D 3 . 2 3、A 7 A 1 0 . 2 9、A 9 G 9 . 9、A 1 5 C 1 2 . 1 0、A 1 5 E 4 . 1 4、A 1 7 A 2 . 1 6、A 1 7 C 1 2 . 2 8、A 1 7 G 1 2 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 4 )、A 1 7 H 6 . 1、A 1 8 B 3 . 1 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 2 )、A 1 9 E 2 . 7、B 3 F 6 . 1 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 9 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7および4 - 1 E 2が結合するエピトープの群から選択されるエピトープに特異的に結合する。

10

20

**【0010】**

本発明の別の局面において、本発明の抗体は、C r i p t oのリガンド/レセプター結合ドメイン中のエピトープに特異的に結合する。C r i p t oは、C R - 1 ( 配列番号：1 )またはC R - 3 ( 配列番号：2 )から選択され得る。さらに詳しい実施形態において、リガンド/レセプター結合ドメイン中のエピトープに特異的に結合する抗体には、例えば、A 6 C 1 2 . 1 1、A 6 F 8 . 6 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 7 H 1 . 1 9、A 8 F 1 . 3 0、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 5 )、A 8 H 3 . 2、A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 1 0 B 2 . 1 7、A 1 0 B 2 . 1 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 1 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 2 D 3 . 2 3、A 7 A 1 0 . 2 9、A 9 G 9 . 9、A 1 5 C 1 2 . 1 0、A 1 5 E 4 . 1 4、A 1 7 A 2 . 1 6、A 1 7 C 1 2 . 2 8、A 1 7 G 1 2 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 4 )、A 1 7 H 6 . 1、A 1 8 B 3 . 1 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 2 )、A 1 9 E 2 . 7、B 3 F 6 . 1 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 9 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7および4 - 1 E 2が挙げられる。

30

**【0011】**

いくつかの実施形態において、本発明の抗体が結合するエピトープは、E G F様ドメインである。E G F様ドメイン中のエピトープに特異的に結合する抗体には、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 5 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、A 1 7 G 1 2 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 4 )、A 1 8 B 3 . 1 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 2 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 4 D 1 . 3が挙げられるが、これらに限定されない。

40

**【0012】**

別の実施形態において、本発明の抗体が結合するエピトープは、c y s - リッチドメインである。c y s - リッチドメイン中のエピトープに特異的に結合する抗体は、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 6 F 8 . 6 ( A T

50



C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 6 C 1 2 . 1 1、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 3 】

さらに別の実施形態において、本発明の抗体が結合するエピトープは、アミノ末端中にある。アミノ末端中のエピトープに特異的に結合する抗体には、A 1 0 B 2 . 1 7 が挙げられるが、これに限定されない。

【 0 0 1 4 】

また他の実施形態において、本発明の抗体が結合するエピトープは、C r i p t o のドメインにまたがるアミノ酸残基 4 6 ~ 6 2 ある。C r i p t o のドメインにまたがるアミノ酸残基 4 6 ~ 6 2 中のエピトープに特異的に結合する抗体には、A 1 0 B 2 . 1 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 1 )、B 3 F 6 . 1 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 9 )、A 1 7 A 2 . 1 6、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 1 E 7 . 2、3 - 3 G 1 . 1 が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 1 5 】

他の実施形態において、本発明の抗体が結合するエピトープは、C R 4 0 ( 配列番号 : 3 )、C R 4 1 ( 配列番号 : 4 )、C R 4 3 ( 配列番号 : 5 )、C R 4 4 ( 配列番号 : 6 )、C R 4 9 ( 配列番号 : 7 )、C R 5 0 ( 配列番号 : 8 ) または C R 5 1 ( 配列番号 : 9 ) ポリペプチド中にある。これらペプチドの 1 つにおけるエピトープに特異的に結合する抗体には、A 6 C 1 2 . 1 1、A 6 8 . 6、A 7 H 1 . 1 9、A 8 F 1 . 3 0、A 8 G 3 . 5、A 8 H 3 . 1、A 8 H 3 . 2、A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 1 0 B 2 . 1 7、A 1 0 B 2 . 1 8、A 2 7 F 6 . 1、A 4 0 G 1 2 . 8、A 2 D 3 . 2 3、A 7 A 1 0 . 2 9、A 9 G 9 . 9、A 1 5 C 1 2 . 1 0、A 1 5 E 4 . 1 4、A 1 7 A 2 . 1 6、A 1 7 C 1 2 . 2 8、A 1 7 G 1 2 . 1、A 1 7 H 6 . 1、A 1 8 B 3 . 1 1、A 1 9 E 2 . 7、B 3 F 6 . 1 7、B 6 G 7 . 1 0、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7 および 4 - 1 E 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o の活性を阻害可能な抗体を含む。C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o の活性を阻害可能な抗体には、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 5 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 6 C 1 2 . 1 1、1 - 1 A 4 C . 2 および 2 - 2 C 9 . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o の活性を阻害可能な本発明の抗体は、C r i p t o の E G F 様ドメインまたは c y s - リッチドメイン中のエピトープに結合する。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o と A L K 4 との間の相互作用をブロックする抗体を含む。C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o と A L K 4 との間の相互作用をブロックする抗体には、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 6 F 8 . 6 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 6 C 1 2 . 1 1、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o と A L K 4 との間の相互作用をブロックする本発明の抗体は、C r i p t o の E G F 様ドメインまたは c y s - リッチドメイン中のエピトープに結合する。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o とアクチビン B との間の相互作用をブロックする抗体を含む。C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o とアクチビン B との間の相互作用をブロックする抗体には、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、1 - 1 A 4 C . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、C r i p t o に特異的に結合し、C r i p t o とアクチビン B と

の間の相互作用をブロックする本発明の抗体は、C r i p t oのc y s - リッチドメイン中のエピトープに結合する。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態において、本発明は、C r i p t oに特異的に結合し、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体を含む。C r i p t oに特異的に結合し、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体には、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、C r i p t oに特異的に結合し、腫瘍の増殖を阻害可能な本発明の抗体は、C r i p t oのE G F様ドメインまたはc y s - リッチドメイン中のエピトープに結合する。

【 0 0 2 1 】

また別の局面において、本発明は、C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oの活性を阻害可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体を含む。C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oの活性を阻害可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体には、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 8 G 3 . 5、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oの活性を阻害可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な本発明の抗体は、C r i p t oのE G F様ドメインまたはc y s - リッチドメイン中のエピトープに結合する。

【 0 0 2 3 】

また別の局面において、本発明は、C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oとA L K 4との間の相互作用をブロック可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体を含む。C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oとA L K 4との間の相互作用をブロック可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体には、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 4 】

また別の局面において、本発明は、C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用をブロック可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体を含む。C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用をブロック可能で、腫瘍の増殖を阻害可能な抗体には、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、1 - 1 A 4 C . 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 5 】

別の局面において、本発明は、サンプル中のC r i p t oとアクチビンBとの間の結合を阻害する方法を提供する。この方法は、C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用をブロック可能な抗体をサンプルに加える工程を包含する。関連した局面において、本発明は、哺乳動物におけるC r i p t oとアクチビンBの結合を阻害する方法を包含する。この方法は、C r i p t oに特異的に結合し、C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用をブロック可能な抗体を哺乳動物に投与する工程を包含する。

【 0 0 2 6 】

別の実施形態において、本発明は、A 6 F 8 . 6 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 登録簿雲合 P T A - 3 3 1 5 ) A 1 0 B 2 . 1 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 1 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 1 7 G 1 2 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 4 )、A 1 8 B 3 . 1 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 2 )、B 3 F 6 . 1 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 9 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、1 -

10

20

30

40

50

1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 D 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7 および 4 - 1 E 2 からなる群から選択されたハイブリドーマによって産生された抗体を提供する。抗体のいくつかは、以下のような別の名を有する：1 - 1 A 4 C . 2 は、1 P 1 A 4 - C 2 . 1 ( A T C C 受託番号は、指定される ) と同じである；2 - 2 C 9 . 2 は、2 P 2 C 9 . 2 ( A T C C 受託番号は、指定される ) と同じである。；2 - 4 E 5 . 6 は、2 P 4 E 5 . 6 ( A T C C 受託番号は、指定される ) と同じである；3 - 3 G 1 . 1 は、3 P 3 G 1 . 1 ( A T C C 受託番号は、指定される ) と同じである；ならびに 3 - 4 E 8 . 3 は、3 P 4 E 8 . 3 ( A T C C 受託番号は、指定される ) と同じである。

#### 【0027】

10

本発明の抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ化抗体およびヒト抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0028】

本発明はまた、上で記載した抗体の少なくとも1つを包含する、C r i p t o を発現する腫瘍を有する哺乳動物への投与のための組成物を提供する。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。組成物は、薬学的に受容可能な賦形剤を含み得る。上で記載された抗体は、化学療法薬と結合され得るし、非結合化化学療法薬と組み合わせて提供され得る。

#### 【0029】

本発明の別の局面には、サンプル中のインビトロの腫瘍細胞の増殖の阻害の方法が含まれる。この方法は、上で記載した組成物をサンプルに加える工程を包含する。

20

#### 【0030】

哺乳動物のインビボ腫瘍細胞の増殖阻害の方法もまた含まれる。この方法は、上で記載した組成物の有効な量を哺乳動物へ投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

#### 【0031】

本発明の別の実施形態は、C r i p t o を過剰発現している腫瘍を有する哺乳動物の処置の方法であり、この処置は、上で記載した組成物を哺乳動物に有効な量投与する工程を包含する。投与のための組成物は、薬物学的に受容可能な賦形剤、化学療法薬に結合した抗体および非結合化化学療法薬と組み合わせて投与される抗体を含み得る。

30

#### 【0032】

本発明の方法は、腫瘍細胞の増殖の阻害および/または腫瘍(ここで腫瘍細胞は、脳腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、精巣腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、子宮腫瘍細胞、頸部腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、および胃腫瘍細胞から選択される)を有する哺乳動物(例えば、ヒト)の処置において特に有用である。

#### 【0033】

また別の実施形態において、本発明は、組織がC r i p t o を発現しているか否かを決定する方法を含む。この方法は、上で記載された任意の抗体を使用した免疫アッセイにおいて、哺乳動物由来の腫瘍を分析する工程を包含する。細胞株が、C r i p t o を過剰発現しているかどうかを決定する方法も含む。この方法は、上で記載された任意の抗体を使用した免疫アッセイにおいて、細胞株を分析する工程を包含する。

40

#### 【0034】

さらなる局面において、本発明は、アクチビンB誘導性の腫瘍細胞の阻害を維持または持続する方法を提供する。この方法は、本発明の抗体に腫瘍細胞を露出する工程を包含する。特定の実施形態において、腫瘍細胞は、ヒト腫瘍細胞である。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞は、脳腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、精巣腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、胚腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、子宮腫瘍細胞、頸腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、および胃腫瘍細胞から選択される。

#### 【0035】

また別の実施形態において、本発明は、組織がC r i p t o を発現しているかどうかを

50

決定する方法を含む。この方法は、上で記載された任意の抗体を使用した免疫アッセイにおいて、哺乳動物由来の組織を分析する工程を包含する。細胞株が、C r i p t o を過剰発現しているかどうかを決定する方法も含む。この方法は、上で記載された任意の抗体を使用した免疫アッセイにおいて、細胞株を分析する工程を包含する。

【 0 0 3 6 】

さらなる局面において、本発明は、アクチビン B 誘導性の腫瘍細胞の阻害を維持または持続する方法を提供する。この方法は、本発明の抗体に腫瘍細胞を露出する工程を包含する。特定の実施形態において、腫瘍細胞は、ヒト腫瘍細胞である。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞は、脳腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、精巣腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、子宮腫瘍細胞、頸腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、および胃腫瘍細胞から選択される。

10

【 0 0 3 7 】

また他の局面において、本発明は、C r i p t o とアクチビン B との間の相互作用をブロック可能な化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、候補の化合物の存在下における C r i p t o とアクチビン B を接触させる工程および、C r i p t o とアクチビン B との間の相互作用の変化を検出する工程を包含する。いくつかの実施形態において、化合物は、抗体である。

【 0 0 3 8 】

本発明のこれら局面および他の局面は、以下の本発明の詳細な記載において、さらに詳細に述べられている。

20

【 0 0 3 9 】

( 本発明の詳細な記載 )

本発明は、特定の C r i p t o 特異的抗体が、例えば、C r i p t o と A L K 4 との間の相互作用の阻害および / または C r i p t o とアクチビン B との間の相互作用の阻害によって C r i p t o の活性に影響し得るという発見ならびに、特定の C r i p t o 特異的抗体が、腫瘍細胞の増殖の阻害のために使用され得るという発見に基いている。これら抗体のいくつかは、天然の C r i p t o タンパク質または C r i p t o の変性型いずれかのリガンド / レセプター結合ドメイン中のエピトープに特異的に結合する。例えば、これら抗体は、E G F 様ドメイン、システインリッチドメインまたは、C r i p t o のアミノ酸 4 6 ~ 1 5 0 の長さの領域に由来するペプチド ( 例えば、約 3 アミノ酸 ~ 約 2 0 アミノ酸 ) に結合し得る。

30

【 0 0 4 0 】

腫瘍の増殖が、少なくとも部分的に C r i p t o に依存する哺乳動物の悪性腫瘍または良性腫瘍の治療において、本発明の抗体は、有用である。通常、この増殖は、正常な恒常性に必要な増殖速度を超過した異常な増殖速度を有し、同じ起源の正常な組織の増殖速度を超過している。

【 0 0 4 1 】

( I . 定義 )

この文書を通じて、種々の定義がなされている。ほとんどの言葉は、当業者によってその言葉に帰する意味を有する。以下またはこの文書中のどこかにおいて詳細に定義されている言葉は、本発明の関係で提供される意味を有し、それらは代表的に当業者によって理解される。

40

【 0 0 4 2 】

本明細書中で使用される「領域」は、生体分子の 1 次構造の物理的に隣接した部分を意味する。タンパク質の場合、領域は、そのタンパク質のアミノ酸配列での隣接した部分によって定義される。

【 0 0 4 3 】

本明細書中で使用される「ドメイン」は、生体分子の公知の機能または潜在的な機能に寄与する生体分子の構造的部分を意味する。ドメインは、領域または領域の部分と共通した広範囲を占め得る ; ドメインはまた、特定の領域の全てまたは一部に加えて、その特定

50

の領域から区別される生体分子の一部を組み込み得る。タンパク質ドメインの例として、細胞外ドメイン（C R - 1（配列番号：1）およびC R - 3（配列番号：2）を含むC r i p t oの残基約31～残基約188の長さ）ならびに膜貫通ドメイン（C R - 1およびC R - 3を含むC r i p t oの残基約169～残基約188の長さ）が挙げられるが、これらに限定されない。C r i p t oタンパク質のリガンド/レセプター結合ドメインは、C R - 1およびC R - 3を含むC r i p t oの残基約75～残基約150に及ぶ；このドメインは、例えば、C R - 1およびC R - 3を含むC r i p t oの残基約75～残基約112に及ぶE G F様ドメイン、ならびに例えば、C R - 1およびC R - 3を含む残基約114～残基約150に及ぶシステインリッチドメインを含む。本発明の多くのモノクローナル抗体は、E G F様ドメインまたはシステインリッチドメインに結合するとして同定された。さらに、モノクローナル抗体A 1 0 B 2 . 1 8（A T C C登録番号P T A - 3 3 1 1）、B 3 F 6 . 1 7（A T C C登録番号P T A - 3 3 1 2）、およびA 1 7 A 2 . 1 6は、E G F様ドメインの上流のC r i p t oのアミノ酸残基46～62の長さの領域中のドメインにおいて形成されるエピトープに結合するとして同定された。以下の実施例3を参照のこと。

10

**【0044】**

本発明の抗C r i p t o抗体が結合するエピトープは、高次構造的に天然のC r i p t oタンパク質または変性したC r i p t oタンパク質において存在し得る。加えて、エピトープは、C r i p t oポリペプチドでの近接していない配列によって形成され得る。

**【0045】**

20

本明細書中で使用される、本発明の抗体は、例えば、マウス抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又は、キメラ抗体であり得る。抗体は、任意のアイソタイプまたはサブタイプ（例えば、I g M、I g D、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g E、I g A 1およびI g A 2； 軽鎖または 軽鎖のいずれかを備える）の抗体全体（すなわち、2つの完全な長さの軽鎖および2つの完全な長さの重鎖を備える）であり得る。あるいは、本発明の抗体は、抗体全体の抗原-結合フラグメント（例えば、F a b、F（a b'）2および単鎖F v）を指す。

**【0046】**

本発明の抗体はどれも、以下で記載するように、必要に応じて化学療法と組み合わせられ得る。

30

**【0047】**

本明細書中で使用される「C r i p t oを内部移行することが可能な抗体」は、細胞表面からC r i p t oを除去する間に細胞に入る抗体を意味する。例えば、蛍光標識されたC r i p t oモノクローナル抗体の使用により、C r i p t oを内部移行することが可能なC r i p t o抗体をスクリーニングすることが可能である。どの抗体が、C r i p t o陽性細胞へ内部移行し得るのかを決定するために、蛍光顕微鏡および/または共焦点顕微鏡下で細胞を見ることによって、標識抗体の蛍光シグナルの細胞への取り込みを分析し得る。これら内部移行される抗体は、細胞質または細胞小胞における蛍光シグナルとして検出される。非限定的なC r i p t oを内部移行可能なC r i p t o抗体の例としては、A 2 7 F 6 . 1、B 3 F 6 . 1 7および1 - 1 A 4 C . 2が挙げられる。

40

**【0048】**

本明細書中で使用される「化合物」は、任意の同定可能な化学薬品又または、分子を意味する。化合物としては、イオン、原子、小さな分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチドおよび核酸が挙げられるが、これらに限定されない。このような化合物は、自然または合成であり得る。

**【0049】**

本明細書中で使用される「変調する」または「改変する」は、特定の活性または特定のタンパク質の量、質もしくは効果の上昇あるいは減少を意味する。

**【0050】**

本明細書中で使用される、「阻害する」は、特定の活性または特定のタンパク質の量、

50

質もしくは効果の減少を意味する。

【0051】

本明細書中で使用される「C r i p t oの活性を変調する」は、C r i p t oの活性の量、質もしくは効果の上昇もしくは減少を意味する。C r i p t oの活性の量、質もしくは効果における上昇または減少は、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%、であり得る。約100%より大きな上昇もまた想定される。例えば、少なくとも、約3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、もしくはさらに大きく。活性は、当該分野で公知のアッセイ（例えば、実施例3で示されているヌル細胞アッセイ）により測定され得る。いくつかの実施形態において、C r i p t oと他のタンパク質との間のタンパク質相互作用は、本発明の抗体の結合を介して阻害される。

10

【0052】

本明細書中で使用される「C r i p t oとA L K 4との間の相互作用のブロック」又は、「C r i p t oとA L K 4との間の相互作用の変調」は、相互作用（すなわちC r i p t oとA L K 4との間の結合）の上昇または減少を意味する。相互作用における上昇または減少は、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%、であり得る。約100%より大きな上昇もまた想定される。例えば、少なくとも、約3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、もしくはさらに大きく。実施例8で示されている結合アッセイの様に、当該分野で公知のアッセイによって活性は測定され得る。

20

【0053】

本発明中で使用される「C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用のブロッキング」または「C r i p t oとアクチビンBとの間の相互作用の変調」は、相互作用（すなわちC r i p t oとアクチビンBとの間の結合）の上昇または減少を意味する。相互作用における上昇または減少は、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%、であり得る。約100%より大きな上昇もまた想定される。例えば、少なくとも、約3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、もしくはさらに大きく。実施例11で示されている結合アッセイの様に、当該分野で公知のアッセイによって活性は測定され得る。

【0054】

本発明中で使用される「インビトロにおける腫瘍細胞の増殖の変調」は、インビトロでの腫瘍細胞の数における上昇または減少を意味する。腫瘍細胞の数における上昇または減少は、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%、であり得る。約100%より大きな上昇もまた想定される。例えば、少なくとも、約3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、もしくはさらに大きく。インビトロでの腫瘍細胞増殖の変調は、実施例4で示されているG E O細胞軟寒天アッセイの様に、当該分野で公知のアッセイによって測定され得る。

30

【0055】

本明細書中で使用される「インビボにおける腫瘍細胞の増殖の変調」は、インビボでの腫瘍細胞の数、血管形成、および/または転移における減少を意味する。腫瘍細胞の数における減少は、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%、であり得る。インビボでの腫瘍細胞増殖の変調は、実施例5で示されているものの様に、当該分野で公知のアッセイによって測定され得る。

40

【0056】

本明細書中で使用される「治療的効果」は、異常な状態の阻害を意味する。治療的効果は、異常な状態の1つ以上の症状をいくらか軽減する。異常な状態の処置に関して、治療的効果は、以下の1つ以上をいう：（a）細胞の増殖、成長および/または分化における増加もしくは減少；（b）細胞死の阻害（すなわち、遅延または停止）もしくは促進（すなわち、上昇もしくは開始）；（c）変性の阻害；（d）異常な状態に関する1つ以上の

50

症状のいくらかの軽減；および（e）細胞集団の機能の増強。異常な状態に対して効力を示す化合物は、本明細書中で記載されているように同定され得る。

【0057】

本明細書中で使用される「投与」は、生物の細胞または組織に化合物を組み込む方法を意味する。生物の細胞もしくは組織が生物内（インビボ）または生物の外（エキソビボ）で存在する場合に、異常な状態は、予防もしくは処置され得る。生物の外に存在する細胞は、細胞培養皿もしくは、他の生物において維持または増殖され得る。生物内に存在する細胞については、当該分野において化合物を投与するための多くの技術が存在する。この技術には、経口、非経口、経皮、注射、およびエアロゾル適用が挙げられるがこれらに限定されない。生物体外の細胞については、当該分野において、化合物を投与する多くの技術が存在する。この技術には、細胞マイクロインジェクション技術、形質転換技術およびキャリア技術が挙げられるが、これらに限定されない。当該分野で公知の多くの様式（例えば、経口、静脈内、腹腔内、筋内など）によって投与は達成され得る。インビボの治療に使用される際、本発明の抗体は、患者に有効な量で投与される。本明細書中で使用される「有効な量」は、有益な臨床結果または所望する臨床結果をもたらすのに十分な量である（すなわち、患者の腫瘍の負担を排除するもしくは、減少される量）。有効な量は、1回以上の投与において投与され得る。本発明の目的のためには、有効な量の本発明の抗体は、C r i p t oまたはアクチビンB関連の疾患の状態（特に、C r i p t oもしくは、アクチビンBに関する腫瘍）の発生の改善、安定化、予防、または遅延するために十分な量である。

10

20

【0058】

代表的な処置レジメンの1例として、週間スケジュールにおける本発明の抗体の静脈内注入による約2～5mg/kgの投与量の投与が挙げられる。患者が入院を必要としない限り、この抗体は、外来患者の化学注入単位で投与される。当該分野で公知の他の投与レジメンも含まれる。

【0059】

生物へのシグナル伝達経路において異常を有する細胞群への本発明の抗体の投与によって、異常な状態は、予防もしくは処置され得る。その生物機能における化合物投与の効果は、その後、モニターされ得る。好ましくは、生物はヒトである。

【0060】

本明細書中で使用される「C r i p t o過剰発現」は、正常な組織または細胞のC r i p t o発現よりも統計学的に有意な量、多く発現している（例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、もしくは少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、または10倍）組織または細胞によるC r i p t oの発現を意味する。

30

【0061】

本発明所中で使用される「化学療法薬」は、腫瘍増殖の阻害、阻害された腫瘍増殖の維持および/もしくは、緩解の誘発において治療的效果を有すると当該分野で同定されている任意の薬物（例えば、天然の化合物、合成化合物、タンパク質、改変されたタンパク質および放射活性化合物）を意味する。化学療法薬には、本発明の抗体に結合され得る薬あるいは、抗体に結合されること無く、本発明の抗体と組み合わせて使用され得る薬が挙げられる。本発明の抗体へ結合され得る代表的な化学療法薬には、放射性結合体（ $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{99}\text{mTc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{186}\text{Rh}$ など）、腫瘍活性化プロドラッグ（メイタンシノイド（maytansinoid）、CC-1065アナログ、クリチエアミシン（Clicheamicin）誘導体、アントラサイクリン、ピンカアルカロイドなど）、リシン、ジフテリア毒およびシュードモナス外毒素が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0062】

化学治療薬剤は、本発明の抗体へ結合されるよりも、本発明の抗体と組み合わせて（すなわち、非結合体化学療法薬）使用され得る。これには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プラチナ（すなわち、シスプラチナ）、アントラサイクリン、ヌクレオシ

50

ドアナログ（プリンおよびピリミジン）、タキサン、カンプトテシン、エピポドフィロトキシシン（epipodophyllotoxin）、DNAアルキル化因子、葉酸アンタゴニスト、ピンカルカロイド、リボヌクレオチドレダクターゼインヒビター、エストロゲンインヒビター、プロゲステロンインヒビター、アンドロゲンインヒビター、アロマターゼインヒビター、インターフェロン、インターロイキン、モノクローナル抗体、タキソール、カンプトサー（camptosar）、アドリマイシン（ドックス）、5-FUおよびゲムシタビン（gemcitabine）。このような、化学療法薬は、抗体および非結合体化学療法薬の付属的な投与による本発明の抗体と組み合わせての本発明の実行に使用され得る。

#### 【0063】

10

本明細書中で使用される「薬学的に受容可能キャリアまたは賦形剤」は、当該分野で公知の生物学的に不活性な化合物を意味し、本発明の抗体の投与において使用される。受容可能なキャリアは、当該分野において周知であり、例えば、Gennaro, 編集, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing CO., 1990に記載されている。受容可能なキャリアには、生体適合性な塩、不活性な塩または生体吸収性な塩、緩衝化因子、オリゴ糖または多糖、ポリマー、ヒアルロン酸といった粘弾性の化合物、増粘性因子、防腐剤などが挙げられる。

#### 【0064】

##### （II. 本発明の抗体）

本発明の抗体は、Crip toに特異的に結合する。本明細書中で使用される、Crip toは、CR-1Crip toタンパク質、CR-3Crip toタンパク質およびそれらのフラグメントを含む。このようなフラグメントは、細胞外ドメインまたは細胞内ドメイン、EGF様ドメイン、システインリッチドメイン、レセプター結合ドメインなどの全体のドメインであり得る。このようなフラグメントはまた、Crip toタンパク質の任意のドメインでの近接するエピトープおよび近接しないエピトープを含み得る。Crip toに対して特異的な抗体を産生するために使用される抗原の例としては、CR40（配列番号：3）、CR41（配列番号：4）、CR43（配列番号：5）、CR44（配列番号：6）、CR49（配列番号：7）、CR50（配列番号：8）およびCR51（配列番号：9）、これらのアミノ酸配列は、実施例2において提供されている）が挙げられ、これらに限定されない。

20

30

#### 【0065】

CR-1の188アミノ酸配列は、以下の通りである（配列番号：1）：

MDCRKMARFSYSVIWIMAI SKVFE LGLVAGLG HGEFARPS  
RGYLA FRDDSIWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQH SKE LNR  
TCC L N G G T C M L G S F C A C P P S F Y G R N C E H D V R K E N C G S V P H  
D T W L P K K C S L C K C W H G Q L R C F P Q A F L P G C D G L V M D E H L V A  
S R T P E L P P S A R T T T F M L V G I C L S I Q S Y Y

CR-3の188アミノ酸配列は、以下の通りである（配列番号：2）：

MDCRK MVRFSYSVIWIMAI SKAFELGLVAGLG HGEFARPS  
RGDLA FRDDSIWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQH SKE LNR  
TCC L N G G T C M L E S F C A C P P S F Y G R N C E H D V R K E N C G S V P H  
D T W L P K K C S L C K C W H G Q L R C F P Q A F L P G C D G L V M D E H L V A  
S R T P E L P P S A R T T T F M L A G I C L S I Q S Y Y

40

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、Crip toのEGF様ドメイン中のエピトープに結合する。このEGF様ドメインは、成熟Crip toタンパク質のアミノ酸残基およそ75～アミノ酸残基およそ112に及ぶ。このEGF様ドメイン中のエピトープは、アミノ酸残基の線状または非線状の広がり（span）を含み得る。線状エピトープの例としては、残基およそ75～85、80～90、85～95、90～100、95～105、100～110、または105～112が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、EGFドメイン中のエピトープは、変性Crip to

50



o タンパク質に対して立体配置的にネイティブであるC r i p t oタンパク質中で形成されるエピトープである。

【0066】

他の実施形態において、本発明の抗体は、C r i p t oのシステインリッチなドメイン中のエピトープに結合する。このシステインリッチなドメインは、成熟C r i p t oタンパク質のアミノ酸残基およそ114～アミノ酸残基およそ150に及ぶ。このシステインリッチなドメイン中のエピトープは、アミノ酸残基の線状または非線状の広がりを含み得る。線状エピトープの例としては、残基およそ114～125、120～130、125～135、130～140、135～145、または140～150が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、このシステインリッチなドメイン中のエ

10

【0067】

一旦抗体が生成されると、C r i p t oへのその抗体の結合が、当該分野で公知の標準的技術（例えば、E L I S A）を使用してアッセイされ得、一方で、細胞表面上のC r i p t oの存在が、実施例2に示されるように、フローサイトメトリー（F A C S）を使用してアッセイされ得る。このような結合を測定する他の任意の技術が、別に使用され得る。

【0068】

本発明は、C r i p t oまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体（例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、二官能性抗体/二重特異的抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体ならびに相補性決定領域（C D R）移植抗体（本発明のポリペプチドを特異的に認識するC D R配列を含む化合物を含む）を提供する。用語「特異的」および「選択的」とは、本発明の抗体の結合を記載するために使用される場合、本発明の抗体の可変領域がC r i p t oポリペプチドを認識しこのC r i p t oポリペプチドに結合することを、示す。本発明の特異的抗体はまた、他のタンパク質（例えば、S . a u r e u sタンパク質AもしくはE L I S A技術における他の抗体）に、それらの抗体の可変領域外の配列（特に、その分子の定常領域中の配列）との相互作用を介して、相互作用し得ることが、理解される。

20

【0069】

本発明の抗体（例えば、リガンド/レセプター結合ドメインまたはアミノ酸残基46～62に及ぶドメインのエピトープに特異的に結合する抗体）の結合特異性を決定するためのスクリーニングアッセイは、当該分野で周知であり、慣用的に実施される。このようなアッセイの包括的考察について、Harlowら編、Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), 第6章を参照のこと。C r i p t oタンパク質のフラグメントを認識して結合する抗体もまた、含まれるが、但し、その抗体は、C r i p t oポリペプチドに特異的である。本発明の抗体は、当該分野で周知の任意の方法を使用して生成され得、慣用的に実施され得る。

30

【0070】

いくつかの実施形態において、本発明は、C r i p t oのリガンド/レセプター結合ドメイン中のエピトープに特異的に結合する抗体を提供する。抗体特異性は、以下により詳細に記載される。しかし、以前に文献に記載された他のポリペプチドから生成され得、かつC r i p t oと（例えば、両方のポリペプチド中の類似するエピトープの偶発的存在に起因して）偶発的に交差反応し得る、抗体が、「交差反応性」抗体と考えられることが、強調されるべきである。このような交差反応性抗体は、C r i p t oにとって「特異的」である抗体ではない。抗体がC r i p t oのエピトープに特異的に結合するか否かの決定は、当該分野で周知であるいくつかのアッセイ（例えば、ウェスタンブロッティングアッセイ）のいずれかを使用して、なされる。C r i p t oを発現する細胞を同定するため、そしてまたC r i p t oリガンド/レセプター結合活性を阻害するために、C r i p t o

40

50

タンパク質の細胞外エピトープ（すなわち、その細胞外で見出される C r i p t o タンパク質の部分）に特異的に結合する抗体が、特に有用である。

【 0 0 7 1 】

本発明はまた、ポリクローナル抗体を含む無細胞組成物を提供し、その抗体のうちの少なくとも 1 つは、本発明の抗体である。動物から単離された抗血清は、例示的組成物であり、水、または別の希釈剤、賦形剤、もしくはキャリア中に再懸濁された抗血清の抗体画分を含む組成物もまた、例示的組成物である。

【 0 0 7 2 】

他の実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対する。さらに、代表的には、異なるエ  
10  
ピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、その抗原上の単一の決定基に対する。モノクローナル抗体は、抗原 - 抗体結合を使用する診断アッセイ法および分析アッセイ法の選択性および特異性を改善するために、有用である。モノクローナル抗体の別の利点は、モノクローナル抗体が、培養細胞（例えば、ハイブリドーマ）によって合成され得、他の免疫グロブリンが非混入であり得ることである。そのような抗体を生成する組換え細胞およびハイブリドーマもまた、本発明の局面として意図される。これもまた下記を参照のこと。

【 0 0 7 3 】

なお他の関連する実施形態において、本発明は、C r i p t o に特異的である抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体を提供する。抗イディオタイプ抗体のより詳細な考察  
20  
について、例えば、米国特許第 6 , 0 6 3 , 3 7 9 号および同第 5 , 7 8 0 , 0 2 9 号を参照のこと。

【 0 0 7 4 】

抗体は、化学的にかまたは組換え技術によって単離され得る、比較的小さい抗原結合ドメインを含む。そのようなドメインは、それ自体が有用な C r i p t o 結合分子であり、そしてまた、ヒト抗体中に再導入され得るか、または化学療法剤もしくはポリペプチドに融合され得る。従って、なお別の実施形態において、本発明は、C r i p t o 特異的抗体のフラグメントを含むポリペプチドを提供し、そのフラグメントおよび関連分子（存在する場合）は、この C r i p t o に結合する。非限定的例として、本発明は、単鎖抗体および C D R 移植抗体である、ポリペプチドを提供する。C D R 移植抗体のより詳細な考察に  
30  
ついて、例えば、米国特許第 5 , 8 5 9 , 2 0 5 号および下記の考察を参照のこと。

【 0 0 7 5 】

他の実施形態において、非ヒト抗体が、当該分野で公知の方法のいずれかによってヒト化され得る。ヒト化抗体は、インビボ治療適用のために有用である。さらに、組換え「ヒト化」抗体が、合成され得る。ヒト化抗体は、抗原結合のために必要ではないアミノ酸のいくらかまたはすべてを組換え D N A 技術を使用してヒト免疫グロブリン軽鎖もしくは重鎖の対応する領域由来のアミノ酸で置換している、非ヒト動物からまず誘導される抗体である。すなわち、ヒト化抗体は、ほとんどヒト免疫グロブリン配列を含むキメラであり、特異的抗原結合を担う領域が、置換されている。

【 0 0 7 6 】

種々の形態の抗体が、標準的組換え D N A 技術を使用して生成され得る（W i n t e r および M i l s t e i n , 1 9 9 1 , N a t u r e 3 4 9 : 2 9 3 ~ 9 9 ）。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、周知のハイブリドーマ技術によって生成され得る。例えば、動物（例えば、マウス、ラット、またはウサギ）は、精製 C r i p t o 調製物または粗 C r i p t o 調製物、C r i p t o をコードする c D N A 構築物を用いてトランスフェクトされた細胞、C r i p t o を構成的に発現する細胞などを用いて、免疫され得る。さらに、その抗原は、精製タンパク質、細胞上で発現されるタンパク質、タンパク質フラグメントもしくはそのペプチドとして、またはそのタンパク質、タンパク質フラグメント、もしくはペプチドをコードする裸の D N A またはウイルスベクターとして、送達され得る。その後、免疫された動物の血清が、抗 C r i p t o 抗体の存在について試験される。B  
40  
50

細胞が、試験陽性の動物から単離され、ハイブリドーマが、これらのB細胞を用いて生成される。

【0077】

そのハイブリドーマにより分泌される抗体が、C r i p t oに特異的に結合するその能力（例えば、C r i p t oでトランスフェクトした細胞に結合するが、非トランスフェクト親細胞には結合しない）について、そして他の任意の望ましい特徴（例えば、望ましいC D Rコンセンサス配列を有すること、C r i p t oとA L K 4との間の結合またはC r i p t oとアクチビンBとの間の結合を阻害する（または非ブロッカーの場合には阻害しない）こと）について、スクリーニングされる。

【0078】

このスクリーニングアッセイにおいて試験陽性であるハイブリドーマ細胞が、その細胞が培養培地中にモノクローナル抗体を分泌するのを可能にする条件下で、栄養培地中で培養される。その後、馴化ハイブリドーマ培養上清が、収集され、そしてその上清中に含まれる抗体が、精製される。あるいは、望ましい抗体が、そのハイブリドーマ細胞を非免疫動物（例えば、マウス）の腹腔中に注入することによって、生成され得る。そのハイブリドーマ細胞は、腹腔中で増殖し、腹水として蓄積する抗体を分泌する。その後、その抗体は、腹腔から腹水をシリンジで回収することによって、採集され得る。

【0079】

そのモノクローナル抗体はまた、抗体コードc D N Aを望ましいハイブリドーマから単離すること、そのc D N Aで哺乳動物宿主細胞（例えば、C H O細胞またはN S O細胞）をトランスフェクトすること、そのトランスフェクト宿主細胞を培養すること、そしてその培養培地からその抗体を取り出すことによって、生成され得る。

【0080】

本発明のモノクローナル抗体はまた、同族ハイブリドーマ（例えば、マウス、ラット、またはウサギ）抗体を操作することによって、生成され得る。例えば、同族抗体は、組換えD N A技術によって、その重鎖ならびに／または軽鎖のヒンジ領域および／もしくはは定常領域のうちの一部もしくはすべてが別の種（例えば、ヒト）由来の抗体の対応成分で置換されるように、改変され得る。一般的に、その操作した抗体の可変ドメインは、その同族抗体の可変ドメインと同一または実質的に同一のままである。そのような操作抗体は、キメラ抗体と呼ばれ、そのヒンジ領域および／または定常領域が起源とする種（例えば、ヒト）の個体に投与された場合、その同族抗体よりも抗原性が小さい。キメラ抗体を生成する方法は、当該分野で周知である。ヒト定常領域は、I g G 1由来の領域およびI g G 4由来の領域を含む。

【0081】

本発明のモノクローナル抗体はまた、完全ヒト抗体を含む。その完全ヒト抗体は、B o e r n e r ら、1991、J . I m m u n o l . 147 : 86 ~ 95により記載されるようなインビトロ刺激（p r i m e d）ヒト脾細胞を使用してか、または例えば米国特許第6,300,064号に記載されるようなファージディスプレイ抗体ライブラリーを使用して、調製され得る。

【0082】

あるいは、完全ヒト抗体は、P e r s s o n ら、1991、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 88 : 2432 ~ 36 ; ならびにH u a n g およびS t o l l a r , 1991, J . I m m u n o l . M e t h o d s 141 : 227 ~ 36により記載されるようなレパートリークローニングによって、調製され得る。さらに、米国特許第5,798,230号は、ヒトB細胞からのヒトモノクローナル抗体の調製を記載し、この調製において、ヒト抗体生成B細胞は、不死化のために必要なタンパク質であるエプスタイン - バーウイルス核抗原2（E B N A 2）を発現するエプスタイン - バーウイルスまたはその誘導体の感染によって、不死化される。このE B N A 2機能は、その後、遮断され、抗体生成の増加を生じる。

【0083】

完全ヒト抗体を生成するための他のいくつかの方法は、不活化内因性 I g 遺伝子座を有し、かつ再配列していないヒト抗体重鎖および軽鎖の遺伝子についてトランスジェニックである、非ヒト動物の使用を包含する。そのようなトランスジェニック動物は、C r i p t o を用いて免疫され得、そしてハイブリドーマが、その動物由来の B 細胞から生成される。これらの方法は、例えば、ヒト I g ミニ遺伝子座を含むトランスジェニックマウスに関する種々の G e n P h a r m / M e d a r e x ( P a l o A l t o , C A ) の公開 / 特許 (例えば、米国特許第 5 , 7 8 9 , 6 5 0 号) ; X E N O M I C E <sup>T M</sup> に関する種々の A b g e n i x ( F r e m o n t , C A ) の公開 / 特許 (例えば、米国特許第 6 , 0 7 5 , 1 8 1 号、同第 6 , 1 5 0 , 5 8 4 号、および同第 6 , 1 6 2 , 9 6 3 号 ; G r e e n r a , 1 9 9 4 , N a t u r e G e n e t i c s 7 : 1 3 ~ 2 1 ; ならびに M e n d e z r a , 1 9 9 7 , N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 ~ 5 6 ) ; ならびに「トランスミク ( t r a n s o m i c ) マウスに関する種々の K i r i n ( 日本 ) の公開 / 特許 (例えば、E P 8 4 3 9 6 1、および T o m i z u k a r a , 1 9 9 7 , N a t u r e G e n e t i c s 1 6 : 1 4 3 3 ~ 4 3 ) に記載される。また、例えば、米国特許第 5 , 5 6 9 , 8 2 5 号、W O 0 0 0 7 6 3 1 0、W O 0 0 0 5 8 4 9 9、および W O 0 0 0 3 7 5 0 4 (これらはその全体が参考として本明細書中に援用される) を参照のこと。

10

#### 【0084】

本発明のモノクローナル抗体はまた、他の種由来の同族抗 C r i p t o 抗体のヒト化バージョンを含む。ヒト化抗体は、組換え DNA 技術によって生成される抗体であり、その抗体において、抗原結合に必要なではないヒト免疫グロブリン軽鎖または重鎖 (例えば、可変ドメインの定常領域およびフレームワーク領域) のアミノ酸のうちのいくらかまたはすべてが、同族の非ヒト抗体の軽鎖または重鎖由来の対応アミノ酸で置換するために使用される。例として、所定の抗原に対するマウス抗体のヒト化バージョンは、その重鎖および軽鎖の両方に、(1) ヒト抗体の定常領域 ; (2) ヒト抗体の可変ドメイン由来のフレームワーク領域 ; および (3) マウス抗体由来の C D R を有する。必要な場合、そのヒトフレームワーク領域中の 1 つ以上の残基は、マウス抗体中の対応位置の残基へと変化されて、その抗原に対するそのヒト化抗体の結合親和性が保存され得る。この変化は、時には「戻し変異 ( b a c k m u t a t i o n ) 」と呼ばれる。ヒト化抗体は、一般的には、キメラヒト抗体と比較して、ヒトにおいて免疫応答を惹起する可能性が低い。なぜなら、前者は、比較的少ない非ヒト成分しか含まないからである。

20

30

#### 【0085】

ヒト化抗体を生成するための方法は、例えば、W i n t e r , E P 2 3 9 4 0 0 ; J o n e s r a , 1 9 8 6 , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 ~ 2 5 ; R i e c h m a n n r a , 1 9 8 8 , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 ~ 2 7 ( 1 9 8 8 ) ; V e r h o e y e n r a , 1 9 8 8 , S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 ~ 3 6 ; Q u e e n r a , 1 9 8 9 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 1 0 0 2 9 ~ 3 3 ; 米国特許第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号 ; および O r l a n d i r a , 1 9 8 9 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 3 8 3 3 ~ 3 7 に記載される。また、例えば、P C T 特許出願番号 9 4 / 0 4 6 7 9 も参照のこと。霊長類化抗体は、霊長類 (例えば、アカゲザル、ヒビ、およびチンパンジー) 抗体遺伝子を同様に使用して、生成され得る。その後、さらなる変化が、その抗体フレームワーク中に導入されて、親和性または免疫原性が調節され得る。例えば、米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、および同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号を参照のこと。

40

#### 【0086】

一般的には、ヒト抗体上へのマウス (または他の非ヒト) C D R の移植は、以下のように達成される。重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインをコードする c D N A が、ハイブリドーマから単離される。その可変ドメイン ( C D R を含む ) の D N A 配列が、配列決定によって決定される。その C D R をコードする D N A は、部位特異的変異誘発によって、ヒト抗体重鎖または軽鎖の、可変ドメインコード配列の対応領域へと移される。その後

50

、望ましいアイソタイプ（例えば、C Hについて 1、C Lについて ）のヒト定常領域遺伝子セグメントが、付加される。そのヒト化重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子が、哺乳動物宿主細胞（例えば、C H O細胞またはN S O細胞）中に共発現されて、可溶性ヒト化抗体が生成される。抗体の大規模生成を容易にするために、その抗体を発現する細胞を含むバイオリアクター中でそのようなヒト化抗体を生成すること、またはその抗体を乳汁中に発現するトランスジェニック動物（例えば、ヤギ、ウシ、またはヒツジ）を生成すること（例えば、米国特許第5,827,690号を参照のこと）が、しばしば望ましい。

#### 【0087】

時折、ヒトフレームワークへのC D Rの直接転移は、生じる抗体の抗原結合親和性の喪失をもたらす。これは、いくつかの同族抗体においては、そのフレームワーク領域中の特定のアミノ酸がそのC D Rと相互作用することによって、その抗体の全体的抗原結合親和性に影響するからである。このような場合、「戻し変異」（前出）が、アクセプター抗体のフレームワーク領域中に導入されて、その同族抗体の抗原結合活性が保持されるべきである。

10

#### 【0088】

戻し変異を生成する一般的アプローチは、当該分野で公知である。例えば、Queenら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029~33、Coら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869~73、およびWO90/07861 (Protein Design Labs Inc.) は、2つの重要な工程を含むアプローチを記載する。まず、ヒトVフレームワーク領域が、同族マウス抗体のV領域フレームワークとの最適なタンパク質配列相同性についてコンピューター分析によって選択される。その後、そのマウスV領域の3次構造が、コンピューターによってモデル化されて、マウスC D Rと相互作用する可能性があるフレームワークアミノ酸残基が可視化され、その後、これらのマウスアミノ酸残基が、相同なヒトフレームワーク上に重層される。

20

#### 【0089】

この2工程アプローチのもとで、ヒト化抗体を設計するためのいくつかの基準がある。第1の基準は、ヒトアクセプターとして、特定のヒト免疫グロブリン（これは通常、非ヒトドナー免疫グロブリンと相同である）由来のフレームワークを使用すること、または多くのヒト抗体由来のコンセンサスフレームワークを使用することである。第2の基準は、ヒトアクセプター残基が異常であり、かつドナー残基がフレームワークの特定の残基においてヒト配列に典型的である場合、アクセプターではなくドナーアミノ酸を使用することである。第3の基準は、C D Rにすぐ隣接した位置におけるアクセプターではなくドナーフレームワークアミノ酸残基を使用することである。

30

#### 【0090】

当業者は、例えば、Termpest, 1991, Biotechnology 9:266-71に記載されるような異なるアプローチを使用し得る。このアプローチのもとで、NEWM由来のV領域フレームワーク、ならびにREI重鎖および軽鎖は、それぞれ、マウス残基の放射状の導入を伴うことなく、C D Rグラフト化のために使用される。このアプローチを使用する利点は、NEWMおよびREI可変領域の三次元構造が、X線結晶分析から分かり、したがって、C D RとV領域フレームワーク残基との間の特異的相互作用が容易にモデリングされ得ることである。

40

#### 【0091】

本発明のヒト化抗体は、重鎖の1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7または8個）の特定の位置において、変異（例えば、欠失、置換または付加）を含み、その結果、この抗体のエフェクター機能（例えば、この抗体がFcレセプターまたは相補因子に結合する能力）が、この抗体がC r i p t oに結合する能力に影響を与えることなく変化する（米国特許第5,648,260号）。これらの重鎖位置としては、残基234、235、236、237、297、318、320および322（EU番号付けシステム）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ヒト化抗体は、その重鎖に、突然変異L23

50

4 A (すなわち、未改変抗体の234位におけるロイシンのアラニンでの置換)、および L235A (EU番号付けシステム)を含み得る。

【0092】

さらに、本発明のヒト化抗体は、グリコシル化のための部位であるアミノ酸残基において、突然変異(例えば、欠失または置換)を含みえ、その結果、このグリコシル化部位が排除される。このような抗体は、そのC r i p t o結合親和性を維持しつつ、減少したエフェクター機能または他の所望しない機能を有するために、臨床的に有益であり得る。グリコシル化部位の突然変異もまた、プロセス開発(例えば、タンパク質の発現および精製)のために有益であり得る。例えば、この抗体の重鎖は、突然変異N297Q (EU番号付けシステム)を含みえ、その結果、この重鎖は、もはやこの部位でグリコシル化されない。

10

【0093】

さらに他の実施形態において、本発明の抗体の重鎖および/または軽鎖は、C r i p t oへの結合に対する親和性を増加し、それによりC r i p t o媒介性障害を処置するための効力を増加する突然変異を含む。

【0094】

本発明のモノクローナル抗体は、所望機能を実施するかまたは増大させるほかの部分を含み得る。例えば、この抗体は、抗体によって標的化される細胞を殺傷するために毒性部分(例えば、破傷風毒素またはリシン)または放射性核種(例えば、<sup>111</sup>Inまたは<sup>90</sup>Y)を含み得る(例えば、米国特許第6,307,026号を参照のこと)。この抗体は、単離または検出を容易にするための部分(例えば、ビオチン、蛍光部分、放射活性部分、ヒスチジンタグまたは他のペプチドタグ)を含み得る。この抗体はまた、その血清半減期を延長し得る部分(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)部分)、および免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーまたはそのフラグメント(例えば、ヒトIgG1重鎖定常領域の一部(例えば、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域))を含み得る。

20

【0095】

抗体フラグメントおよび一価の抗体もまた、本発明の方法および組成物で使用され得る。一価の抗体は、第2の重鎖のFc(またはステム)領域に結合した重鎖/軽鎖ダイマーを含む。「Fab領域」とは、重鎖のY分枝部分を含む配列に対して、および軽鎖全体に対してほぼ等価であるかまたは類似しており、かつ一緒になって(凝集体で)抗体活性を示すことが示されている鎖の部分を用いる。Fabタンパク質は、1つの重鎖および1つの軽鎖(一般的に、Fab'として知られている)の凝集体、ならびに四量体を含み、この四量体は、上記のいずれかが共有結合で凝集していても非共有結合で凝集していても、この凝集が特定の抗原または抗原ファミリーと特異的に反応し得る限りは、抗体Yの2つの分枝セグメント(一般に、F(ab)2として公知)に対応する。

30

【0096】

(III. シグナル調節)

本発明の抗体は、C r i p t o活性および/またはC r i p t oとそのリガンドとの相互作用を阻害し得る。C r i p t o活性の過剰発現は、脱分化状態促進間葉細胞特性、増殖の増加、および細胞移動(Salomonら., 1999, BioEssays 21: 61-70; Ciardielloら., 1994, Oncogene 9: 291-98; および Baldassarreら., 1996, Int. J. Cancer 66: 538-43)、新生物形成において見られる細胞形質転換に関連した表現型をもたらす。

40

【0097】

C r i p t o抗体の活性およびC r i p t o活性を阻害するその能力を試験する1つの方法は、F9-C r i p t oノックアウト(KO)細胞株を用いることである(Mnchiottiら., 2000, Mech. Dev. 90: 133-42)。C r i p t oは、Smad2リン酸化およびXenopus胚における転写因子FASTを刺激し、そし

50

てこの転写因子FASTの活性は、FAST調節エレメント-ルシフェラーゼレポーター遺伝子由来のルシフェラーゼ活性を測定することによってモニタリングされ得る(Saijohら, 2000, Mol. Cell 5: 35-47)。F9-Cripto KO細胞は、Crypto遺伝子においてヌル突然変異を有し、かつCrypto依存性シグナル伝達を伝達し得ない(Minchiottiら、前出)。Crypto活性は、F9-Cripto KO細胞をCrypto、FAST、およびFAST調節エレメント-ルシフェラーゼ遺伝子構築物でトランスフェクトすることによって、F9-Cripto KO細胞において評価され得る。Crypto依存性FASTルシフェラーゼ活性は、Crypto cDNAおよびFAST cDNAがこれらの細胞にトランスフェクトされない限り、これらの細胞において見出されない。Crypto依存性Nodalシグナル伝達をブロックし抗体、Crypto活性をブロックする抗体である。 10

#### 【0098】

Criptoの活性を測定し得る他のアッセイ(例えば、軟質寒天アッセイ)が、当業者によって使用され得る(例えば、以下の実施例4を参照のこと)。軟質寒天で細胞が増殖する能力は、細胞形質転換に関連し、そしてそのアッセイは、腫瘍細胞増殖の阻害を測定するための古典的インビトロアッセイである。活性の阻害を決定するのに有用な他のアッセイとしては、プラスチック上のインビトロアッセイなどが上げら得る。

#### 【0099】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、Cryptoに結合し、そしてCrypto-アクチビンB相互作用を阻害する。本発明者らは、CryptoがアクチビンAに結合し得、かつアクチビンBシグナル伝達経路を阻害し得ることを発見した。アクチビンBは、腫瘍細胞の増殖を阻害し得る(Risbridgerら, 2001, Endocr. Rev. 222: 836-58)。アクチビンBへのCryptoの結合はまた、増殖のアクチビンB誘導性の阻害を破壊し得る。 20

#### 【0100】

抗Crypto抗体の活性およびそれがCrypto-アクチビンB相互作用を阻害する能力を試験するための1つの方法は、増殖のアクチビンB誘導性阻害のCrypto媒介性破壊を防止する抗体の能力を測定することである。1つのこのような方法は、実施例9に記載される。抗Crypto抗体がCrypto-アクチビンB相互作用を阻害する能力を直接試験するための方法は、実施例11に記載される。 30

#### 【0101】

(IV. 治療的用途)

本発明の抗体はまた、治療目的(例えば、腫瘍細胞増殖の阻害)、Cryptoを検出または定量するための診断目的、およびCryptoの精製のために有用である。

#### 【0102】

本発明のいくつかの実施形態において、Cryptoに特異的に結合し得、患者の腫瘍細胞の増殖を阻害(特に、腫瘍増殖がアクチビンBシグナル伝達の欠失または減少によって媒介される場合)する抗体が提供される。特定の実施形態において、腫瘍細胞は、脳、心臓、首部、前立腺、乳房、精巣、結腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の腫瘍細胞である。 40

#### 【0103】

他の実施形態において、Cryptoに特異的に結合し得、かつCryptoを過剰発現する腫瘍細胞を阻害する抗体が提供される。一実施形態において、この腫瘍細胞は、Cryptoを過剰発現する細胞株(例えば、脳、乳房、精巣、結腸、肺、卵巣、膀胱、子宮、頸部、脾臓および胃の癌に由来する細胞株)である。

#### 【0104】

抗Crypto抗体は、以下の実施例4に例示されるように、当業者によって使用される標準的なプロトコールに従って、強力な抗癌剤としてのインビボ活性についてスクリーニングされ得る。このようなプロトコールの例は、National Cancer Institute (NCI)によって、その「インビボ癌モデルスクリーニング」プロト 50

コール、N I H 公開番号 8 4 - 2 6 3 5 ( F e b 1 9 8 4 ) において概説されている。

【 0 1 0 5 】

本発明の他の実施形態において、本発明の抗体は、癌性腫瘍を有する患者を処置するために使用される。

【 0 1 0 6 】

本発明の抗体は、薬学的に受容可能な賦形剤と組み合わせられ、そして治療有効用量で患者に投与される。腫瘍の増殖を阻害する方法の考察については、例えば、米国特許第 6 , 1 6 5 , 4 6 4 号を参照のこと。

【 0 1 0 7 】

C r i p t o レベルの上昇またはアクチビン B レベルの低下に関連する障害に罹患した哺乳動物を処置する方法もまた包含され、ここでこの方法は、この哺乳動物に有効量の抗体（これは C r i p t o のリガンド/レセプター結合ドメイン中のエピトープ（これに限定されない）に特異的に結合する）を投与する工程を包含し、このエピトープは、C r i p t o の E G F 様ドメインまたは c y s リッチなドメインである。

【 0 1 0 8 】

C r i p t o レベルの上昇に関連した障害に罹患した哺乳動物を処置する方法もまた包含され、ここでこの方法は、この哺乳動物に有効量の抗体を投与する工程を包含し、この抗体は、C r i p t o と複合体を特異的に形成し、かつ以下からなる群から選択される抗体が指向されるエピトープに指向される：A 6 C 1 2 . 1 1、A 6 F 8 . 6 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 8 )、A 7 H 1 . 1 9、A 8 F 1 . 3 0、A 8 G 3 . 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 7 )、A 8 H 3 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 5 )、A 8 H 3 . 2、A 1 0 A 1 0 . 3 0、A 1 9 A 1 0 . 3 0、A 1 0 B 2 . 1 7、A 1 0 B 2 . 1 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 1 )、A 2 7 F 6 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 0 )、A 4 0 G 1 2 . 8 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 6 )、A 2 D 3 . 2 3、A 7 A 1 0 . 2 9、A 9 G 9 . 9、A 1 5 C 1 2 . 1 0、A 1 5 E 4 . 1 4、A 1 7 A 2 . 1 6、A 1 7 C 1 2 . 2 8、A 1 7 G 1 2 . 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 4 )、A 1 7 H 6 . 1、A 1 8 B 3 . 1 1 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 2 )、A 1 9 E 2 . 7、B 3 F 6 . 1 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 9 )、B 6 G 7 . 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 3 3 1 3 )、1 - 1 A 4 C . 2、2 - 2 C 9 . 2、2 - 3 H 9 . 2、2 - 4 E 5 . 6、2 - 4 E 1 . 3、3 - 4 E 8 . 3、3 - 3 G 1 . 1、4 - 2 F 6、4 - 3 A 7 および 4 - 1 E 2。

【 0 1 0 9 】

C r i p t o の検出による診断は、本発明の新規の抗体を使用して、標準的なアッセイによって容易に達成され、当業者は、特に種々のサンプル、培養物などの中の C r i p t o の存在を検出し得る。

【 0 1 1 0 】

本命際書中に記載の任意の目的のために、本発明の抗体を含むキットもまた企図される。一般に、本発明のキットは、抗体が免疫特異的であるコントロール抗原を含む。実施形態は、すべての試薬およびその使用のための使用書を含む。

【 実施例 】

【 0 1 1 1 】

本発明のさらなる特徴が、以下の実施例から明らかとなる。以下の実施例は、例示のみの目的のためであり、いかなる様式でも本発明の範囲を制限するように解釈されるべきではないことが理解される。

【 0 1 1 2 】

( 実施例 1 : C r i p t o の発現および精製 )

p S G S 4 8 0 と名付けた発現プラスミドを、ヒト C r i p t o タンパク質のアミノ酸残基 1 ~ 1 6 9 ( アミノ酸 1 ~ 1 6 9 ( 配列番号 1 ) ) をコードする c D N A をサブクローニングし、ベクター p E A G 1 1 0 0 中でヒト I g G<sub>1</sub> F c ドメイン ( すなわち、 「 C R ( d e l C ) - F c 」 ) と融合させることにより構築した。このベクターのより詳

10

20

30

40

50



細な説明については、米国特許出願第60/233,148号(2000年9月18日出願)を参照のこと。このベクターpEAG1100は、GIBCO-BRL Life Technologies plasmid pCMV-Sport-beta galの誘導体であり、CHO-過的トランスフェクションでのその使用が、Schiffertら、1999、Focus 21:16によって記載された。以下のように、レポーター遺伝子 - ガラクトシダーゼNotIフラグメントをプラスミドpCMV-Sport-Beta gal(カタログ番号10586-014)から除去することにより、このベクターを作製した: プラスミドをNotIおよびEcoRVで消化し、その4.38 kbのNotIベクター骨格をゲル精製して、ライゲーションした。ライゲーションしたDNAをコンピテントE. coli DH5に形質転換した。単離した単一のコロニーから、pEAG1100を所望の組換え体を含むプラスミドとして単離した。プロモーター、ポリリンカー、および転写終結シグナルを含むpEAG1100の配列を、確認した。

10

#### 【0113】

プラスミドpSGS480をCHO細胞に一過的にトランスフェクトし、この細胞を28℃で7日間増殖させた。これらの細胞および馴化培地中でのCR(del C)-Fcタンパク質の存在をウエスタンブロット分析によって試験した。ウエスタンブロット分析について、CripToトランスフェクト細胞に由来する馴化培地および細胞を、還元条件下で4~20%の勾配ゲル上でのSDS-PAGEに供し、電気泳動的にニトロセルロースに転写し、そしてCripTo融合タンパク質を、CripTo17マーペプチド(配列番号1の残基97~残基113を含む)-キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)結合体に対して惹起されたウサギポリクローナル抗血清で検出した。遠心分離して細胞を除去した後で、ウエスタンブロット分析により、CR(del C)-Fcタンパク質が、馴化培地(上澄液)中に効率的に分泌されていることが示された。この上澄液をプロテインA-セファロース(登録商標)(Pharmacia)に適用し、そして結合しているタンパク質を25 mM リン酸ナトリウム(pH 2.8)、100 mM NaClで溶出した。溶出したタンパク質を0.5 M リン酸ナトリウム(pH 8.6)で中和し、240~340 nmでの吸光度の測定値から全タンパク質含量について分析し、SDS-PAGEによって純度について分析した。溶出したタンパク質を0.2ミクロンフィルターを通して濾過し、-70℃で保存した。

20

#### 【0114】

30

(実施例2: 抗体の産生およびスクリーニング)

溶出したCR(del C)-Fcタンパク質および他のCripToポリペプチドをマウスに注射し、当業者に公知の標準的技術を使用してハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を産生する。

#### 【0115】

(A. 抗体の産生)

メスのロバートソニアン(Robertsonian)マウス(Jackson Labs)を、フロイント完全アジュバント(「FCA」; GibcoBRL 番号15721-012)で乳化した25 µgの精製ヒトCR(del C)-Fcで腹腔内に免疫した。それらをフロイント不完全アジュバント(「FIA」; GibcoBRL 番号15720-014)で乳化した25 µgのCR(del C)-Fcを2回、そしてプロテインAビーズを1回、腹腔内に(IP)ブースター投与した。血清をスクリーニングし、最後のブースター投与の3週間後に、最も良い力価を有していたマウスに、融合の3日前に50 µgの可溶性CR(del C)-Fcを腹腔内にブースター投与した。このマウスに、融合の前の日に50 µgのCR(del C)-Fcを静脈内に(IV)ブースター投与した。

40

#### 【0116】

脾臓1: ミエローマ6の比で、マウス脾臓細胞をFL653ミエローマ細胞と融合させ、選択培地において、96ウェル組織培養プレート中に1ウェルあたり100,000細胞、33,000細胞および11,000細胞でプレートした。1週間後、増殖について

50

陽性であるウェルを、FACSおよびELISAでスクリーニングした。2回の融合を実行した。

#### 【0117】

##### (B. 抗体のスクリーニング)

1回目または2回目の融合によって生じた上澄液を、最初に、Crip to (del C) の認識および/またはCrip to EGF様ドメインタンパク質についてELISAプレート上でスクリーニングした。ヒトFcエピトープを認識するモノクローナル抗体を除くために、コントロールの融合タンパク質(LT- レセプター-Fc)をELISAプレート上にコーティングした。ELISAを下の節Cに記載するように実行した。一回目の融合において、最初の上澄液をまた、精巢腫瘍細胞株NCCIT上の細胞表面Crip toタンパク質を認識するその能力について、FACSによってもスクリーニングした。2回目の融合において、2つの腫瘍細胞株、NCCITおよび乳癌系統DU4475上のCrip toを認識する上澄液の能力を、FACSによって分析した。2次的スクリーニングは、以下を試験する工程を含んでいた；一群の腫瘍細胞株上の細胞表面Crip toを認識するモノクローナル抗体上澄液の能力(結果については表1および2を参照のこと)、ヒトの乳房腫瘍および結腸腫瘍の組織切片においてヒトCrip toを免疫組織化学的に認識するモノクローナル抗体の能力、Crip to-Nodalシグナル伝達アッセイにおいてシグナル伝達を阻止するモノクローナル抗体の能力、プラスチック上またはソフトアガーアッセイにおける腫瘍細胞株の増殖を阻止する能力、および細胞表面Crip toを内在化させる能力。

10

20

#### 【0118】

##### (C. ELISA)

ELISAアッセイを以下のように実行した：

材料：

プレート：Costar high-binding Easy-wash 96 Well plate (07-200-642)

二次抗体：Pierce Gt anti-Ms IgG (H+L) - HRP (P131430)

基質：Pierce TMB Substrate Kit (34021)

停止溶液：1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

30

バッファー：

結合バッファー：0.1M NaHPO<sub>4</sub> (pH 9.0)

ブロッキングバッファー：PBS + 10% ドナー (Donor) 仔ウシ血清

洗浄バッファー：PBS + 0.1% Tween (登録商標) 20。

#### 【0119】

抗原CR (del C) - FcおよびCR - EGF - Fc、コントロールhu IgG 1融合タンパク質を結合バッファーで希釈して500 ng/mlとした。1ウェルにつき100 μlを添加し、37 °Cで1時間、または4 °Cで一晩中インキュベートした。液体をデカントし、このプレートを逆さにして乾燥するまでブロットした。次いで、1ウェルにつき250 μlのブロッキングバッファーを添加し、続いて30分間、37 °Cでインキュベートした。再度、液体をデカントし、このプレートを逆さにして乾燥するまでブロットした。上澄液を洗浄バッファーで1:50に希釈し、1ウェルにつき50 μlでプレートし、続いて、室温で1時間インキュベーションした。プレートを、1ウェルにつき250 μlの洗浄バッファーで3回激しく洗浄した。次いで、洗浄バッファーで1:10,000に希釈した二次抗体を1ウェルにつき100 μlで添加した。続いて30分間、室温でインキュベートした。次いで、プレートを1ウェルにつき250 μlの洗浄バッファーで激しく3回洗浄し、次いで、基質を1ウェルにつき100 μlで添加した。色を十分に暗くなるまで発色させ、次いで、1ウェルにつき100 μlの停止バッファーを添加し、プレートを450 nmの吸光度について読み取った。

40

#### 【0120】

50

特定の実験において、本発明者らは、 $0.1\text{ M NaHPO}_4$  (pH 9.0) 中  $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  の C r i p t o タンパク質の  $100\text{ }\mu\text{l}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で1時間インキュベートすることによって、96ウェルプレートに C r i p t o タンパク質でコーティングした。本発明者らは、プレートを P B S / 10% D C S でブロックした。本発明者らは、P B S / 0.05% T w e e n (登録商標) 20で希釈した抗体を1ウェルにつき  $50\text{ }\mu\text{l}$  で添加し、 $37^\circ\text{C}$  で1時間インキュベートした。本発明者らは、P B S / 0.05% T w e e n (登録商標) 20で洗浄し、抗マウス - H R P (P i e r c e) でプローブした。本発明者らは、T M B を添加し、 $1\text{ N H}_2\text{SO}_4$  で反応を停止し、 $450\text{ nm}$  で読み取ることによって、結合した抗体を検出した。

#### 【0121】

10

また他の実験において、本発明者らは、 $50\text{ mM}$  炭酸塩 (pH 9.5) 中  $3\sim5\text{ }\mu\text{g/ml}$  のアクチビンBまたは他のリガンドを各ウェルに  $100\text{ }\mu\text{l}$  添加することによって96ウェルプレートをコーティングした。本発明者らは、プレートを1時間、室温でインキュベートし、 $4^\circ\text{C}$  で一晩中 T B S / 1% B S A でブロックした。本発明者らは、プレートを室温でブロッキングバッファー中の C R - F c または A L K 4 - F c と共にインキュベートし、T B S T で洗浄し、抗ヒト - A P (J a c k s o n) でプローブした。本発明者らは、プレートを T B S T で洗浄し、 $10\times$  基質バッファー ( $200\text{ mM}$  T r i s - H C l、 $10\text{ mM}$  M g C l<sub>2</sub>、pH 9.8) で1回洗浄し、C S P D および S a p p h i r e (A p p l i e d B i o i s y s t e m s) を添加した。

#### 【0122】

20

(D. フローサイトメトリー)

細胞表面染色およびフローサイトメトリーを以下のように使用して、C r i p t o への結合についてモノクローナル抗体をアッセイするために、C r i p t o 陽性細胞株を使用し得る：

$5\text{ mM}$  E D T A を  $37^\circ\text{C}$  で10分間用いて、 $2\text{ ml}$  の P B S を有する T 1 6 2 フラスコ中から細胞を遊離させる。血清を含有する培地で  $20\text{ ml}$  にまで量を増やして、細胞の塊を分解するために数回上下にピペッティングする。 $1200\text{ rpm}$  で5分間回転させる。 $0.1\%$  B S A を含有する P B S ( $4^\circ\text{C}$ ) (洗浄バッファー) の  $5\sim10\text{ ml}$  で細胞を洗浄する。 $1200\text{ rpm}$  で5分間回転させる。洗浄バッファーで  $4\times10^6\sim10^7/\text{ml}$  で再懸濁する。氷上で保持する。

30

#### 【0123】

染色のために抗体を調製する。精製抗体を洗浄バッファーで希釈して  $1\sim10\text{ }\mu\text{g/ml}$  にする。96ウェル L i n b r o V b o t t o m e d p l a t e (I C N 7632105) に  $50\text{ }\mu\text{l}$  の細胞を添加する。分析されるべき各細胞株についての各コントロールのための細胞を1つのウェルにプレートする。このようなコントロールのための細胞としては、抗体なし、二次抗体のみ、ハイブリドーマ培地、ポジティブコントロールの抗体上澄液 (利用可能であるか、または精製されている場合)、および I g G サブクラスコントロール (精製抗体を使用する場合) のための細胞が挙げられる。

#### 【0124】

40

分析されるべき各細胞株の各実験サンプルのための細胞を1つのウェルにプレートした。 $4^\circ\text{C}$  にした卓上遠心分離機を使用して、プレートを  $1200\text{ rpm}$  で5分間回転させる。プレートを逆にして、液体が実質的に除去されるまで振ることによって、バッファーを取り除く。ウェルに  $40\sim50\text{ }\mu\text{l}$  の抗体 (または、抗体なしのコントロールウェルおよび二次抗体のみのコントロールウェルについては洗浄バッファー) を添加する。少なくとも30分間 $\sim$ 1時間、 $4^\circ\text{C}$  でインキュベートする。プレートを  $1200\text{ rpm}$  で5分間回転させる。抗体溶液を取り除く。1ウェルにつき  $200\text{ }\mu\text{l}$  の洗浄バッファーで2回ウェルを洗浄する (各洗浄のあとには回転させる。)。バッファーを取り除く。

#### 【0125】

各ウェルの細胞を  $50\text{ }\mu\text{l}$  の (洗浄バッファー中)  $1:200$  希釈の R - P E タグ化ヤギ抗マウス I g G (F c 特異的) (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h L

50

laboratories カタログ番号 115 - 116 - 071) に再懸濁する。暗黒下で 20 分間、4 でインキュベートする。各ウェルの細胞に 150  $\mu$ l の洗浄バッファを添加する。プレートを 1200 rpm で 5 分間回転させる。1 ウェルにつき 200  $\mu$ l の洗浄バッファで 1 回洗浄する。PBS 中 1% PFA の 150  $\mu$ l 中に細胞を再懸濁する。各ウェルの内容物を別個のチューブ (5 ml Falcon ポリスチレン丸底チューブ - 352052) に移す。チューブを薄いホイルでラップする。

【0126】

次いで、チューブの内容物をフローサイトメトリーで読み取る。

【0127】

本方法によって分析した特定のモノクローナル抗体の 2 回のスクリーニングの結果、下の表 1 および 2 にまとめてある、以下の結果が得られた。ここで、第 1 の列は、ハイブリドーマのサブクローンについてつけた名称を提供し、次の 2 つの列は、ELISA スクリーニングの結果を示し、残りの列は、4 つの *cripto* 陽性細胞株についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。この結果は、平均蛍光指標 (MFI) の単位で示してある。

10

【0128】

【表 1】

表 1:

抗 *Cripto* モノクローナル抗体の特徴付け

20

ハイブリドーマ サブクローン	ATCC 寄託物番号	ELISA <i>Cripto</i> delC SupS	ELISA <i>Cripto</i> EGF様 ドメイン SupS	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
コントロール- ELISA		0.06	0.07				
コントロール- マウス Ig				14	9	37	18
A6C12.11		2.21	0.07	11	35	29	8
A6F8.6	PTA-3318	2.32	0.08	11	50	29	10
A7H1.19		2.14	0.09	14	34	27	12
A8F1.30		2.15	0.1	17	27	32	28
A8G3.5	PTA-3317	2.39	0.09	9	30	25	15
A8H3.1	PTA-3315	2.4	1.7	9	44	23	10
A8H3.2		2.54	0.07	13	13	16	14
A19A10.30		2.02	0.09	9	40	20	10
A10B2.18	PTA-3311	2.36	0.07	40	63	100	43
A27F6.1	PTA-3310	2.28	1.19	9	44	26	17
A40G12.8	PTA-3316	2.27	1.59	10	47	26	16

30

40

【0129】

【表 2】

表2:  
抗Criptoモノクローナル抗体の特徴付け

ハイブリドーマ サブクローン	ATCC 寄託物番号	ELISA Cripto delC	ELISA Cripto EGF様 ドメイン	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
コントロール- ELISA		0.05	0.05				
コントロール- マウスIg				10	6	4	6
A2D3.23		0.93	0.90	73	138	37	27
A7A10.29		1.37	0.07	75	83	33	83
A9G9.9		1.39	0.07	52	62	32	82
A15C12.10		1.42	0.06	46	55	25	93
A15E4.14		1.38	0.06	50	63	23	95
A17A2.16		1.40	0.06	76	97	41	81
A17C12.28		0.96	0.97	6	16	3	22
A17G12.1	PTA-3314	1.30	1.37	61	66	28	78
A17H6.1		1.38	0.05	35	30	5	28
A18B3.11	PTA-3312	1.36	1.38	50	42	33	65
A19E2.7		1.40	0.06	53	59	26	99
B3F6.17	PTA-3319	1.37	0.06	77	51	39	89
B6G7.10	PTA-3313	1.38	1.40	28	22	22	56
B11H8.4		1.41	0.06	59	101	39	107
B12C12.5		1.10	1.04	27	14	23	59
B15A2.6		1.40	0.06	36	44	22	59
C4A2.16		1.40	0.06	24	36	22	65

本発明者らはまた、下に示すように、CR (del C) - Fcタンパク質および領域特異的Criptoペプチドを使用する多数の別の免疫プロトコルを使用した。これらの場合において、本発明者らはまた、記載するようにハイブリドーマを産生した。CriptoペプチドをCR (del C) - Fcタンパク質に加えて、またはCR (del C) - Fcタンパク質の代わりに使用した。これらのプロトコルによって、本発明の抗体のいくつかを同定した。当業者に理解されるように、これらの実験によって、複数の多様な免疫プロトコルが、本発明の抗体を産生するために使用され得ることが示された。

#### 【0130】

1つの例示的な免疫プロトコルにおいて、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合した可溶性CR (del C) - Fc組換えタンパク質または領域特異的Criptoペプチドのいずれか50 µg、およびフロイント完全アジュバント (FCA、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO) を含む乳剤で、8週齢のメスのRBFマウス (Jackson Labs、Bar Harbor、ME) を腹腔内に (IP) 免疫した。詳細には、CR (del C) - Fcタンパク質 - KLHまたはCriptoペプチドCR40 (アミノ酸36~42; 配列番号3) - KLHを、リン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) で2 mg/mlの推定濃度に希釈した。乳化および免疫の前に、このタンパク質に等容量のFCAを添加した。乳化したCR (del C) - Fcタン

バク質 - K L HまたはC r i p t oペプチドC R 4 0 - K L Hの5 0 μ gを含む5 0 μ lを、初回の免疫のために各マウスにI P投与した。下に示すように、後の全ての免疫を、フロイント不完全アジュバント ( F I A ) またはR I B I アジュバント<sub>1, 2</sub> ( S i g m a C h e m i c a l C o . , S t , L o u i s , M O ) のいずれかを使用して同様に投与した。ブースター免疫を、2 ~ 3 週毎に投与した。1回目の免疫の前、ブースター免疫の7日後、そしてまたリンパ球細胞との融合の前に、免疫したマウスの血清サンプルを収集した。以下に示すように、E L I S A アッセイおよびフローサイトメトリーアッセイの両方を使用して、血清力価を測定した。

# 【 0 1 3 1 】

異なるC r i p t o抗原による種々の例示的な免疫プロトコールおよびそれによって同 10  
定される抗体は、以下の通りである：

# 【 0 1 3 2 】

# 【 表 3 】

抗原 1 - (C R (d e l C) -F c) :

プロトコールA :	
1°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F C A
2°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F I A
3°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F I A
4°	25 μg C R (d e l C) -F c (I V) i n P B S

20

表3:

抗C r i p t oモノクローナル抗体の特徴付け

精製された mAbs	ELISA C r i p t o d e l C	ELISA C r i p t o C F C ドメイン	LS174T MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	H727 MFI	HT3 MFI
1-1A4C.2	0.197	0.682	141	371	441	503	596
2-2C9.2	0.567	0.796	305	407	309	820	205
2-3H9.2	0.637	0.354	127	84	123	191	59
2-4E5.6	0.626	0.328	90	71	127	183	47
2-4D1.3	0.866	0.946	31	18	67	197	104
コントロール IgG	0.05	0.05	33	16	47	74	19

30

プロトコールB :	
1°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F C A
2°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F I A
3°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F I A
4°	50 μg C R (d e l C) -F c (I P) + F I A
5°	P B S 中 25 μg C R (d e l C) -F c (I V)

40

# 【 0 1 3 3 】

【表 4】

抗原 2 - (CR(del C)-Fc + CR40 ペプチド ) :

プロトコールC:	
1°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4°	50 µg A10B2-KLH (IP) + FIA
5°	50 µg A10B2-KLH (IP) + FIA

10

表4:

抗Criptoモノクローナル抗体の特徴付け

ハイブリドーマサブクローン	ELISA Cripto delC	ELISA Cripto CFC ドメイン	LS174T MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	H727 MFI	HT3 MFI
3-4E8.3	0.6	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
3-3G1.1	0.5139	0.9206	298	97	1099	677	1538
コントロール IgG	0.05	0.05	33	17	88	19	10

20

ND = 決定せず

抗原 3 - (CR(del C)-Fc + LS174 T 腫瘍膜調製):

preparation):

30

プロトコールD:	
1°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4°	~50 µg LS174T Cripto (IP) + RIBI

40

【 0 1 3 4 】

【表 5】

表 5:  
抗Cryptoモノクローナル抗体の特徴付け

ハイブリドーマ サブクローン	ELISA Crypto delC	ELISA Crypto CFC ドメイン	H727 MFI	HT3 MFI
4-2F6	1.915	0.1145	19	5
4-3A7	0.1286	0.1186	49	5
4-1E2	0.13	0.3	53	24
コントロール IgG	0.05	0.05	8	5

10

抗原 4 - ( x = K L H に結合体化したペプチドの数 ; 本発明者らはまた、例えば、プロトコール C において記載されたように C R ( d e l C ) - F c により予め免疫されたマウスに K L H と結合体化したペプチドを注入する ) :

本発明者らが使用した例示的な C R x ペプチドの配列および全長 C r i p t o タンパク質におけるそれらの位置は、以下の通りである :

C R 4 0 = F R D D S I W P Q E E P A I R P R ( a a 4 6 - 4 2 , A 1 0 . B 2 ; 配列番号 : 3 )

20

C R 4 1 = C P P S F Y G R N C E H D V R K E ( a a 9 7 - 1 1 3 ; 配列番号 : 4 )

C R 4 3 = G S V P H D T W L P K K C ( a a 1 1 6 - 1 2 8 ; 配列番号 : 5 )

C R 4 4 = S L C K S W H G Q L R C F P Q ( a a 1 2 9 - 1 4 3 ; 配列番号 : 6 )

C R 4 9 = アセチル化 N - S F Y G R N C E H D V R R E N C G S V P H D T W L P K K - C O O <sup>-</sup> ( a a 1 0 0 - a a 1 2 7 ; 配列番号 : 7 )

C R 5 0 = アセチル化 N - L N E G T C M L G S F C A C P P S F Y G R N C E H D V R K - C O O <sup>-</sup> ( a a 8 4 - a a 1 1 2 , フコシル化領域を含む ; 配列番号 : 8 )

C R 5 1 = アセチル化 N - P H N T W L P K K C S L C K C W H G Q L R C F P Q A F L P G C D - C O O <sup>-</sup> ( a a 1 1 9 - a a 1 5 0 ; 配列番号 : 9 )

30

【 0 1 3 5 】

【表 6】

プロトコールE:	
1°	50 µg CRx-KLH (IP) + FCA
2°	50 µg CRx-KLH (IP) + FIA
3°	50 µg CRx-KLH (IP) + FIA
4°	25 µg CR(del C)-Fc (IV) (PBS中)

40

プロトコールF:	
1°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FCA
2°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
3°	50 µg CR(del C)-Fc (IP) + FIA
4°	25 µg CRx-KLH (IP) + FIA

( 実施例 3 : C r i p t o 活性の阻害についてのヌル細胞アッセイ )

50



以下は、C r i p t o 活性の阻害を評価するのに使用した F 9 C r i p t o ノル細胞シグナル伝達アッセイを記載する。

#### 【 0 1 3 6 】

第 0 日 6 ウェルのプレートに 0 . 1 % ゼラチン 2 m l / ウェルで 3 7 1 5 分間コーティングする。1 ウェルあたり  $6 \times 10^5$  F 9 C R I P T O N U L L 細胞で細胞を播種する

第 1 日 トランスフェクション：以下のサンプルの各々を 3 0 0  $\mu$  l の O p t i M e m 1 に加えて、各サンプルについての溶液 A を得る：

サンプル 1：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ F A S T レポーター c D N A および 1 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

10

サンプル 2：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g F A S T, および 1  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

サンプル 3：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o A D D 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

サンプル 4：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o, 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

サンプル 5：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o, 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

サンプル 6：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o, 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

20

サンプル 7：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o, 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

サンプル 8：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o, 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

サンプル 9：0 . 5  $\mu$  g ( N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ルシフェラーゼ, 0 . 5  $\mu$  g C r i p t o, 0 . 5 F A S T, および 0 . 5  $\mu$  g 空のベクター c D N A。

#### 【 0 1 3 7 】

溶液 B は、3 0  $\mu$  l のリポフェクタミンおよび 2 7 0  $\mu$  l の O p t i M e m 1 を含む。

#### 【 0 1 3 8 】

各サンプルについて、溶液 A と溶液 B を一緒に混合する。室温で 4 5 分間インキュベートする。2 m l / ウェルの O p t i M e m 1 でウェルを洗浄する。次の工程の直前に吸引する。

30

#### 【 0 1 3 9 】

2 . 4 m l の O p t i M e m 1 を溶液 A + B の各混合物に加え、混合し、1 . 5 m l / ウェルを加えて、ウェルを複製する。3 7 で 5 時間インキュベートする。1 . 5 m l / ウェルの D M E M および 2 0 % の F C S、2 m M G l n、P / S をウェルに加え、これらのウェルは、サンプル 1 ~ 3 を受容する。以下のように抗 C r i p t o 抗体を加える：

サンプル 4 ウェル：A 2 7 F 6 . 1, 1 0  $\mu$  g / m l ; サンプル 5 ウェル：A 2 7 F 6 . 1, 2  $\mu$  g / m l ; サンプル 6 ウェル：A 4 0 G 1 2 . 8 ; 1 0  $\mu$  g / m l , サンプル 7 ウェル：A 4 0 G 1 2 . 8 2  $\mu$  g / m l ; サンプル 8 ウェル：A 1 0 B 2 . 1 8 , 1 0  $\mu$  g / m l ; サンプル 9 ウェル：A 1 0 B 2 . 1 8 , 2  $\mu$  g / m l 。

40

#### 【 0 1 4 0 】

第 2 日 培地を除去し、細胞を P B S で洗浄 ( 2 m l / ウェル ) する。先日のように同量の C r i p t o 抗体と共に D M E M および 0 . 5 % F C S , 2 m M G l n , P / S を同じウェルに加える。

#### 【 0 1 4 1 】

第 3 日 ルシフェラーゼシグナルを現像する。P B S + C a <sup>2+</sup> および M g <sup>2+</sup> によりウェルを洗浄 ( 2 m l / ウェル ) する。L u c L i t e キット ( P a c k a r d カタログ番号 ; 6 0 1 6 9 1 1 ) を使用する。緩衝液と基質とを室温にする。光を薄暗くする。1 0 m l の緩衝液により基質を再構築する。P B S および C a <sup>2+</sup> および M g <sup>2+</sup> により 1

50

：1に希釈する。ウェルを吸引する。反復ピペッターを使用して、1ウェルあたり250  $\mu$ lの希釈した基質を素早く加える。溶液をかき混ぜ、96ウェル白色不透明底プレート（Falcon 35-3296）のウェルに200  $\mu$ lを移す。Winglowを使用して照度計上でプレートを読み取り、データをExcel（登録商標）にエクスポートする。

【0142】

本発明の特定の抗体によるこのアッセイの結果を以下の表3に要約する。

【0143】

【表7】

表 6：  
Cripto 活性アッセイ：  
抗Criptoモノクローナル抗体による阻害

トランスフェクトされたcDNA	抗Cripto抗体	相対発光単位
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc	なし	123
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST	なし	259
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	なし	3091
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A27F6.1 10 $\mu$ g/ml	1507
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A27F6.1 2 $\mu$ g/ml	2297
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A40G12.8 10 $\mu$ g/ml	1213
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A40G12.8 2 $\mu$ g/ml	2626
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A10B2.18 10 $\mu$ g/ml	3466
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A10B2.18 2 $\mu$ g/ml	3103

本発明者らはまた、A27F6.1抗体の他の濃度を試験した。本発明者らは、これらの細胞の培地に0.5～20 mg/mlのmab A27F6.1を加えることで、Cripto誘導性ルシフェラーゼシグナルを34～95%阻害したことを観察した（図1）。本発明者らはまた、本発明の他の抗体を試験し、mab A6C12.11およびmab A8G3.5はまた、シグナル生成を阻害したことを観察した。

【0144】

代替のアッセイ系として、本発明者らは、NCCIT細胞におけるFAST/(N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-luc活性の阻害について本発明のCripto特異的mabを試験した。NodalおよびALK4の異所性発現が、レポーター活性化に対してこれらの細胞において必要であることを除いて、これらのアッセイはF9細胞についてのアッセイと同様であった。本発明者らは、mab A27F6.1が、2  $\mu$ g/mlおよび20  $\mu$ g/mlの両方において、これらの細胞におけるルシフェラーゼ活性を90%減少させたことを観察した（図2）。

（実施例4：腫瘍細胞増殖のインビトロ阻害についてのアッセイ）

Cripto活性の阻害はまた、軟寒天におけるGEO細胞の増殖を測定することによってアッセイされ得る。例えば、Ciardielloら、1994、Oncogene 9:291-98；Ciardielloら、1991、Cancer Res. 51:1051-54を参照のこと。

【0145】

本発明者らは、3%のバクトアガー（bacto agar）を融解し、水浴中で42に維持した。本発明者らは、3%のバクトアガー溶液と予め温めた完全培地とを混合し、0.6%のバクトアガーの溶液を作製して、これを42に維持した。本発明者らは、4 mlの溶液を6 cmの皿にプレーティングし、これを少なくとも30分間冷却し、底に寒天層を形成した。本発明者らは、GEO細胞をトリプシン処理し、完全培地中、10<sup>5</sup>細

10

20

30

40

50

胞 / m l に再懸濁した。本発明者らは、この細胞懸濁物にアッセイされるべき抗体、またはコントロールを加え、20  $\mu$  g から 1  $\mu$  g まで抗体を滴定した。本発明者らは、等容量の G E O 細胞懸濁物と 0 . 6 % のバクトアガーとを混合し、底にある寒天層の上面に 2 m l 重ねた。本発明者らは、プレートを少なくとも 1 時間冷却した。本発明者らは、C O <sub>2</sub> インキュベーター中で 37 、 14 日間インキュベートした。本発明者らは、顕微鏡を用いなくても確認できるコロニーをカウントした。ネガティブコントロールと比較して、コロニーが存在しないことは、試験した抗体がインビトロで腫瘍細胞増殖を阻害したことを示した。

#### 【 0 1 4 6 】

このアッセイを使用して、抗体 A 2 7 F 6 . 1 および B 6 G 7 . 1 0 について表 4 に示される結果を得、これらの両方の抗体は、G E O 細胞コロニーの増殖を減少させる能力を実証する。

#### 【 0 1 4 7 】

#### 【 表 8 】

表7:  
軟寒天アッセイにおける増殖の結果

抗体	平均コロニー数
なし	109.0
なし	104.3
A27.F6 20 $\mu$ g/ml	82.0
A27F6.1 10 $\mu$ g/ml	78.3
A27F6.1 5 $\mu$ g/ml	79.0
A27F6.1 1 $\mu$ g/ml	108.7
B6G7.10 20 $\mu$ g ml	102.3
B6G7.10 10 $\mu$ g/ml	71.7

本発明者らは、T - 4 7 D 細胞 ( A T C C ) による増殖阻害アッセイを実施し、この細胞は、実施例 9 に記載されるように非腫瘍形成性ヒト胸部癌腫である。

( 実施例 5 : 腫瘍細胞増殖のインビボ阻害についてのアッセイ )

腫瘍細胞増殖の阻害を評価するために、ヒト腫瘍細胞株を無胸腺ヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍阻害に対する相乗作用効果または相加効果を提供し得るさらなる化学療法処置の有無のもと、本発明の抗体の効果を観察する。

#### 【 0 1 4 8 】

このアッセイは、以下の異なる腫瘍細胞株を用いて代替的に実施され得る：例えば、G E O ( 十分に分化したヒト結腸癌インビトロ細胞株であり、A m e r i c a n T i s s u e T y p e C o l l e c t i o n ( A T C C ) から得られる )、D U - 4 4 7 5 ( A T C C から得られる乳癌インビトロ細胞株 )、N C C I T ( A T C C から得られる精巣腫瘍細胞株 )、または当該分野で公知の他のもの。このようなアッセイの 1 つの例を以下に記載する。

#### 【 0 1 4 9 】

動物を耳をパンチすることで個別にマーキングする。G E O 細胞株をインビトロまたはインビボで 1 ~ 4 回継代させる。動物に右側腹領域の皮下に G E O 細胞を移植する。以下の動物の群を使用し得る：

グループ番号	処置	マウスの番号
1 .	生理食塩水 コントロール , 0 . 2 m l / マウス , i . p . 1 週間に 3 回 ( M , W , F )	2 0

10

20

30

40

50

2 .	M a b , 低用量 , i . p .	1 0	
3 .	M a b , 中用量 , i . p .	1 0	
4 .	M a b , 高用量 , i . p .	1 0	
5 .	5 - F U , 3 0 m g / k g / 注 入 , i . p . , 3 R x / w k ( M , W , F )	1 0	
6 .	シスプラチン , 2 m g / k g / 注 入 , s . c . , R x / w k ( M , W , F )	1 0	
7 .	アドリアマイシン , 1 . 6 m g / k g / 注 入 , i . p . , 3 R x / w k ( M , W , F )	1 0	
8 .	イリノテカン , 1 0 m g / k g / 注 入 , i . p . , 5 R x / w k ( M - F )	1 0	10
9 .	M A b , 低用量 , i . p . + 5 - F U ( 中間用量 )	1 0	
1 0 .	M A b , 中用量 , i . p . + 5 - F U ( 中間用量 )	1 0	
1 1 .	M A b , 高用量 , i . p . + 5 - F U ( 中間用量 )	1 0	
1 2 .	M A b , 低用量 , i . p . + シスプラチン	1 0	
グループ番号	処 置	マウスの番号	
	( 中間用量 )		20
1 3 .	M A b , 中用量 , i . p . + シスプラチン ( 中間用量 )	1 0	
1 4 .	M A b , 高用量 , i . p . + シスプラチン ( 中間用量 )	1 0	
1 5 .	M A b , 低用量 , i . p . + アドリアマイシン ( 中間用量 )	1 0	
1 6 .	M A b , 中用量 , i . p . + アドリアマイシン ( 中間用量 )	1 0	
1 7 .	M A b , 高用量 , i . p . + アドリアマイシン ( 中間用量 )	1 0	30
1 8 .	M A b , 低用量 , i . p . + イリノテカン ( 中間用量 )	1 0	
1 9 .	M A b , 中用量 , i . p . + イリノテカン ( 中間用量 )	1 0	
2 0 .	M A b , 高用量 , i . p . + イリノテカン ( 中間用量 )	1 0	

第 0 日 : 腫瘍を移植し、動物の初期体重を記録する。

第 1 日 : 上記の処置を開始する。

第 5 日 : 腫瘍サイズ測定および体重測定を開始し、実験が終了するまで 1 週間に 2 回継続する。

40

#### 【 0 1 5 0 】

初期体重、腫瘍サイズおよび体重測定、屠殺のときの組織学、および腫瘍についての免疫組織化学分析を、C r i p t o 発現、腫瘍増殖、およびそれらの阻害について試験する。

#### 【 0 1 5 1 】

( 実施例 6 : インビボ異種移植片腫瘍モデル - C y s リッチブロッキング抗 C r i p t o 抗体 )

N C C I T の応答を評価するために、ヒト精巣癌腫細胞株を C r i p t o の c y s リッチドメインに結合する抗体とともに皮下的に移植した。実験方法を以下に列挙する。結果を図 3 に示す。

50

## 【0152】

(方法および材料)

動物：無胸腺ヌードマウスを使用した。耳を穿孔することによって、動物を個々に番号付けた。

腫瘍：NCCIT、縦隔混合型胚細胞ヒト精巣癌腫インビトロ細胞株(American Tissue Type Collectionから元々得られた)。細胞株を、抗生物質無しで、RPMI-1640/10%FBS中で6継代にわたって、インビトロで継代させた。動物の右側腹部に、 $5 \times 10^6$ 細胞/0.2mlマトリゲル(matrigel)で動物に皮下的に移植した。

## 【0153】

10

## 【表9】

群番号	処置	マウス数
1.	ビヒクルコントロール(25mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、pH7.2)、0.2ml/マウス、i.p.、Q14D -1日目に処置を開始する	20
2.	A8G3.5、1mg/kg/注入、i.p.、Q14D -1日目に処置を開始する	10
3.	A8G3.5、3mg/kg/注入、i.p.、Q14D -1日目に処置を開始する	10
4.	A8G3.5、10mg/kg/注入、i.p.、Q14D -1日目に処置を開始する	10
5.	シスプラチン、2mg/kg/注入、s.c.、3x/wk (M, W, F) (6回の処置について)	10

20

30

処置を1日目開始した。

## 【0154】

試験スケジュール

- 1日目：マウスをコントロール群および処置群に無作為化した。動物の初期の体重を記録した。最初の処置を抗体群に施した。投薬溶液を作製した。アッセイが終了するまで、技師に対して処置は盲検であった。

0日目：腫瘍を移植した。マウスに移植された腫瘍において細菌培養を実施した。

1日目：最初の処置をポジティブな化学療法群へ施した。

4日目：マトリゲルにおいて腫瘍ベースラインについての初期腫瘍サイズ測定を記録した。マウス2x/週で、腫瘍サイズおよび体重を記録し続けた。研究を毎日モニターし、そして動物について任意の異常な観測を記録した。

40

終点：初期体重

腫瘍サイズおよび体重測定。

## 【0155】

(実施例7：インビボ異種移植片腫瘍モデル-EGF様ドメインブロッキング抗Crip to抗体)

NCCITの応答を評価するために、ヒト精巣癌腫細胞株を、Crip toのEGF様ドメインに結合する抗体とともに皮下的に移植した。実験方法を以下に列挙する。結果を図4に示す。

## 【0156】

50

(方法および材料)

動物：無胸腺ヌードマウスを使用した。耳を穿孔することによって、動物を個々に番号付けた。

腫瘍：NCCIT、縦隔混合型胚細胞腫ヒト精巣癌インビトロ細胞株(American Tissue Type Collectionから元々得られた)。細胞株を、抗生物質無しで、RPMI-1640/10%FBS中で8継代にわたって、インビトロで継代させた。動物の右側腹部に、 $5 \times 10^6$ 細胞/0.2mlマトリゲル(matrigel)で動物に皮下的に移植した。

【0157】

【表10】

10

群番号	処置	マウス数
1.	ビヒクルコントロール(25mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、pH7.2)、0.2ml/マウス、i. p.、Q14D -1日目に処置を開始する	18
2.	A27F6. 1、1mg/kg/注入、i. p.、Q14D -1日目に2. 6mg/kg/マウスの装填用量で処置を開始する	10
3.	A27F6. 1、10mg/kg/注入、i. p.、Q14D -1日目に21. 2mg/kg/マウスの装填用量で処置を開始する	10
4.	シスプラチン、2mg/kg/注入、s. c.、3x/wk (M、W、F)(6回の処置について)	10

20

30

処置を1日目に開始した。

【0158】

試験スケジュール

- 1日目：マウスをコントロール群および処置群に無作為化した。動物の初期の体重を記録した。最初の処置を抗体群に施した。投薬溶液を作製した。アッセイが終了するまで、技師に対して処置は、盲検であった。

0日目：腫瘍を移植した。マウスに移植された腫瘍において細菌培養を実施した。細菌培養をは、サンプリングの24時間後および48時間後に、混入についてネガティブであった。

40

1日目：最初の処置をポジティブな化学療法群へ施した。

4日目：マトリゲルにおいて腫瘍ベースラインについての初期腫瘍サイズ測定を記録した。マウス2x/週で、腫瘍サイズおよび体重を記録し続けた。研究を毎日モニターし、そして動物について任意の異常な観測を記録した。

終点：初期体重

腫瘍サイズおよび体重測定。

【0159】

(実施例8：Cryptomabは、ALK4結合を調節する)

Crypto特異的モノクローナル抗体が、ALK4(アクチビンI型レセプターに結合するCryptoの能力と妨害し得るか否かを評価するために、本発明者らは、ALK4を安定に発現する293細胞株を使用して、フローサイトメトリー分析を使用した。こ

50

の細胞株を作製するために、293細胞を、HAエピトープでC末端においてタグ化されたALK4を発現するプラスミドおよびピューロマイシンを発現するプラスミドを、10:1の比で同時トランスフェクトした。次いで、トランスフェクトされた細胞をコロニーが形成されるまでピューロマイシン中で選択した。次いで、コロニーを、拾い上げ、増殖させ、そしてHAについてウェスタンブロット分析を使用して、ALK4発現について分析した。クローン21(293-ALK4-21)が、コントロールの非トランスフェクト293細胞と比較して、高レベルのALK4を発現することが見出された。

#### 【0160】

フローサイトメトリーによってCripTo-ALK4結合を分析するために、ヒトIgG(CR(delC)-Fc)のFc部分に融合したヒトCripTo(aa1~169)の精製された可溶性形態を使用した。約5 $\mu$ g/mlのCR(delC)-Fcタンパク質またはコントロールFcタンパク質を、50 $\mu$ lの合計容量のFACS緩衝液(0.1%BSAを含むPBS)中で、30分間、氷上で $3 \times 10^5$  293-ALK4-21細胞とともにインキュベートした。抗CripTo抗体を含有するサンプルについて、5 $\mu$ g/mlのCrdelC-Fcを、細胞の添加の前に、氷上で、50 $\mu$ g/mlの各CripTo抗体(A10.B2.18、A40.G12.8、A27.F6.1、A8.H3.1、A19.A10.30、A6.F8.6、A8.G3.5、A6.C12.11)とともにプレインキュベートした。次いで、細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、そして結合したFcタンパク質を、細胞をJackson ImmunoLogics製のR-フィコエリトリン結合体化ヤギ抗ヒトIgG(Fcフラグメント特異的)とともにインキュベートすることによって検出した。次いで、サンプルを再び洗浄し、PBS中1%パラホルムアルデヒド中で固定し、そして標準的フローサイトメトリー手順を使用して分析した。FACSアッセイの結果を図5に示す。

#### 【0161】

(実施例9: CripToが、乳癌細胞のアクチビンB誘導型増殖抑制を破壊する)

ATCCからの継代番号2のT47D細胞(RPMI/10%FCS/10 $\mu$ g/mlインシュリン中で維持した)に、Ecotropic Receptor(EcoR; B.Elenbaas)について発現プラスミドをトランスフェクトし、そして100 $\mu$ g/mlのハイグロマイシンを含む培地中で選択した。pBABE-GFPマウス白血病ウイルス(MLV)の感染を可能にするT-47D-EcoRのコロニーを増殖させ、pBABE-hCr-PURO-MLVにより感染させ、そしてピューロマイシン培地において選択した。このオリゴクローナル株(T-47D-hCr)を、特異的抗CripTo抗体を用いて、hCr(ヒトCripTo)発現についてFACSによって分析した。約4000細胞/ウェルのT-47D-EcoRまたはT-47D-hCrを、25ngアクチビンB(R&D)、または25ngアクチビンBおよび0.1~50 $\mu$ g/ml A8G3.5を伴う/伴わない2%血清を含有する培地中で、96ウェルプレートでプレートした。因子を伴う培地を、7~8日間、毎日交換した。20 $\mu$ l/ウェル Cell Titer Aqueous One溶液(Promega)を添加して、プレートを収集し、2時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、そして490nmで読んだ。

#### 【0162】

本発明者らは、アクチビンAまたはアクチビンBを伴うかまたは伴わない低血清濃度でT-47D細胞およびT-47D-EcoR細胞を増殖させ、そしてMTT比色アッセイを使用して細胞を増殖するためにアッセイした。本発明者らは、T-47D細胞の増殖が、未処理細胞と比較して、約40%、アクチビンAまたはアクチビンBによって阻害されたことを観察した(図6)。本発明者らはまた、T-47D-CR細胞が、アクチビンAによって阻害されたことを観察したが、T-47D-CR細胞は、アクチビンBに対して応答性ではなかったことを発見した(図6)。この結果は、これらの細胞の増殖に対するCripToの効果が、アクチビンBに特異的であることを示す。本発明者らは、未処理のT-47D細胞およびT-47D-CR細胞が、正常培地または低血清条件のいずれにおいても増殖速度が異ならなかったことをコントロール実験において観察した。

## 【0163】

次いで、本発明者らは、本発明の抗体が、C r i p t o - アクチビン B 相互作用を阻害し得るか否かを試験した。本発明者らは、本発明の種々の抗体の存在下で、アクチビン B を用いて、T - 47D - C R を処理した。本発明者らは、アクチビン B の増殖抑制活性が、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$  または  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  の m a b A 8 G 3 . 5 の存在下で回復されたことを観察した (図 7)。本発明者らは、A 27F 6 . 1 m a b が、これらの細胞のアクチビン B 増殖抑制を回復し得なかったことを観察した。

## 【0164】

(実施例 10 : C r i p t o は、アクチビン B に直接結合する)。

## 【0165】

本発明者らは、C r i p t o が、アクチビン B に直接結合することを発見した。本発明者らは、精製アクチビン B、アクチビン A、T G F  $\beta$  1、G D N F または B M P 2 を用いて E L I S A プレートにコーティングし、そして C R - F c とともにインキュベートした。次いで、本発明者らは、アルカリホスファターゼに結合体化された抗 F c 抗体を添加し、そしてアルカリホスファターゼ基質を添加しそして発色させることによって結合をモニターした。本発明者らは、C R - F c が、アクチビン B を含むウェルに結合したが、アクチビン A にも他のリガンドにも結合しなかったことを観察した (図 8)。さらに、本発明者らは、アクチビン B コーティングプレートに加える前に、溶液中のアクチビン A またはアクチビン B とともに C R - F c をプレインキュベートし、アクチビン B のみが、結合を阻害したことを観察した (図 9)。これらの結果は、C r i p t o が、アクチビン B に特異的に結合することを確認した。

## 【0166】

本発明者らはまた、B i a c o r e を使用して、C r i p t o - アクチビン B 相互作用を分析した。本発明者らは、アクチビン B が、B i a c o r e チップ上に固定された C R - F c に高い強度で直接結合するが、コントロール L T R - F c タンパク質に結合しないことを発見した (図 10)。本発明者らはまた、C R - F c に結合するアクチビン A が、無視され得ることを観察した。これらのデータは、アクチビン B が約  $1\text{nM}$  の競合形式アッセイを測定された溶液中で迅速な速度および見かけの親和性で C r i p t o に結合したことを示す。

## 【0167】

C r i p t o 抗 C F C モノクローナル抗体 2 - 2 C 9 . 2 および A 8 G 3 は、C r i p t o とアクチビン B との相互作用を調節した。これは、アクチビン B への C r i p t o の結合が、A 8 G 3 または 2 - 2 C 9 . 2 の添加によって阻害された同時免疫沈降実験によって示された。抗アクチビン B 抗体を用いる従来のウェスタンブロット技術を使用して、阻害を測定した。

## 【0168】

上記の本発明の実施形態のいくつかは、以下に概説され、これらは、以下の実施形態を含むがこれらに限定されない。当業者が理解するように、本発明の精神から逸脱することなく、本発明の種々の実施形態に対して、多くの変更および改変がなされ得る。全てのこのような変更が、本発明の範囲内に入ることが意図される。

## 【0169】

本明細書中に引用される各刊行物の開示全体が、本明細書によって参考として援用される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0170】

【図 1】図 1 は、A 27F 6 . 1 による C r i p t o 誘導性ルシフェラーゼシグナルの阻害を表す。

【図 2】図 2 は、A 27F 6 . 1 による C r i p t o 誘導性ルシフェラーゼシグナルの阻害を表す。

【図 3】図 3 は、ヒト精巣癌腫細胞株を C r i p t o の c y s リッチドメインに結合する

10

20

30

40

50



抗体とともに皮下的に移植した後の、腫瘍重量の変化を表す。

【図 4】図 4 は、ヒト精巣癌腫細胞株を C r i p t o の E G F 様ドメインに結合する抗体とともに皮下的に移植した後の、腫瘍重量の変化を表す。

【図 5】図 5 は、F A C S アッセイの結果を示す。

【図 6】図 6 は、T - 4 7 D 細胞の増殖が、未処理細胞と比較して、約 4 0 %、アクチビン A またはアクチビン B によって阻害されたことを示すグラフである。

【図 7】図 7 は、アクチビン B の増殖抑制活性が、1 0  $\mu$  g / m l または 2 0  $\mu$  g / m l の m a b A 8 G 3 . 5 の存在下で回復されたことを示すグラフである。

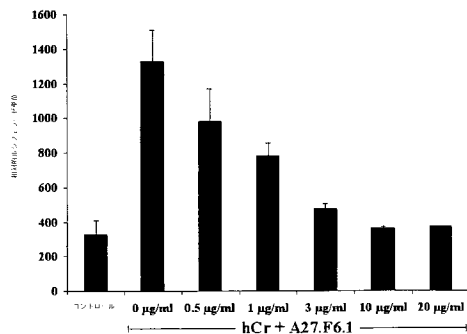
【図 8】図 8 は、C R - F c が、アクチビン B を含むウェルに結合したが、アクチビン A にも他のリガンドにも結合しなかったことを示すグラフである。

【図 9】図 9 は、アクチビン B コーティングプレートに加える前に、溶液中のアクチビン A またはアクチビン B とともに C R - F c をプレインキュベートし、アクチビン B のみが、結合を阻害したことを示すグラフである。

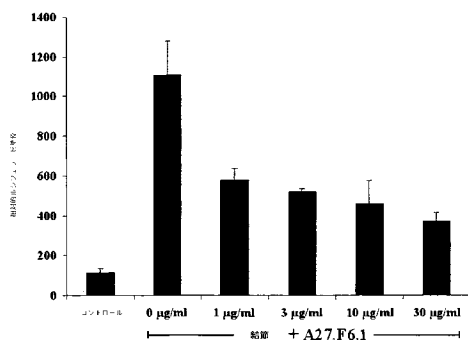
【図 1 0】図 1 0 は、アクチビン B が、B i a c o r e チップ上に固定された C R - F c に高い強度で直接結合するが、コントロール L T R - F c タンパク質に結合しないことを示すグラフである。

10

【図 1】



【図 2】



【図 3】

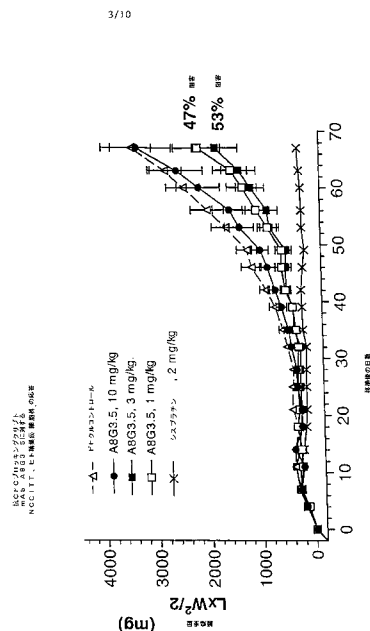
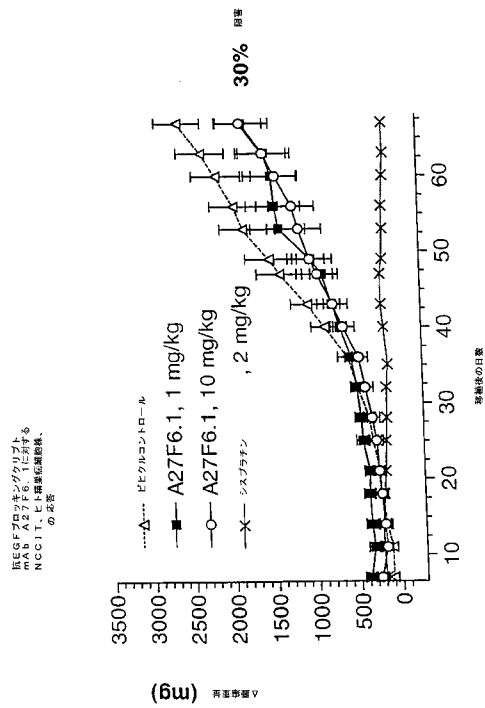
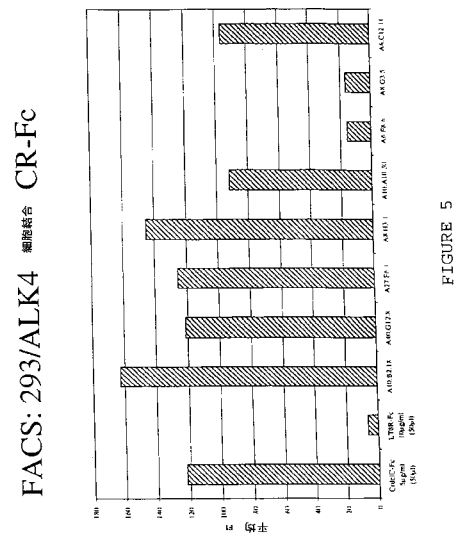


FIGURE 3

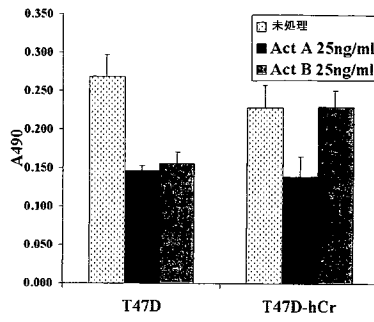
【 図 4 】



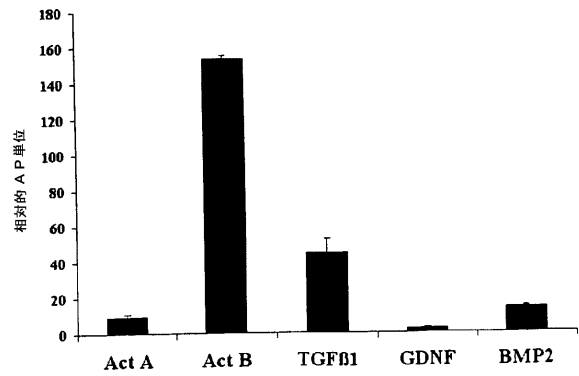
【 図 5 】



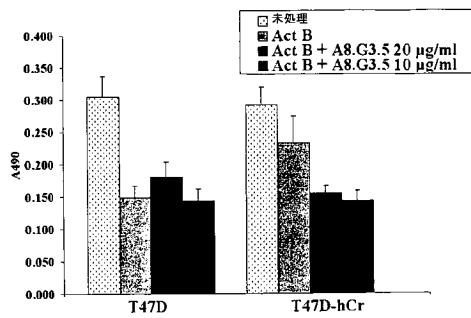
【 図 6 】



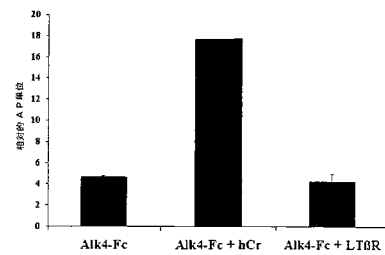
【 図 8 】



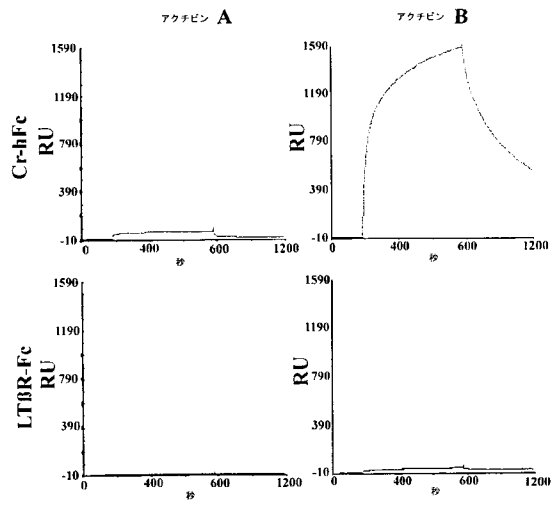
【 図 7 】



【 図 9 】



【図 10】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31462																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 38/00; C07K 16/00 US CL : 530/387.1, 387.7, 387.9, 391.3, 391.7; 530/350; 435/7.23, 7.21, 7.9; 424/130.1, 138.1, 139.1, 174.1 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) U.S. : 530/387.1, 387.7, 387.9, 391.3, 391.7; 530/350; 435/7.23, 7.21, 7.9; 424/130.1, 138.1, 139.1, 174.1 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) Please See Continuation Sheet																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>PANICO, L. ET AL. Differential Immunohistochemical Detection of Transforming Growth Factor alpha, Amphiregulin and Cripto in human normal and malignant breast tissues. Int. J. Cancer. 1996, Vol. 65, pages 51-56, especially abstract and page 52.</td> <td>1-4, 11, 12, 17, 18, 21-23, 26-29, 30, 32, 35-37, 54-56, 60, 62</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,792,616 (PERISCO et al) 11 August 1998 (11.08.98), abstract, column 5, lines 14-23 and claims.</td> <td>1-4, 11-12, 14, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 54-56, 60, 62</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,264,557 (SALOMON et al) 23 November 1993 (23.11.93), column 2, lines 25-65, column 4, lines 65-column 5 line 50.</td> <td>1-4, 11, 12, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 56, 60, 62</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,854,399 (SALOMON et al) 29 December 1998 (29.12.98), see claims</td> <td>1-4, 11-12, 14, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 56, 60, 62</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	PANICO, L. ET AL. Differential Immunohistochemical Detection of Transforming Growth Factor alpha, Amphiregulin and Cripto in human normal and malignant breast tissues. Int. J. Cancer. 1996, Vol. 65, pages 51-56, especially abstract and page 52.	1-4, 11, 12, 17, 18, 21-23, 26-29, 30, 32, 35-37, 54-56, 60, 62	X	US 5,792,616 (PERISCO et al) 11 August 1998 (11.08.98), abstract, column 5, lines 14-23 and claims.	1-4, 11-12, 14, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 54-56, 60, 62	X	US 5,264,557 (SALOMON et al) 23 November 1993 (23.11.93), column 2, lines 25-65, column 4, lines 65-column 5 line 50.	1-4, 11, 12, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 56, 60, 62	X	US 5,854,399 (SALOMON et al) 29 December 1998 (29.12.98), see claims	1-4, 11-12, 14, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 56, 60, 62			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	PANICO, L. ET AL. Differential Immunohistochemical Detection of Transforming Growth Factor alpha, Amphiregulin and Cripto in human normal and malignant breast tissues. Int. J. Cancer. 1996, Vol. 65, pages 51-56, especially abstract and page 52.	1-4, 11, 12, 17, 18, 21-23, 26-29, 30, 32, 35-37, 54-56, 60, 62																		
X	US 5,792,616 (PERISCO et al) 11 August 1998 (11.08.98), abstract, column 5, lines 14-23 and claims.	1-4, 11-12, 14, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 54-56, 60, 62																		
X	US 5,264,557 (SALOMON et al) 23 November 1993 (23.11.93), column 2, lines 25-65, column 4, lines 65-column 5 line 50.	1-4, 11, 12, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 56, 60, 62																		
X	US 5,854,399 (SALOMON et al) 29 December 1998 (29.12.98), see claims	1-4, 11-12, 14, 17-19, 21-23, 26-27, 29-30, 32, 35-37, 56, 60, 62																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Special categories of cited documents:</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Special categories of cited documents:			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Special categories of cited documents:																				
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																		
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																		
"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)	"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																		
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																			
Date of the actual completion of the international search 05 September 2003 (05.09.2003)		Date of mailing of the international search report 15 OCT 2003																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Sheela J HuiT Telephone No. 703-308-1235 <i>Della Collins for</i>																		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31462

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,650,285 (SALOMON et al) 22 July 1997 (22.07.97), see claims	1-4,11-12,14,17-19,21-23,26-27,29-30,32,35-37,56,60,62

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31462 .

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
WEST, STN  
search terms: antibod?, cripto, Activin B

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53	C 0 7 K 16/18	Z N A
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/15	Z
// C 0 7 K 14/435	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/577	B
	C 0 7 K 14/435	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 サニコラ - ナデル, ミチエル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0, ウィンチェスター, メイプル ロード 4
- (72)発明者 アドキンス, ヒーザー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, ソマービル, バッキンガム ストリート 9, アpartment 1
- (72)発明者 ミクラス, スティーブン ドナルド  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 6 8, アップトン, ハイ ストリート 7 4
- (72)発明者 レイホーン, ポウル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 3 5, フォックスボロ, ミリミチ ロード 4 8
- (72)発明者 シファー, スーザン ゲイル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, モレランド アベニュー 6
- (72)発明者 ウィリアム, ケビン ピー.  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 1 6, チャペル ヒル, バーンズ プレイス 8 3 2 6

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB50 DA36 FA26 FB01 FB03 FB05  
4B064 AG27 CA10 CA19 DA05 DA14  
4C085 AA26 BB11 CC02 DD63 DD88  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	Cripto特异的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005520566A</a>	公开(公告)日	2005-07-14
申请号	JP2003580477	申请日	2002-10-01
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司 , Emuei公司		
[标]发明人	サニコラナデルミチエル アドキンスヒーザー ミクラスステイーブンドナルド レイホーンポウル シファースーザンゲイル ウィリアムケビンピー		
发明人	サニコラ-ナデル, ミチエル アドキンス, ヒーザー ミクラス, ステイーブン ドナルド レイホーン, ポウル シファー, スーザン ゲイル ウィリアム, ケビン ピー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/435 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/30 A61K2039/505 C07K16/28 C07K2317/34 C07K2319/30		
FI分类号	C12P21/08 A61K39/395.C A61K39/395.D A61K39/395.L A61K39/395.N A61P35/00 C07K16/18.ZNA G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B C07K14/435		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB50 2G045/DA36 2G045/FA26 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 4B064 /AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/DA05 4B064/DA14 4C085/AA26 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/DD63 4C085/DD88 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/367002 2002-03-22 US PCT/US2002/011950 2002-04-17 WO		
其他公开文献	JP2005520566A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了Cripto特异性抗体或其生物功能片段及其用途。提供了结合Cripto并抑制Cripto活性的抗体。提供了结合Cripto并抑制Cripto和ALK4之间和/或Cripto和激活素B之间相互作用的抗体。还提供了结合Cripto并抑制肿瘤生长的抗体。还提供了结合Cripto , 抑制Cripto活性和抑制肿瘤生长的抗体。本发明还提供了在治疗 , 诊断和研究应用中使用这些抗体的方法。



(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	C 4 B 0 6 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 39/395	D 4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/18	A 6 1 K 39/395	L 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/15	A 6 1 K 39/395	N
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続		

(21) 出願番号	特願2003-580477 (P2003-580477)	(71) 出願人	592221528
(86) (22) 出願日	平成14年10月1日 (2002.10.1)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月22日 (2004.11.22)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031462		0 2 1 4 2、ケンブリッジ、ケンブリッジ
(87) 国際公開番号	W02003/083041		センター 1 4
(87) 国際公開日	平成15年10月8日 (2003.10.9)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/367, 002		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成14年3月22日 (2002.3.22)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	PCT/US02/11950	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成14年4月17日 (2002.4.17)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		