



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85163 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 39/395

A61P 35/00

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46

G01N 33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) КРИПТОБЛОКУЮЧІ АНТИПІЛА ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) 20031110670

(22) 17.04.2002

(24) 12.01.2009

(86) PCT/US02/11950, 17.04.2002

(31) 60/286,782

(32) 26.04.2001

(33) US

(31) 60/293,020

(32) 17.05.2001

(33) US

(31) 60/301,091

(32) 26.06.2001

(33) US

(31) 60/367,002

(32) 22.03.2002

(33) US

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) САНИКОЛА-НАДЕЛ МІКЕЛЄ, УІЛЛЬЯМС КЕ-
ВІН, ШИФФЕР СУЗАН, РЕЙХОРН ПОЛ

(73) БАЙОДЖІН АЙДЕК МА ІНК.

(56) BRANDT ET AL.: 'Identification and biological characterization of an epidermal growth factor-related protein:Cripto-1' THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 269, 24 June 1994, pages 17320 - 17328.

CICCOCODICOLA ET AL.: 'Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells' THE EMBO JOURNAL vol. 8, 1989, pages 1987 - 1991.

EBERT ET AL.: 'Cripto-1 induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent phosphorylation of AKT and glycogen synthase kinase 3beta in human cervical carcinoma cells' CANCER RESEARCH vol. 59, 15 September 1999, pages 4502 - 4505.

KANNAN ET AL.: 'Cripto enhances the tyrosin phosphorylation of she and activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in mammary epithelial cells' THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 272, 07 February 1997, pages 3330 - 3335.

BIANCO ET AL.: 'Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erb B-4 through a novel

receptor' THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 274, 26 March 1999, pages 8624 - 8629.

DUBLIN ET AL.: 'Amphiregulin and cripto overexpression in breast cancer relationship with prognosis and clinical and molecular variables', INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY vol. 7, 1995, pages 617 - 622.

SAEKI ET AL.: 'Expression of cripto-1 in human colorectal adenomas and carcinomas is related to the degree of dysplasia', INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY vol. 5, 1994, pages 445 - 451.

SAEKI ET AL.: 'Immunohistochemical detection of cripto-1, amphiregulin and transforming growth factor alpha in human gastric carcinomas and intestinal metaplasias', INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY vol. 5, 1994, pages 215 - 223.

CIARDIELLO ET AL.: 'Inhibition of Cripto expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides', ONCOGENE vol. 9, 1994, pages 291 - 298.

NORMANNO ET AL.: 'Expression of amphiregulin, Cripto-1 and heregulin-alpha in human breast-cancer cells', INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY vol. 2, 1993, pages 903 - 911.

WO A1 0063693, 26.10.2000.

US B 5264557, 23.11.1993.

(57) 1. Антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом Cripto, що знаходиться в домені, який включає амінокислотні залишки від амінокислоти 46 до амінокислоти 62 SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2.

2. Антитіло за п. 1, де антитіло зв'язує епітоп, вибраний з групи епітопів, з якими зв'язуються антитіла, які продукуються гібридомами, вибраними з групи, яка включає A10B2.18 та B3F6.17.

3. Антитіло за п. 1 або п. 2, де антитіло здатне інтерналізувати Cripto.

4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, яка включає фрагмент Fab, Fab' та F(ab)2.

5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке являє собою антитіло повної довжини.

(13) C2

(11) 85163

(19) UA

6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке являє собою однокланове антитіло.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, яке кон'юговане з хіміотерапевтичним агентом.
8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, для застосування у терапії в комбінації з некон'югованим хіміотерапевтичним агентом.
9. Антитіло за п. 7, де хіміотерапевтичний агент вибраний з групи, яка включає проліки, які активуються пухлиною, радіонуклід та токсин, вибраний з групи, яка складається з рицину, дифтеротоксину та екзотоксину *Pseudomonas*.
10. Антитіло за п. 7 або 9, де хіміотерапевтичний агент являє собою мейтанзиноїд.
11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10, яке являє собою людське антитіло.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10, яке являє собою моноклональне антитіло.
13. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10, яке являє собою олюднене антитіло.
14. Фармацевтична композиція, що містить принаймні одне з антитіл за будь-яким з пп. 1-7 та 9-13 та необов'язково носій.

15. Фармацевтична композиція за п. 14, яка додатково містить некон'югований хіміотерапевтичний агент.
16. Фармацевтична композиція за п. 14 або 15, де антитіло являє собою олюднене B3F6.17.
17. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-13 або композиції за будь-яким з пп. 14-16 для зменшення росту пухлини *in vitro*.
18. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-13 або композиції за будь-яким з пп. 14-16 для приготування фармацевтичної композиції для зменшення росту пухлини *in vivo*.
19. Застосування за п. 17 або 18, у якому клітина пухлини вибрана з групи, що включає клітини пухлин молочної залози, сім'яників, товстої кишки, легень, яєчника, сечового міхура, матки, шийки матки, підшлункової залози та шлунка.
20. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-13 або композиції за будь-яким з пп. 14-16 для приготування фармацевтичної композиції для лікування небажаної проліферації клітин.
21. Спосіб модулювання росту клітин пухлин *in vitro* в зразку, що включає стадії додавання до зразка антитіла за будь-яким з пп. 1-13 або композиції за будь-яким з пп. 14-16.

Дана заявка є продовженням заявки на видачу [патенту U.S.S.N. 60/367002, поданої 22 березня 2002, яка є частковим продовженням заявки U.S.S.N. 60/301091, поданої 26 червня 2001, яка є частковим продовженням заявки U.S.S.N. 60/293020, поданої 17 травня 2001, яка є частковим продовженням заявки U.S.S.N. 60/286782, поданої 26 квітня 2001]. Повний опис кожної з вищезгаданих заявок на видачу патентів включений в даний опис у вигляді посилання.

Даний винахід, загалом, відноситься до області генетики і клітинної і молекулярної біології. Більш конкретно винахід відноситься до антитіл, які зв'язуються і модулюють передачу сигналу Cripto, до наборів, які містять такі антитіла, і способів, в яких антитіла використовуються.

Cripto є білком клітинної поверхні, що складається з 188 амінокислотних залишків, випадково виділених при скринінгу кДНК бібліотеки ембріональної карциноми людини [Ciccociola et al., 1989, EMBO J., vol. 8, No. 7, pp. 1987-1991]. Білок Cripto має, щонайменше, два помітних домени: багатий цистеїном домен і домен, спочатку охарактеризований як домен, схожий з доменом, виявленим в сімействі епідермального фактора росту (EGF). Cripto спочатку класифікували як представника сімейства EGF [Ciccociola et al., вище]; однак подальший аналіз показав, що Cripto не зв'язує жоден з відомих рецепторів EGF, і його EGF-подібний домен насправді відрізняється від сімейства EGF [Bianco et al., 1999, J. Biol. Chem., 274:8624-8629].

Сигнальний шлях Cripto залишається неясним, незважаючи на дослідження, що продовжується, при наявності відомостей в літературі, підтвер-

джуючих активацію декількох різних шляхів, включаючи MAP-кіназний шлях [DeSantis et al., 1997, Cell Growth Differ., 8:1257-1266; Kannan et al., 1997, J. Biol. Chem., 272:3330-3335], шлях TGF- β [Gritsman et al., 1999, Development, 127:921-932; Schier et al., 2000, Nature, 403:385-389], можливі взаємодії з шляхом Wnt [Salomon et al., Endocr. Relat. Cancer. 2000 Dec;7(4): 199-226] і взаємний вплив у випадку шляху EGF [Bianco et al., 1999, J. Biol. Chem., 274:8624-8629].

У [патенті США 5256643] і двох споріднених йому виділених заявках [патенти США 5654140 і 5792616] описаний ген Cripto людини, білок Cripto і антитіла до Cripto.

У [патенті США 5264557] і трьох споріднених йому виділених заявках [патенти США 5620866, 5650285 і 5854399] описаний споріднений Cripto ген і білок людини. Також заявлені антитіла, які зв'язуються з білком, спорідненим Cripto, але перекресно не реагують за допомогою зв'язування з самим білком Cripto.

Понадекспресія білка Cripto пов'язана з багатьма типами пухлин (включаючи, але не обмежуючись вказаним, пухлини молочної залози, сім'яників, товстої кишки, легень, яєчника, сечового міхура, матки, шийки матки, підшлункової залози і шлунка), як показано за допомогою імунофарбування тканини людини поліклональними антитілами кролика, одержаними проти невеликих пептидів cripto [Panico et al., 1996, Int. J. Cancer, 65:51-56; Byrne et al., 1998, J. Pathology, 185:108-111; De Angelis et al., 1999, Int. J. Oncology, 14:437-440]. Таким чином, в даній області існує необхідність в засобах контролю, обмеження і/або запобігання такій понадекспресії, модулюванню передачі сиг-

налу Cripto і модулюванню наслідків експресії Cripto (тобто, стимулювання і/або підтримки клітинної трансформації).

Даний винахід відноситься до нових антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto, і способів одержання і застосування таких антитіл. Винахід також відноситься до антитіл, які зв'язуються з Cripto і модулюють передачу сигналу Cripto або взаємодію білків, наприклад, до антитіла, яке зв'язується з Cripto так, що сигнал, виникаючий внаслідок взаємодії білків з Cripto, придушується. Винахід також відноситься до антитіл, які зв'язуються з Cripto і блокують взаємодію між Cripto і ALK4. Винахід також відноситься до антитіл, які зв'язуються з Cripto і модулюють зростання пухлини. Винахід також відноситься до антитіл, які зв'язуються з Cripto, модулюють передачу сигналу Cripto і модулюють зростання пухлини. Винахід також відноситься до антитіл, які зв'язуються з Cripto, блокують взаємодію між Cripto і ALK4 і модулюють зростання пухлини.

В одному аспекті винаходу антитіло згідно з даним винаходом специфічно зв'язується з епітопом, вибраним з групи епітопів, з якими зв'язуються антитіла A6C12.11, A6F8.6 (ATCC Інвентарний №. PTA-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317), A8H3.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18 (ATCC інвентарний №. PTA-3311), A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310), A40G12.8 (ATCC інвентарний №. PTA3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11 (ATCC інвентарний №. PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17 (ATCC інвентарний №. PTA-3319), B6G7.10 (ATCC інвентарний №. PTA-3313), B11H8.4.

В іншому аспекті винаходу антитіло згідно з даним винаходом специфічно зв'язується з епітопом в ліганд/рецепторзв'язувальному домені Cripto. Cripto може бути вибраний з CR-1 (SEQ ID №: 1) або CR-3 (SEQ ID №: 2). У більш конкретному варіанті антитіла, які специфічно зв'язуються з епітопом в ліганд/рецепторзв'язувальному домені, включають, наприклад, A6C12.11, A6F8.6 (ATCC інвентарний №. PTA-3318), A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317), A19A10.30, A8H3.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3315), A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310), A40G12.8 (ATCC інвентарний №. PTA-3316), A17G12.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3314), A18B3.11 (ATCC інвентарний №. PTA-3312) і B6G7.10 (ATCC інвентарний №. PTA-3313).

В одному варіанті епітоп, з яким зв'язуються антитіла згідно з даним винаходом, знаходиться в EGF-подібному домені. Антитіла, які специфічно зв'язуються з епітопом в EGF-подібному домені, включають, але не обмежені вказаним, A40G12.8 (ATCC інвентарний №. PTA-3316), A8H3.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3315), A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310), B6G7.10 (ATCC інвентарний №. PTA-3313), A17G12.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3314) і A18B3.11 (ATCC інвентарний №. PTA-3312).

В іншому варіанті епітоп, з яким зв'язуються антитіла згідно з даним винаходом, знаходиться в

Cys-багатому домені. Антитіла, які специфічно зв'язуються з епітопом в Cys-багатому домені, включають, але не обмежені вказаним, A19A10.30, A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317), A6F8.6 (ATCC інвентарний №. PTA-3318) і A6C12.11.

В іншому варіанті епітоп, з яким зв'язуються антитіла згідно з даним винаходом, знаходиться в домені, що охоплює амінокислотні залишки 46-62 Cripto. Антитіла, які специфічно зв'язуються з епітопом в домені, що охоплює амінокислотні залишки 46-62 Cripto, включають, але не обмежені вказаним, A10B2.18 (ATCC інвентарний №. PTA-3311), B3F6.17 (ATCC інвентарний №. PTA-3319) і A17A2.16.

Даний винахід також відноситься до антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні модулювати передачу сигналу Cripto. Антитіла, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні модулювати передачу сигналу Cripto, включають, але не обмежені вказаним, A40G12.8 (ATCC інвентарний №. PTA-3316), A8H3.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3315), A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310) і A6C12.11. В одному варіанті антитіла згідно з даним винаходом, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні модулювати передачу сигналу Cripto, зв'язуються з епітопом в EGF-подібному домені або Cys-багатому домені Cripto.

Даний винахід також відноситься до антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto і блокують взаємодію між Cripto і ALK4. Антитіла, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні блокувати взаємодію між Cripto і ALK4, включають, але не обмежені вказаним, A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317), A6F8.6 (ATCC інвентарний №. PTA-3318) і A6C12.11. В одному варіанті антитіла згідно з даним винаходом, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні блокувати взаємодію між Cripto і ALK4, зв'язуються з епітопом в EGF-подібному домені або Cys-багатому домені Cripto.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні модулювати зростання пухлини. Антитіла, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні модулювати зростання пухлини, включають, але не обмежені вказаним, A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310), B6G7.10 (ATCC інвентарний №. PTA-3313) і A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317).

В одному варіанті антитіла згідно з даним винаходом, які специфічно зв'язуються з Cripto і здатні модулювати зростання пухлини, зв'язуються з епітопом в EGF-подібному домені або Cys-багатому домені Cripto.

У ще одному аспекті даний винахід відноситься до антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto, які здатні модулювати передачу сигналу Cripto і які здатні модулювати зростання пухлини. Антитіла, які специфічно зв'язуються з Cripto, які здатні модулювати передачу сигналу Cripto і які здатні модулювати зростання пухлини, включають, але не обмежені вказаним, A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310).

В одному варіанті антитіла згідно з даним винаходом, які специфічно зв'язуються з Cripto, які здатні модулювати передачу сигналу Cripto і які здатні модулювати зростання пухлини, зв'язують-

ся з епітопом в EGF-подібному домені або Sys-багатому домені Cripto.

У ще одному аспекті даний винахід відноситься до антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto, які здатні блокувати взаємодію між Cripto і ALK4 і які здатні модулювати зростання пухлини. Антитіла, які специфічно зв'язуються з Cripto, які здатні блокувати взаємодію між Cripto і ALK4 і які здатні модулювати зростання пухлини, включають, але не обмежені вказаним, A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317).

В іншому варіанті даний винахід відноситься до антитіла, продукованого гібридомною, вибраного з групи, що складається з A6F8.6 (ATCC інвентарний №. PTA-3318), A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317), A8H3.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3315), A10B2.18 (ATCC інвентарний №. PTA-3311), A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310), A40G12.8 (ATCC інвентарний №. PTA-3316), A17G12.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3314), A18B3.11 (ATCC інвентарний №. PTA-3312), B3F6.17 (ATCC інвентарний №. PTA-3319) і B6G7.10 (ATCC інвентарний №. PTA-3313).

Антитіла згідно з даним винаходом включають, але не обмежені вказаним, моноклональні, поліклональні, гуманізовані, химерні і людські антитіла.

Даний винахід також відноситься до композицій для введення суб'єкту, що має пухлину, яка експресує Cripto, що містить, щонайменше, одне з антитіл, описаних вище. У більш конкретному варіанті суб'єктом є людина. Композиція може містити фармацевтично прийнятний наповнювач. Описані вище антитіла можна кон'югувати з хіміотерапевтичним засобом або вводити в комбінації з некон'югованим хіміотерапевтичним засобом.

В іншому аспекті винаходу розглядаються способи модулювання зростання пухлинних клітин у зразку *in vitro*, що включають стадію додавання до зразка описаних вище композицій.

Також розглядаються способи модулювання зростання пухлинних клітин у суб'єктів *in vivo*, що включають стадію введення суб'єкту ефективної кількості описаних вище композицій. У конкретному варіанті суб'єктом є людина.

Іншим аспектом даного винаходу є способи лікування суб'єктів, що мають пухлину, яка понадекспресує Cripto, що включають введення суб'єкту описаних вище композицій в ефективній кількості. Композиції для введення можуть включати фармацевтично прийнятні наповнювачі, антитіла, кон'юговані з хіміотерапевтичними засобами, і антитіла, що вводяться в комбінації з некон'югованими хіміотерапевтичними засобами.

Способи згідно з даним винаходом особливо корисні для модулювання зростання пухлинних клітин і/або лікування суб'єкта (тобто людини), що має пухлину, в тому випадку, коли пухлинна клітина вибрана з пухлинних клітин молочної залози, сім'яників, товстої кишки, легені, яєчника, сечового міхура, матки, шийки матки, підшлункової залози і шлунка.

У ще одному варіанті даний винахід відноситься до способів визначення того, чи експресує тканина Cripto, що включає стадію аналізу тканини

суб'єкта в імуноаналізі з використанням будь-якого з описаних вище антитіл. Також розглядаються способи визначення того, чи понадекспресує лінія клітин Cripto, що включають стадію аналізу лінії клітин в імуноаналізі з використанням будь-якого з описаних вище антитіл.

Вказані та інші аспекти винаходу більш детально представлені нижче в докладному описі винаходу.

Виявлені антитіла, які специфічно зв'язуються з Cripto, і їх застосування для модулювання передачі сигналу Cripto або взаємодії білків і/або для блокування взаємодії між Cripto і ALK4, і/або модулювання зростання пухлинних клітин. Виявлені різні класи антитіл, які специфічно зв'язуються з Cripto, включаючи, наприклад, антитіла, які специфічно зв'язуються з епітопом в ліганд/рецепторзв'язувальному домені або нативно-го білка Cripto, або денатурованої форми Cripto; антитіла, які зв'язують EGF-подібний домен, Sys-багатий домен або пептид (наприклад, приблизно з 3-20 амінокислот) з ділянки, що містить амінокислотні залишки 46-150; антитіла, які зв'язують Cripto і модулюють передачу сигналу Cripto; антитіла, які зв'язують Cripto і модулюють зростання пухлинних клітин; і антитіла, які зв'язують Cripto, модулюють передачу сигналу Cripto і модулюють зростання пухлинних клітин. Вказані антитіла вибрані з використанням звичайних аналізів *in vitro* для відбору антитіл, які зв'язують ліганд/рецепторзв'язувальний домен, модулюють передачу сигналу Cripto або модулюють зростання пухлинних клітин.

Способи згідно з даним винаходом застосовні в терапії злоякісних або доброякісних пухлин ссавців в тому випадку, коли швидкість зростання пухлини (яка є аномальною швидкістю для нормальної тканини), щонайменше, частково залежить від Cripto. Аномальною швидкістю зростання є швидкість зростання, яка перевищує швидкість, необхідну для нормального гомеостазу, і перевищує швидкість для нормальних тканин того ж походження.

Визначення

В документі наведені різні визначення. Більшість слів мають значення, яке може приписуватись таким словам фахівцем в даній області. Слова, конкретне визначення яких наведене або нижче, або в іншому місці даного документа, мають значення, наведене в контексті даного винаходу загалом, і яке звичайно розуміється фахівцями в даній області.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «ділянка» означає фізично безперервну частину первинної структури біомолекули. У випадку білків ділянку визначають як безперервну частину амінокислотної послідовності даного білка.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «домен» відноситься до структурної частини біомолекули, яка вносить внесок у відому або очікувану функцію біомолекули. Домени можуть мати рівну протяжність з ділянками або їх частинами; домени також можуть включати частину біомолекули, яка відрізняється від конкретної ділянки, нарівні з повною вказаною областю або її

частиною. Приклади білкових доменів включають, але не обмежені вказаним, позаклітинний домен (тягнеться приблизно від залишку 31 до залишку 188 Cripto, включаючи Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) і CR-3 (SEQ ID NO: 2)) і трансмембранний домен (тягнеться приблизно від залишку 169 до залишку 188 Cripto, включаючи Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) і CR-3 (SEQ ID NO: 2)). Ліганд/рецепторзв'язувальний домен білка Cripto тягнеться приблизно від залишку 75 до залишку 150 Cripto, включаючи Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) і CR-3 (SEQ ID NO: 2) і містить EGF-подібний домен Cripto, який тягнеться, наприклад, приблизно від залишку 75 до залишку 112 Cripto, включаючи Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) і CR-3 (SEQ ID NO: 2), і багатий цистеїном домен Cripto, який тягнеться, наприклад, приблизно від залишку 114 до залишку 150 Cripto, включаючи Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) і CR-3 (SEQ ID NO: 2). Наприклад, багато які моноклональні антитіла згідно з даним винаходом були ідентифіковані як антитіла, що зв'язуються з EGF-подібним або Cys-багатим доменами. Крім того, моноклональні антитіла A10B2.18 (ATCC інвентарний №. PTA-3311), B3F6.17 (ATCC інвентарний №. PTA-3319) і A17A2.16 були ідентифіковані як антитіла, що зв'язуються з епітопом, утвореним в домені в ділянці, що охоплює амінокислотні залишки 46-62, «лівіше» EGF-подібного домена. Дивись приклад 3 нижче. Епітоп в ліганд/рецепторзв'язувальному домені є епітопом, що утворюється або в конформаційно нативному білку, або в денатурованому білку Cripto, з яким можуть зв'язуватись антитіла.

У значенні, що використовується в даному описі, мається на увазі, що термін «антитіло» відноситься до повних інтактних антитіл і Fab, Fab', F(ab)2 та інших їх фрагментів. Повні інтактні антитіла включають, але не обмежені вказаним, моноклональні антитіла, такі як мишачі моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, химерні антитіла, людські антитіла і гуманізовані антитіла. Різні форми антитіл можна одержати з використанням стандартних способів на основі рекомбінантної ДНК [Winter and Milstein, Nature 349: 293-99, 1991]. Наприклад, можна сконструювати «химерні» антитіла, в яких антиген-зв'язувальний домен з антитіла тварини пов'язаний з константним доменом людини (антитіло, початково одержане від ссавця, який відрізняється від людини, для якої використали технологію рекомбінантної ДНК, щоб замінити всі або частину ділянок шарнірної і константної ділянок важкого ланцюга і/або константної ділянки легкого ланцюга відповідними ділянками з легкого ланцюга або важкого ланцюга імунoglobуліну людини) [дивись, наприклад, Cabilly et al., патент США 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-55, 1984]. Химерні антитіла зменшують імуногенні відповіді, що викликаються антитілами тварин у випадку використання при клінічному лікуванні людей.

Крім того, можна синтезувати рекомбінантні «гуманізовані» антитіла. Гуманізовані антитіла є антитілами, початково одержаними від ссавця, який відрізняється від людини, для яких використали технологію рекомбінантної ДНК, щоб замінити деякі або всі амінокислоти, що не вимагаються

для зв'язування антигену, амінокислотами з відповідних ділянок легкого або важкого ланцюга імунoglobуліну людини. Тобто, вони є химерами, що головним чином містять послідовності імунoglobуліну людини, в які були вбудовані ділянки, відповідальні за специфічне зв'язування антигену [дивись, наприклад, заявку на видачу патенту PCT WO 94/04679]. Тварин імунізують необхідним антигеном, виділяють відповідні антитіла і видаляють частину послідовностей варіабельних ділянок, відповідальних за специфічне зв'язування антигену. Одержані від тварини антигензв'язувальні ділянки потім клонують у відповідному положенні генів антитіла людини, в яких були делеговані антигензв'язувальні ділянки. Гуманізовані антитіла мінімізують використання гетерологічних (міжвидових) послідовностей в антитілах для застосування в терапії людини, і менше імовірність того, що вони викличуть небажані імунні відповіді. Подібним чином можна одержати приматизовані антитіла.

Інший варіант винаходу включає застосування людських антитіл, які можна продукувати у тваринах, які відрізняються від людини, таких як трансгенні тварини, які несуть один або декілька трансгенів імунoglobуліну людини. Таких тварин можна використовувати як джерело спленоцитів для одержання гібридом, як описано в [патенті США 5569825].

Фрагменти антитіл і моновалентні антитіла також можна використати у способах і композиціях згідно з даним винаходом. Моновалентні антитіла містять димер важкий ланцюг/легкий ланцюг, пов'язаний з областю Fc (або сплотовою областю) другого важкого ланцюга. «Fab-область» відноситься до тих частин ланцюгів, які приблизно еквівалентні або аналогічні послідовностям, які містять Y-розгалужені частини важкого ланцюга, і повністю до легкого ланцюга, і які, як було показано, спільно (в агрегатах) виявляють активність антитіла. Білок Fab включає агрегати одного важкого і одного легкого ланцюга (звичайно відомі як Fab'), а також тетрамери, які відповідають двом розгалуженим ділянкам антитіла Y (звичайно відомі як F(ab)2), при ковалентній або нековалентній агрегації будь-яких вказаних вище компонентів, за умови, що агрегат здатний специфічно реагувати з конкретним антигеном або сімейством антигенів.

Будь-яке з антитіл згідно з винаходом необов'язково може бути кон'юговане з хіміотерапевтичним засобом, визначення якого наведено нижче.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «зв'язування» означає фізичну або хімічну взаємодію між двома білками або сполуками або асоційованими білками або сполуками або їх комбінаціями, включаючи взаємодію між антитілом і білком. Зв'язування включає іонні, неіонні, водневі зв'язки, Ван-дер-Ваальсові і гідрофобні взаємодії і т.д. При фізичній взаємодії зв'язування може бути або прямим, або посереднім, при цьому посереднє здійснюється за допомогою або завдяки впливу іншого білка або сполуки. Пряме зв'язування відноситься до взаємодій, які не відбуваються за допомогою або за рахунок впливу іншого білка або сполуки, а навпаки відбувається без інших реальних хімічних проміжних сполук. Зв'язу-

вання можна реєструвати багатьма різними способами. Способи реєстрації зв'язування добре відомі фахівцям в даній області.

У значенні, що використовується в даному описі, «антитіло, здатне інтерналізувати CripTo» означає антитіло, яке проникає в клітину, видаляючи CripTo з клітинної поверхні. Можна провести скринінг відносно антитіл до CripTo, які здатні інтерналізувати CripTo, з використанням флуоресцентних мічених моноклональних антитіл до CripTo. Для того щоб визначити, які антитіла інтерналізуються в CripTo-позитивні клітини, можна провести аналіз відносно поглинання флуоресцентного сигналу антитіл в клітини, спостерігаючи клітини у флуоресцентному і/або конфокальному мікроскопі. Вказані антитіла, які інтерналізувались, будуть видні як флуоресцентні сигнали в цитоплазматичних і/або клітинних везикулах. Необмежувальні приклади антитіл до CripTo, здатних інтерналізувати CripTo, включають A27F6.1 і B3F6.17.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «сполука» означає будь-який хімічний агент, що ідентифікується, або молекулу, включаючи, але не обмежуючись вказаним, іон, атом, невелику молекулу, пептид, білок, цукор, нуклеотид або нуклеїнову кислоту, і така сполука може бути природною або синтетичною.

У значенні, що використовується в даному описі, терміни «модулює» або «модифікує» означають збільшення або зменшення кількості, якості або впливу конкретної активності або білка.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «модулює передачу сигналу CripTo» означає збільшення або зменшення кількості, якості або впливу активності CripTo, приблизно на 5%, переважно на 10%, більш переважно на 20%, більш переважно на 30%, більш переважно на 40%, більш переважно на 50%, більш переважно на 60%, більш переважно на 70%, більш переважно на 80%, більш переважно на 90% і найбільш переважно на 100%. Активність можна виміряти за допомогою аналізів, відомих в даній області, таких як аналіз нульових клітин, показаний в прикладі 3. В іншому варіанті білкова взаємодія між CripTo та іншим білком схожим чином придушують за допомогою зв'язування антитіл згідно з винаходом.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «блокування взаємодії між CripTo і ALK 4» означає збільшення або зменшення взаємодії, тобто зв'язування між CripTo і ALK4 приблизно на 5%, переважно на 10%, більш переважно на 20%, більш переважно на 30%, більш переважно на 40%, більш переважно на 50%, більш переважно на 60%, більш переважно на 70%, більш переважно на 80%, більш переважно на 90% і найбільш переважно на 100%. Активність можна виміряти за допомогою аналізів, відомих в даній області, таких як аналіз зв'язування, показаний в прикладі 8.

У значенні, що використовується в даному описі, термін «модулювання зростання пухлинних клітин in vitro» означає збільшення або зменшення кількості пухлинних клітин in vitro приблизно на 5%, переважно на 10%, більш переважно на 20%, більш переважно на 30%, більш переважно на 40%, більш переважно на 50%, більш переважно

на 60%, більш переважно на 70%, більш переважно на 80%, більш переважно на 90% і найбільш переважно на 100%. Модулювання зростання пухлинних клітин in vitro можна виміряти за допомогою аналізів, відомих в даній області, таких як аналіз в м'якому агарі клітин GEO, показаний в прикладі 4.

У значенні, що використовується в даному описі, «модулювання зростання пухлинних клітин in vivo» означає збільшення або зменшення кількості пухлинних клітин in vivo приблизно на 5%, переважно на 10%, більш переважно на 20%, більш переважно на 30%, більш переважно на 40%, більш переважно на 50%, більш переважно на 60%, більш переважно на 70%, більш переважно на 80%, більш переважно на 90% і найбільш переважно на 100%. Модулювання зростання пухлинних клітин in vivo можна виміряти за допомогою аналізів, відомих в даній області, таких як аналіз, показаний у прикладі 5.

Термін «профілактика» відноситься до зменшення імовірності того, що організм буде заражений або буде розвиватись аномальний стан.

Термін «лікування» відноситься до одержання терапевтичного ефекту і, щонайменше, часткового ослаблення або скасування аномального стану організму. Лікування включає підтримку зростання пухлини в пригніченому стані та індукцію ремісії.

Термін «терапевтичний ефект» відноситься до придушення аномального стану. Терапевтичний ефект в деякій мірі зменшує один або декілька симптомів аномального стану. По відношенню до лікування аномальних станів терапевтичний ефект може відноситись до одного або декількох з наступних показників: (а) збільшення або зменшення проліферації, зростання і/або диференціювання клітин; (b) інгібування (тобто уповільнення або зупинка) або стимуляція загибелі клітин; (c) інгібування дегенерації; (d) зменшення в деякій мірі одного або декількох симптомів, пов'язаних з аномальним станом; і (e) посилення функціонування популяції клітин. Сполуки, що виявляють ефективність, направлену проти аномальних станів, можна ідентифікувати, як вказано в даному описі.

Термін «введення» відноситься до способу включення сполуки в клітини або тканини організму. Можна проводити профілактику або лікування аномального стану в тому випадку, коли клітини або тканини організму існують в організмі або поза організмом. Клітини, існуючі поза організмом, можна підтримувати або вирощувати на чашках для культури тканини або в іншому організмі. Для клітин, які містяться в організмі, в даній області існує багато способів, щоб ввести сполуки, включаючи (без обмеження) пероральне, парентеральне, дермальне, ін'єкційне і аерозольне застосування. Для клітин поза організмом в даній області існує множина способів, щоб ввести сполуки, включаючи (без обмеження) способи мікроін'єкції в клітини, способи трансформації і способи на основі носіїв. Введення можна здійснити множиною способів, відомих в даній області, наприклад, перорально, внутрішньовенно, внутрішньоочеревинно, внутрішньом'язово і т.д. У випадку використання для терапії in vivo антитіла згідно з даним винаходом вводять пацієнту в ефективних кількостях. У зна-

ченні, що використовується в даному описі, «ефективною кількістю» є кількість, достатня для того, щоб одержати позитивні або необхідні клінічні результати (тобто кількості, які видаляють або зменшують пухлинне навантаження пацієнта). Ефективну кількість можна ввести в одне або декілька введенень. З метою даного винаходу ефективна кількість антитіл згідно з даним винаходом являє собою кількість антитіл, яка є достатньою для поліпшення, стабілізації або уповільнення розвитку пов'язаного з Crip1o патологічного стану, зокрема пов'язаних з Crip1o пухлин. Детенція і вимірювання вказаних індикаторів ефективності обговорюється нижче. Приклад звичайного режиму лікування включає введення суб'єкту за допомогою внутрішньовенної інфузії антитіл згідно з винаходом за схемою один раз на тиждень в дозі приблизно 2-5 мг/кг. Антитіла вводять амбулаторно у відділенні хемоінфузії, якщо немає необхідності в госпіталізації пацієнта. Інші схеми введення відомі в даній області і також передбачаються у винаході.

Профілактику і лікування аномального стану також можна проводити за допомогою введення антитіла згідно з винаходом в групу клітин, що мають відхилення в шляху сигнальної трансдукції в організмі. Потім можна здійснювати моніторинг впливу введення сполуки на функцію організму. Організм переважно є організмом людини.

Мається на увазі, що «понадекспресія Crip1o» означає експресію Crip1o тканиною, експресія в якій вище, ніж експресія Crip1o в сусідній нормальній тканині, в статистично значущій кількості.

Термін «хіміотерапевтичний засіб» відноситься до будь-яких засобів, ідентифікованих в даній області як засоби, що надають терапевтичний вплив на інгібування зростання пухлини, підтримання зростання пухлини в пригніченому стані і/або індукцію ремісії, таких як природні сполуки, синтетичні сполуки, білки, модифіковані білки і радіоактивні сполуки. Хіміотерапевтичні засоби, що розглядаються в даному описі, включають засоби, які можна кон'югувати з антитілами згідно з даним винаходом, або альтернативно засоби, які можна використати в комбінації з антитілами згідно з даним винаходом, некон'югуючи їх з антитілом. Приклади хіміотерапевтичних засобів, які можна кон'югувати з антитілами згідно з даним винаходом, включають, але не обмежені вказаним, радіоактивні кон'югати (90Y, 131I, 99mTc, 111In, 186Rh, та інш.), що активуються в пухлини проліків (мейтанзиноїди, аналоги CC-1065, похідні кліхеаміцину, антрацикліни, алкалоїди вінка та інш.),

рицин, дифтерійний токсин, екзотоксин *Pseudomonas*.

Хіміотерапевтичні засоби, які можна використати в комбінації з антитілами згідно з винаходом, а не кон'югувати з ними (тобто некон'юговані хіміотерапевтичні засоби), включають, але не обмежені вказаним, наступні засоби: платину (тобто, цисплатину), антрацикліни, аналоги нуклеозидів (пурину і піримідину), таксани, камптотецини, епіподофілотоксини, ДНК-алкілюючі агенти, антагоністи фолатів, алкалоїди вінка, інгібітори рибонуклеотидредуктази, інгібітори естрогену, інгібітори прогестерону, інгібітори андрогену, інгібітори ароматази, інтерферони, інтерлейкіни, моноклональні антитіла, таксол, камптосар, адриаміцин (dox), 5-FU і гемцитабін. Такі хіміотерапевтичні засоби можна використати в практиці винаходу в комбінації з антитілами згідно з винаходом шляхом спільного введення антитіла і некон'югованого хіміотерапевтичного засобу.

«Фармацевтично прийнятний носій або наповнювач» відноситься до біологічно інертних сполук, відомих в даній області і які використовуються у випадку введення антитіл згідно з винаходом. Прийнятні носії добре відомі в даній області і описані, наприклад, у [Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., 1990]. Прийнятні носії можуть включати біосумісні, інертні або біологічно всмоктувані солі, забуферювальні агенти оліго- або полісахариди, полімери, в'язкопружну сполуку, таку як гіалуронова кислота, агенти, що підвищують в'язкість, консерванти і тому подібне.

«Суб'єкт» відноситься до хребетних, зокрема до представників видів ссавців, і включає, але не обмежений вказаним, домашніх тварин, спортивних тварин і приматів, включаючи людей.

Антитіла згідно з винаходом

Антитіла згідно з винаходом специфічно зв'язуються з Crip1o. У значенні, що використовується в даному описі, Crip1o включає білок Crip1o CR-1, білок Crip1o CR-3 і їх фрагменти. Такі фрагменти можуть являти собою повні домени, такі як позаклітинний або внутрішньоклітинний домени, EGF-подібний домен, Cys-багатий домен, домен, зв'язувальний рецептор і тому подібне. Такі фрагменти також можуть включати в себе безперервні і переривчасті епітопи в будь-якому домені білка Crip1o.

Послідовність CR-1 довжиною 188 амінокислот являє собою наступну послідовність [SEQ ID NO: 1]:

**MDCRKMARFSYSVIWIMAIISKVPELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS
FYGRNCEHDVVRKENCGSVPHDTWLPKCKSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
GLVMDHLVASRTPELPSPARTTTFMVGICLSIQSY**

Послідовність CR-3 довжиною 188 амінокислот являє собою наступну послідовність [SEQ ID NO: 2]:

**MDCRKMVRFSYSVIWIMAIISKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVLPMMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSF
YGRNCEHDVVRKENCGSVPHDTWLPKCKSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGL
VMDHLVASRTPELPSPARTTTFMVLAGICLSIQSY**

В одному варіанті антитіла згідно з винаходом зв'язуються з епітопом в EGF-подібному домені Cripto. EGF-подібний домен тягнеться приблизно від амінокислотного залишку 75 до амінокислотного залишку 112 зрілого білка Cripto. Епітопи в EGF-подібному домені можуть містити лінійні або нелінійні ділянки амінокислотних залишків. Приклад лінійних епітопів, що розглядаються, включає, але не обмежений вказаним, приблизно залишки 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105, 100-110 або 105-112. В одному варіанті епітоп в EGF-домені є епітопом, що утворюється в конформаційно нативному білку Cripto на відміну від денатурованого білка Cripto.

В іншому варіанті антитіла згідно з винаходом зв'язуються з епітопом в Cys-багатому домені Cripto. Cys-багатий домен тягнеться приблизно від амінокислотного залишку 114 до амінокислотного залишку 150 зрілого білка Cripto. Епітопи в Cys-багатому домені можуть містити лінійні або нелінійні ділянки амінокислотних залишків. Приклад лінійних епітопів, що розглядаються, включає, але не обмежений вказаним, приблизно залишки 114-125, 120-130, 125-135, 130-140, 135-145 або 140-150. В одному варіанті епітоп в Cys-багатому домені є епітопом, що утворюється в конформаційно нативному білку Cripto на відміну від денатурованого білка Cripto.

Після створення антитіл зв'язування антитіл з Cripto можна аналізувати з використанням стандартних способів, відомих в даній області, таких як ELISA, тоді як присутність Cripto на клітинній поверхні можна аналізувати з використанням проточної цитометрії (FACS), як показано в прикладі 2. Альтернативно можна використати будь-який інший спосіб вимірювання такого зв'язування.

Даний винахід відноситься до антитіл (наприклад, моноклональних і поліклональних антитіл, одноланцюгових антитіл, химерних антитіл, біфункціональних/біспецифічних антитіл, гуманізованих антитіл, людських антитіл і антитіл з прищепленими районами, що визначають комплементарність (CDR), включаючи сполуки, які містять послідовності CDR, які специфічно впізнають поліпептид згідно з винаходом), специфічних по відношенню до Cripto або його фрагментів. Винахід також відноситься до фрагментів антитіл, включаючи Fab, Fab', F(ab')₂ і F_γ. Терміни «специфічне» і «вибіркове» у випадку використання для опису зв'язування антитіл згідно з винаходом вказують, що варіабельні ділянки антитіл згідно з винаходом впізнають і зв'язують поліпептиди Cripto. Буде зрозуміло, що специфічні антитіла згідно з винаходом також можуть взаємодіяти з іншими білками (наприклад, білком A. S. aureus або іншими антитілами в способах ELISA) за допомогою взаємодій з послідовностями поза варіабельними ділянками антитіл і, зокрема, в константній ділянці молекули. Скринінгові аналізи для визначення специфічності зв'язування антитіла згідно з винаходом (тобто антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в ліганд/рецепторзв'язувальному домені і домені, що охоплює залишки амінокислот 46-62) добре відомі і постійно використовуються на практиці в даній області. З метою повного обговорення таких ана-

лізів, дивись [Harlow et al. (Eds.), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6]. Також представлені антитіла, які впізнають і зв'язують фрагменти білка Cripto, за умови, що антитіла є специфічними по відношенню до поліпептидів Cripto. Антитіла згідно з винаходом можна одержати з використанням будь-якого способу, добре відомого і постійно використовуваного на практиці в даній області.

В одному варіанті винахід відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується з епітопом в ліганд/рецепторзв'язувальному домені Cripto. Специфічність антитіла більш детально описана нижче. Однак потрібно підкреслити, що антитіла, які можна створити на основі інших поліпептидів, які були раніше описані в літературі і які здатні випадково перехресно реагувати з Cripto (наприклад, внаслідок випадкового існування схожого епітопу в обох поліпептидах), вважаються «перехресно реагуючими» антитілами. Такі перехресно реагуючі антитіла не є антитілами, «специфічними» по відношенню до Cripto. Визначення того, чи зв'язується антитіло специфічно з епітопом Cripto, здійснюють з використанням будь-якого з декількох аналізів, таких як Вестерн-блот-аналіз, які добре відомі в даній області. Антитіла, які специфічно зв'язуються з позаклітинним епітопом білка Cripto (тобто з частинами білка Cripto, що виявляються ззовні клітини), особливо корисні для ідентифікації клітин, які експресують Cripto, а також для модулювання ліганд/рецепторзв'язувальної активності Cripto.

В одному варіанті винахід відноситься до безклітинної композиції, що містить поліклональні антитіла, де, щонайменше, одне з антитіл є антитілом згідно з винаходом, специфічним у відношенні Cripto. Прикладом композиції є антисироватка, виділена з тварини, яка являє собою композицію, що містить фракцію антитіл антисироватки, яка була ресуспендована у воді або в іншому розріджувачі, наповнювачі або носії.

В іншому варіанті винахід відноситься до моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла є високо специфічними, оскільки направлені проти одного антигенного сайту. Крім того, на відміну від поліклональних препаратів, які звичайно містять різні антитіла, направлені проти різних епітопів, кожне моноклональне антитіло направлене проти єдиної детермінанти на антигені. Моноклональні антитіла придатні для підвищення вибіркової і специфічності способів діагностичного і аналітичного дослідження з використанням зв'язування антиген-антитіло. Інша перевага моноклональних антитіл полягає в тому, що вони синтезуються культурою гібридом, що не містить домішок інших імуноглобулінів. Гібридами, які продукують такі антитіла, також вважаються аспектами винаходу.

У ще одному спорідненому варіанті винахід відноситься до антиідіотипічного антитіла, специфічного відносно антитіла, яке специфічне для Cripto. З метою більш докладного обговорення антиідіотипічних антитіл дивись, наприклад, [патенти США 6063379 і 5780029].

Добре відомо, що антитіла містять відносно невеликі антигензв'язувальні домени, які можна виділити хімічним способом або одержати рекомбінантними способами. Такі домени як такі є придатними як молекули, які зв'язують CripTo, а також їх можна повторно ввести в людські антитіла або злити з хімотерапевтичним засобом або поліпептидом. Таким чином, в ще одному варіанті винахід відноситься до поліпептиду, що містить фрагмент CripTo-специфічного антитіла, де фрагмент і асоційована молекула, якщо вона існує, зв'язуються з CripTo. Як необхіджувальний приклад винахід відноситься до поліпептидів, які є одноланцюговими антитілами і CDR-прищепленими антитілами. Для більш докладного обговорення CDR-прищеплених антитіл дивись, наприклад, [патент США 5859205].

В іншому варіанті надлюдські антитіла можна гуманізувати будь-яким способом, відомим в даній області. Гуманізовані антитіла придатні для терапевтичних застосувань *in vivo*. Крім того, можна синтезувати рекомбінантні «гуманізовані» антитіла. Гуманізовані антитіла являють собою антитіла, початково одержані з ссавця, який відрізняється від людини, для яких використали технологію рекомбінантної ДНК, щоб замінити деякі або всі амінокислоти, не необхідні для зв'язування антигену, амінокислотами з відповідних ділянок легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну людини. Тобто, вони є химерами, що головним чином містять послідовності імуноглобуліну людини, в які були вбудовані ділянки, відповідальні за специфічне зв'язування антигену [дивись, наприклад, заявку на видачу патенту PCT WO 94/04679]. Тварин імунізують необхідним антигеном, виділяють відповідні антитіла і видаляють частину послідовностей варіабельних ділянок, відповідальних за специфічне зв'язування антигену. Одержані від тварини антигензв'язувальні ділянки потім клонують у відповідному положенні генів антитіла людини, в яких були делетовані антигензв'язувальні ділянки. Гуманізовані антитіла мінімізують використання гетерологічних (міжвидових) послідовностей в антитілах для застосування в терапії людини, і менш ймовірно, що вони викличуть небажані імунні відповіді. Подібним чином можна одержати приматизовані антитіла, використовуючи гени антитіл примату (наприклад, резусу, бабуїна і шимпанзе). Потім можна ввести інші зміни в каркас антитіла, щоб модулювати афінність або імуногенність. [Дивись, наприклад патенти США №. 5585089, 5693761, 5693762 і 6180370].

Інший варіант винаходу включає застосування людських антитіл, які можна продукувати в тваринах, які відрізняються від людини, таких як трансгенні тварини, що несуть один або декілька трансгенів імуноглобуліну людини. Таких тварин можна використати як джерело спленоцитів для одержання гібридом, як описано в [патенті США 5569825, заявках на видачу патенту WO 00076310, WO 00058499 і WO 00037504, включеному в даний опис у вигляді посилань].

Модулювання сигналу

В іншому варіанті антитіла згідно з винаходом зв'язуються з CripTo і модулюють передачу сигналу CripTo або взаємодії CripTo-білків. Понадекспресія активності CripTo може приводити до стану деди-

ференціювання, що сприяє вияву характеристик мезенхімальних клітин, підвищеної проліферації і міграції клітин [Salomon et al., BioEssays 21: 61-70, 1999; Ciardiello et al., Oncogene 9: 291-298, 1994; i Baldassarre et al., Int. J. Cancer 66: 538-543, 1996], вияву фенотипів, пов'язаних з трансформацією клітин, що спостерігається при неоплазії.

Одними зі способів тестування активності анти-CripTo-антитіл і їх здатності модулювати передачу сигналу є спосіб з використанням лінії клітин F9, «нокаутованих» (KO) за CripTo [Minchiotti et al., Mech. Dev. 90: 133-142, 2000]. CripTo стимулює фосфорилування smad2 і фактор транскрипції FAST в ембріонах *Xenopus*, і активність фактора транскрипції FAST можна контролювати, вимірюючи активність люциферази репортерного гена регуляторний елемент FAST-люцифераза [Saijoh et al., Mol. Cell 5:35-47, 2000]. У клітинах F9-CripTo-KO делетований ген CripTo, і таким чином вони є нульовими клітинами у відношенні CripTo і залежної від CripTo передачі сигналу [Minchiotti et al., Mech. Dev. 90: 133-142, 2000]. Передачу сигналу CripTo можна оцінити в клітинах F9-CripTo-KO шляхом трансфекції генної конструкції CripTo, FAST і регуляторний елемент FAST-люцифераза. У вказаних лініях клітин залежної від CripTo FAST-люциферазної активності не спостерігається, поки в них не трансфікують кДНК CripTo і кДНК FAST. Антитіла, здатні блокувати CripTo-залежну передачу сигналу Nodal, є антитілами, які блокують функцію передачі сигналу CripTo.

Фахівці в даній області можуть використати інші аналізи, що дозволяють вимірювати активність CripTo, такі як аналіз зростання в м'якому агарі (дивись приклад 4 нижче). Здатність клітин рости в м'якому агарі пов'язана з трансформацією клітин, і аналіз є класичним аналізом *in vitro* для вимірювання інгібування зростання пухлинних клітин. Інші аналізи, застосовні для визначення інгібування активності, включають аналізи *in vitro* на пластику і тому подібні.

Терапевтичні застосування

Антитіла згідно з винаходом також застосовні для терапевтичних цілей, таких як модулювання зростання пухлинних клітин, діагностичних цілей для виявлення або кількісного вимірювання CripTo і для очищення CripTo.

В одному варіанті винаходу представлені антитіла, які здатні специфічно зв'язуватись з CripTo і які модулюють зростання пухлинних клітин у пацієнта. В одному варіанті пухлинними клітинами є клітини пухлини сім'яників, молочної залози, товстої кишки, легені, яєчника, сечового міхура, матки, шийки матки, підшлункової залози і шлунка.

В іншому варіанті представлені антитіла, які здатні специфічно зв'язуватись з CripTo і які модулюють зростання пухлинних клітин, які понадекспресують CripTo. В одному варіанті пухлинними клітинами є лінії клітин, які понадекспресують CripTo, такі як лінії клітин, одержані зі злоякісної пухлини молочної залози, сім'яників, товстої кишки, легені, яєчника, сечового міхура, матки, шийки матки, підшлункової залози і шлунка.

Можна проводити скринінг анти-CripTo-антитіл відносно активності *in vivo* як потенційні протиракові засоби, слідуючи стандартним протоколам,

що використовуються фахівцями в даній області, як показано у прикладі 4 нижче. Приклади таких протоколів загалом описані National Cancer Institute (NCI) в їх протоколах «скринінгу моделей злоякісних пухлин in vivo», номер публікації NIH 84-2635 (лютий 1984).

В іншому варіанті винаходу антитіла згідно з винаходом використовують для лікування пацієнта, що має злоякісну пухлину.

Антитіла згідно з даним винаходом можна комбінувати з фармацевтично прийнятним наповнювачем і вводити пацієнту в терапевтично ефективній дозі. Для обговорення способів інгібування зростання пухлин дивись, наприклад, [патент США 6165464].

Також передбачені способи лікування суб'єкта, страждаючого порушенням, пов'язаним з аномальними рівнями (тобто підвищеними або зниженими) CripTo, при цьому спосіб включає в себе введення суб'єкту ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з епітопом в ліганд/рецепторзв'язувальному домені CripTo, включаючи, але не обмежуючись вказаним, випадки, коли епітоп знаходиться в EGF-подібному домені або Cys-багатому домені CripTo.

Також передбачені способи лікування суб'єкта, страждаючого порушенням, пов'язаним з аномальними рівнями (тобто підвищеними або зниженими) CripTo, при цьому спосіб включає введення суб'єкту ефективної кількості антитіла, яке специфічно утворює комплекс з CripTo і направлене до епітопу, до якого направлене антитіло, вибране з групи, що складається з A6C12.11, A6F8.6 (ATCC інвентарний №. PTA-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5 (ATCC інвентарний №. PTA-3317), A8H3.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18 (ATCC інвентарний №. PTA-3311), A27F6.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3310), A40G12.8 (ATCC інвентарний №. PTA-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (ATCC інвентарний №. PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11 (ATCC інвентарний №. PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17 (ATCC інвентарний №. PTA-3319) і B6G7.10 (ATCC інвентарний №. PTA-3313).

Діагностику за допомогою детекції CripTo легко здійснити за допомогою стандартних аналізів зв'язування з використанням нових антитіл згідно з винаходом, що дозволяють фахівцям специфічно виявляти наявність CripTo в широкому колі зразків, культур і т.д.

Також передбачені набори, що містять антитіло згідно з винаходом, для будь-яких наведених в даному описі цілей. Як правило, набір згідно з винаходом також містить контрольний антиген, по відношенню до якого антитіло є імуноспецифічним. Варіанти включають набори, що містять всі реагенти та інструкції з їх застосування.

Додаткові характерні особливості винаходу будуть зрозумілі на основі наступних ілюстративних прикладів.

Приклади

Приклад 1: Експресія і очищення CripTo

Експресуючу плазмиду, названу pSGS480, конструювали за допомогою субклонування до ДНК, що кодує амінокислотні залишки 1-169 CripTo

людини [амінокислоти 1-169 SEQ ID NO: 1], злиті з Fc-доменом IgG₁ людини (тобто, «CR(del C)-Fc»), у векторі pEAG1100. Для знайомства з більш докладним описом вказаного вектора, дивись заявку, що знаходиться на спільному розгляді на видачу [патенту США з реєстраційним №. 60/233148, подану 18 вересня 2000]. Вектор pEAG1100 є похідним плазмиди pCMV-Sport-betagal GIBCO-BRL Life Technologies, застосування якого для тимчасових трансфекцій CHO описане [Schifferli et al., 1999, Focus 21: 16]. Він був одержаний видаленням NotI-фрагмента репортерного гена бета-галактозидази з плазмиди pCMV-Sport-Betagal (номер в каталозі 10586-014) таким чином: плазмиду розщеплювали NotI і EcoRV, NotI-фрагмент кістяка вектора розміром 4,38т.п.н. піддавали очищенню в гелі і лігували. Ліговану ДНК трансформували в компетентні клітини E. coli DHS-альфа. pEAG1100 виділяли у вигляді плазмиди, що містить необхідний рекомбінант, з окремої ізольованої колонії. Підтверджували послідовність pEAG1100, що охоплює промотор, полілінкер і сигнал термінації транскрипції.

Плазмиду pSGS480 тимчасово трансфікували в клітини CHO, і клітини вирощували при 28°C протягом 7 днів. Наявність білка CR(del C)-Fc у вказаних клітинах і кондиціонованих середовищах оцінювали за допомогою Вестерн-блот-аналізу. Для Вестерн-блот-аналізу кондиціоновані середовища і клітини з CripTo-трансфікованих культур клітин піддавали SDS-ПААГ в 4-20%-градієнтних гелях у відновлювальних умовах, за допомогою електрофорезу переносили на нітроцелюлозу, і злитий білок CripTo виявляли за допомогою поліклональної кролячої антисироватки, одержаної проти кон'югату 17-мірного пептиду CripTo (що містить залишки 97-113 SEQ ID NO: 1) з гемоціаніном морського блювця «замкова щілина». Після центрифугування для видалення клітин проведення Вестерн-блот-аналізу показав, що білок CR(del C)-Fc ефективно секретується в кондиціоновані середовища (надосад). Надосад наносили на білок А-сефарозу (Pharmacia), і пов'язаний білок елюювали 25мМ фосфатом натрію, pH 2,8, 100мМ NaCl. Елюйований білок нейтралізували 0,5М фосфатом натрію при pH 8,6 і аналізували відносно вмісту загального білка на основі вимірювань поглинання при 240-340нм і відносно чистоти за допомогою SDS-ПААГ. Елюйований білок фільтрували через фільтр з діаметром пор 0,2 мікрона і зберігали при -70°C.

Приклад 2: Створення і скринінг антитіл

Елюйований білок CR(del C)-Fc ін'єктували мишам і використали стандартні способи гібридом, відомі фахівцям в даній області, щоб створити моноклональні антитіла.

А.Створення антитіл

Зокрема, самиць мишей Robertsonian (Jackson Labs) внутрішньоочеревинно імунізували 25мкг очищеного CR(del C)-Fc, емульгованого з повним ад'ювантом Фрейнда (GibcoBRL №15721-012). Мишей два рази піддавали бустер-імунізації внутрішньоочеревинно 25мкг CR(del C)-Fc, емульгованого з неповним ад'ювантом Фрейнда (GibcoBRL №15720-014), і один раз на кульках з білком А. Проводили скринінг сироваток і через 3 тижні після останньої бустер-імунізації миша з найвищим тит-

ром бустер-імунізували внутрішньоочередово, використовуючи 50мкг розчинного CR(del C)-Fc, за три дні до злиття. Мишу бустер-імунізували внутрішньовенно, використовуючи 50мкг CR(del C)-Fc за день до злиття. Клітини селезінки миші зливали з клітинами мієломи FL653 у співвідношенні 1 клітина селезінки: 6 клітин мієломи і висівали при щільності 100000, 33000 і 11000 клітин на ямку в 96-ямковий планшет для культури тканини в селективній середовищі. Через тиждень проводили скринінг ямок, позитивних відносно зростання, за допомогою FACS і ELISA. Проводили два злиття.

В. Скринінг антитіл

Проводили скринінг надосадів, одержаних внаслідок першого або другого злиття, спочатку на планшетах для ELISA для пізнання білків Cripto del C і/або EGF-подібного домену Cripto. Планшети ELISA покривали контрольним злитим білком (LT-бета-рецептор-Fc), щоб позбутись моноклональних антитіл, які впізнавали епітоп Fc людини. ELISA виконували як описано нижче в розділі С. У випадку першого злиття також проводили скринінг первинних надосадів відносно їх здатності впізнавати білок Cripto на клітинній поверхні лінії клітин пухлини сім'яників NCCIT за допомогою FACS. У випадку другого злиття аналізували здатність надосадів впізнавати Cripto на двох лініях пухлинних клітин, NCCIT і лінії клітин раку молочної залози DU4475, за допомогою FACS. Вторинні скринінги включали тестування здатності надосадів моноклональних антитіл впізнавати Cripto клітинної поверхні на панелі ліній пухлинних клітин (дивись результати в таблицях 1 і 2), здібності моноклональних антитіл впізнавати Cripto людини імуногістохімічно на зрізах тканини пухлини молочної залози і товстої кишки людини, здібності моноклональних антитіл блокувати при аналізі передачі сигналу Cripto-Nodal, здібності блокувати зростання ліній пухлинних клітин при аналізах на пластику або в м'якому агарі і здібності інтерналізувати Cripto клітинної поверхні.

С. ELISA

Аналізи ELISA виконували таким чином:

Матеріали:

Планшети: 96-ямкові з високою здібністю до зв'язування і планшети, що легко промиваються, Costar (07-200-642)

2-е антитіло: антитіло кози проти мишачого IgG (H+L)-HRP (P131430)

Субстрат: субстратний набір TMB Pierce (34021)

Розчин для зупинки: 1N H₂SO₄

Буфери:

Буфер для зв'язування: 0,1M NaHPO₄, pH 9,0

Блокуючий буфер: PBS+10% донорська сироватка теляти

Буфер для промивання: PBS+0,1% Твін-20

Антигени CR(del C)-Fc і CR EGF-Fc, контрольний злитий білок IgG1 людини розбавляли в буфері для зв'язування до 500нг/мл. Додавали по 100мкл на ямку та інкубували протягом 1год. при 37°C або протягом ночі при 4°C. Рідину декантували, і планшет перевертали і промокали досуха. Потім додавали 250мкл/ямку блокуючого буфера, після чого інкубували протягом 30хв. при 37°C. Рідину знов декантували, і планшет перевертали і промо-

кали досуха. Надосади розводили 1:50 в буфері для промивання і вміщували в планшети по 50мкл/ямку з подальшою інкубацією протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети 3 рази енергійно промивали 250мкл/ямку буфера для промивання. Потім додавали 100мкл/ямку 2-ого антитіла, розведеного в буфері для промивання у співвідношенні 1:10000, з подальшою інкубацією протягом 30хв. при кімнатній температурі. Потім планшети 3 рази енергійно промивали 250мкл/ямку буфера для промивання, потім додавали субстрат по 100мкл/ямку. Давали можливість забарвленню розвинути до достатньої інтенсивності, потім додавали 100мкл/ямку розчину для зупинки і проводили реєстрацію планшетів відносно поглинання при 450nm.

Д. Проточна цитометрія

Cripto-позитивні лінії клітин можна використати для аналізу моноклональних антитіл відносно зв'язування з Cripto, використовуючи фарбування клітинної поверхні і проточну цитометрію таким чином:

Клітини вивільняють з флаконів T162, використовуючи 2мл PBS з 5мМ EDTA протягом 10хв. при 37°C. Доводять до 20мл середовищем з сироваткою, декілька разів піпетують вгору і вниз, щоб роз'єднати клітини. Центрифугують при 1200об./хв. протягом 5 хвилин. Клітини промивають 5-10мл PBS з температурою 4°C з 0,1% БСА (буфер для промивання). Центрифугують при 1200об./хв. протягом 5 хвилин. Ресуспендують при концентрації 4×10⁶-10⁷/мл в буфері для промивання. Зберігають на льоду.

Готують антитіла для фарбування. Очищені антитіла розводять до 1-10мкг/мл в буфері для промивання. Додають по 50мкл клітин в 96-ямкові планшети Linbro з V-подібним дном (ICN 7632105). По одній ямці засівають клітинами для кожного з контролів кожної лінії клітин, яку необхідно аналізувати, включаючи клітини без антитіла, тільки з 2-м антитілом, з середовищем для гібридом, з надосадам антитіл позитивного контролю, якщо такий є або очищений, і контролем підкласу IgG (у випадку, використання очищених антитіл).

Засівають по одній ямці для кожного експериментального зразка для кожної лінії клітин, що аналізується. Планшет центрифугують при 1200об./хв. протягом 5 хвилин, використовуючи настільну центрифугу, при 4°C. Швидко видаляють буфер, перевертаючи планшет і струшуючи доти, поки рідина в основному не стече. Додають в ямки по 40-50мкл антитіл (або буфера для промивання у випадку ямок без антитіла або контрольних ямок тільки з 2-им антитілом). Інкубують, щонайменше, 30 хв. - 1 годину при 4°C. Планшет центрифугують при 1200об./хв. протягом 5 хвилин. Швидко видаляють розчини антитіл. Ямки двічі промивають 200мкл буфера для промивання на ямку, центрифугуючи після кожного промивання. Буфер швидко видаляють.

Клітини в кожній ямці ресуспендують в 50мкл міченого R-PE антитіла кози проти мишачого IgG, Fc-специфічного (Jackson ImmunoResearch Laboratories катал. № 115-116-071), в розведенні 1:200 (в буфері для промивання). Інкубують 20хв. при 4°C в темряві. До клітин в кожній ямці додають

150мкл буфера для промивання. Планшет центрифугують при 1200об./хв. протягом 5 хвилин. Один раз промивають 200мкл буфера для промивання на ямку. Клітини ресуспендують в 150мкл 1% PFA в PBS. Вміст кожної ямки переносять в окремі пробірки (круглодонні полістиролові пробірки об'ємом 5мл Falcon 352052). Пробірки загортають в олов'яну фольгу.

Потім вміст пробірок реєструють проточною цитометрією.

Результати двох скринінгових досліджень моноклональних антитіл, одержані вказаним способом, дали наступні дані, підсумовані в таблицях 1 і 2 нижче, де в першій колонці наведені назви субклонів гібридом, в наступних двох колонках показані результати скринінгу в ELISA, а в інших колонках показані результати аналізу проточною цитометрією, одержані на чотирьох Сріпто-позитивних лініях клітин. Результати наведені в одиницях середнього показника флуоресценції (MFI).

Таблиця 1

Характеристика анти-Сріпто-моноклонального антитіла

Субклон гібридоми	№ депозиту ATCC	ELISA Cripto delC Sups	ELISA EGF-подібний домен Cripto	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Контроль - ELISA		0,06	0,07				
Контроль - мишачий 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

Таблиця 2

Характеристика анти-Сріпто-моноклонального антитіла

Субклон гібридоми	№ депозиту ATCC	ELISA Cripto delC	ELISA EGF-подібний домен Cripto	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Контроль - ELISA		0,05	0,05				
Контроль - мишачий Ig				10	6	4	4
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

Приклад 3: Аналіз нульових клітин відносно інгібування передачі сигналу Сріпто

Нижченаведене є описом аналізу передачі сигналу в Сріпто-нульових клітинах F9, що викорис-

товується для оцінки інгібування передачі сигналу Сріпто.

День 0. 6-ямкові планшети покривають 0,1% желатином по 2мл/ямку при 37°C протягом 15хв.

Клітини висівають при щільності 6×10^5 Cripto-нульових клітин F9 на ямку.

День 1. Трансфекція:

Кожний з наступних зразків додають до 300мкл OptiMem1, щоб одержати розчин А для кожного зразка:

Зразок 1: 0,5мкг репортерної кДНК (N₂) γ -люциферази-FAST плюс 1,5мкг кДНК пустого вектора.

Зразок 2: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК FAST і 1мкг кДНК пустого вектора.

Зразок 3: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і +0,5мкг кДНК пустого вектора.

Зразок 4: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і 0,5мг кДНК пустого вектора.

Зразок 5: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і 0,5мг кДНК пустого вектора.

Зразок 6: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і 0,5мг кДНК пустого вектора.

Зразок 7: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і 0,5мг кДНК пустого вектора.

Зразок 8: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і 0,5мг кДНК пустого вектора.

Зразок 9: 0,5мкг кДНК (N₂) γ -люциферази, 0,5мкг кДНК Cripto, 0,5мкг кДНК FAST і 0,5мг кДНК пустого вектора.

Розчин В містить 30мкл ліпофектаміну плюс 270мкл OptiMem1.

Для кожного зразка змішують разом розчин А і розчин В. Інкують 45 хвилин при кімнатній температурі. Ямки промивають 2мл/ямку OptiMem1. Рідину видаляють безпосередньо перед наступною стадією.

До кожної суміші розчинів А+В додають 2,4мл OptiMem1, перемішують, додають в ямки по 1,5мл/ямку в повторах. Інкують 5 годин при 37°C. Додають 1,5мл/ямку DMEM+20% FCS, 2мМ Gin, P/S в ямки, в які вносили зразки 1-3. Анти-Cripto-антитіла додають таким чином: ямки зі зразком 4: A27F6.1, 10мкг/мл; ямки зі зразком 5: A27F6.1, 2мкг/мл; ямки зі зразком 6: A40G12.8; 10мкг/мл, ямки зі зразком 7: A40G12.8, 2мкг/мл; ямки зі зразком 8: A10B2.18, 10мкг/мл; ямки зі зразком 9: A10B2.18, 2мкг/мл.

День 2. Видаляють середовища, клітини промивають PBS, 2мл/ямку. Додають DMEM+0,5% FCS, 2мМ Gin, P/S з такими ж кількостями Cripto-антитіл, як в попередній день в ті ж самі ямки.

День 3. Виявляють сигнал люциферази. Ямки промивають PBS+Ca²⁺ і Mg²⁺, 2мл/ямку. Використовують набір LucLite, Packard катал. № 6016911. Буфер і субстрат доводять до кімнатної температури. Кімнату затемнюють. Субстрат перерозчиняють з використанням 10мл буфера. Розбавляють 1:1 PBS+Ca²⁺ і Mg²⁺. Рідину з ямок видаляють. Швидко додають 250мкл розбавленого субстрату в ямку, використовуючи пристрій для піпетування декількох зразків. Розчин перемішують і переносять по 200мкл в ямки 96-ямкового планшета з білим непрозорим дном Falcon 35-3296. Прочитують планшет в люмінометрі, використовуючи Winglow, видаючи дані в Excel.

Результати аналізу підсумовані нижче в таблиці 3.

Таблиця 3

Аналіз передачі сигналу Cripto: Інгібування анти-Cripto-моноклональними антитілами

Трансфікована кДНК	Анти-Cripto-антитіло	Відносні одиниці люмінесценції
(N ₂) γ luc	Відсутній	123
(N ₂) γ luc, FAST	Відсутній	259
(N ₂) γ luc, FAST, Cripto	Відсутній	3091
(N ₂ O) γ luc, FAST, Cripto	A27F6.1 10мкг/мл	1507
(N ₂) γ luc, FAST, Cripto	A27F6.1 2мкг/мл	2297
(N ₂) γ luc, FAST, Cripto	A40G12.8 10мкг/мл	1213
(N ₂) γ luc, FAST, Cripto	A40G12.8 2мкг/мл	2626
(N ₂) γ luc, FAST, Cripto	A10B2.18 10мкг/мл	3466
JN ₂) γ luc, FAST, Cripto	A10B2.18 2мкг/мл	3103

Приклад 4: Аналіз інгібування зростання пухлинних клітин in vitro

Інгібування передачі сигналу Cripto також можна аналізувати за допомогою вимірювання зростання клітин GEO в м'якому агарі. Дивись, наприклад, [Ciardiello et al, Oncogene. 1994 Jan; 9 (1): 291-8; Ciardiello et al., Cancer Res. 1991 Feb 1; 51 (3): 1051-4].

Спочатку розплавляють 3% бактоагар. Зберігають при 42°C на водяній бані. Потім змішують 3% розчин бактоагару із заздалегідь нагрітим повним середовищем, щоб одержати розчин 0,6% бактоагару, який утримують при 42°C. Вміщують

4мл розчину в 6-см чашки і дають можливість вихолонати, щонайменше, протягом 30 хвилин з утворенням нижнього шару агару. Трипсинізують клітини GEO і ресуспендують до 10^5 клітин/мл в повному середовищі. До суспензій клітин додають антитіла, що аналізуються, або контролю, титруючи антитіла від 20мкг до 1мкг. Змішують рівні об'єми суспензій клітин GEO і 0,6% бактоагару і нашаровують по 2мл зверху на нижній шар агару. Дають можливість вихолонати, щонайменше, протягом 1 години. Інкують протягом 14 днів при 37°C в CO₂-інкубаторі. Підраховують колонії, видимі без застосування мікроскопа. Відсутність колоній в

порівнянні з негативними контролями свідчить про те, що антитіла, які тестуються, інгібують зростання пухлинних клітин *in vitro*.

Таблиця 4

Результати аналізу зростання в м'якому агарі

Антитіло	Середня кількість колоній
Відсутній	109,0
Відсутній	104,3
A27F6 20мкг/мл	82,0
A27F6.1 10мкг/мл	78,3
A27F6.1 5мкг/мл	79,0
A27F6.1 1мкг/мл	108,7
B6O7.10 20мкг/мл	102,3
B6G7.10 10мкг/мл	71,7

Приклад 5: Аналіз інгібування зростання пухлинних клітин *in vivo*

Щоб оцінити інгібування зростання пухлинних клітин лінію пухлинних клітин людини імплантують підшкірно бестимусним мишам *nude* і досліджують вплив антитіл згідно з винаходом з використанням

Вказаний аналіз використали для одержання результатів, показаних в таблиці 4, для антитіл A27F6.1 і B6G7.10, які обидва виявляють здатність зменшувати зростання колоній клітин Geo. або без додаткових хіміотерапевтичних обробок, які можуть надавати синергетичну або адитивну дію на інгібування пухлини.

Аналіз можна проводити альтернативно з використанням різних ліній пухлинних клітин, наприклад, таких як GEO (добре диференційована лінія клітин раку товстої кишки людини, що культивується *in vitro*, одержана з американської колекції типів тканин (ATCC)), DU-4475 (лінія клітин раку молочної залози *in vitro*, одержана з ATCC), NCCIT (лінія клітин пухлини сім'яника, одержана з ATCC) або інших ліній, відомих в даній області. Одним з прикладів таких аналізів є наступний аналіз:

Тварин індивідуально маркують проколюванням вух. Лінію клітин GEO пересівають *in vitro* або *in vivo* протягом 1-4 пасажів. Тваринам імплантують клітини GEO підшкірно в область правого боку. Можна використати наступні групи тварин:

№ групи	Обробка	Кількість мишей
	Контрольний фізіологічний розчин, 0,2	20
1	мл/миша, в/о три рази на тиждень (M, W, F)	
2	мАт, низька доза, в/о	10
3	мАт, середня доза, в/о	10
4	мАт, висока доза, в/о	10
5	5-FU, 30мг/кг/ін'єкц., в/о, 3 прийоми/тиждень (M, W, F)	10
6	Цисплатин, 2мг/кг/ін'єкц., п/ш, 3 прийоми/тиждень (M, W, F)	10
7	Адріаміцин, 1,6мг/кг/ін'єкц., в/о, 3 прийоми/тиждень (M, W, F)	10
8	Іринотекан, 10мг/кг/ін'єкц., в/о, 5 прийомів/тиждень (M-F)	10
9	мАт, низька доза, в/о + 5-FU (проміжна доза)	10
10	мАт, середня доза, в/о + 5-FU (проміжна доза)	10
11	мАт, висока доза, в/о + 5-FU (проміжна доза)	10
12	мАт, низька доза, в/о + цисплатин (проміжна доза)	10
13	мАт, середня доза, в/о + цисплатин (проміжна доза)	10
14	мАт, висока доза, в/о + цисплатин (проміжна доза)	10
15	мАт, низька доза, в/о + адріаміцин (проміжна доза)	10
16	мАт, середня доза, в/о + адріаміцин (проміжна доза)	10
17	мАт, висока доза, в/о + адріаміцин (проміжна доза)	10
18	мАт, низька доза, в/о + іринотекан (проміжна доза)	10
19	мАт, середня доза, в/о + іринотекан (проміжна доза)	10
20	мАт, висока доза, в/о + іринотекан (проміжна доза)	10

День 0: Імплантують пухлину, реєструють початкову вагу тіла тварин.

День 1: Починають обробку, як вказано вище.

День 5: Починають вимірювання розміру пухлини і ваги тіла і продовжують вимірювання два рази на тиждень аж до закінчення експерименту.

Оцінюють вимірювання початкової ваги тіла, розміру пухлини, гістологію при умертвленні та імуногістохімічний аналіз пухлин, аналізуючи експресію Сріпто, зростання пухлини та їх інгібування.

Приклад 6: Модель коенотрансплантованої пухлини *in vivo* - анти-Cripto-антитіло, що блокує Cys-багатий домен

Щоб оцінити відповідь NCCIT лінію клітин карциноми сім'яників людини імплантували підшкірно з антитілом, яке зв'язується з Cys-багатим доме-

ном Cripto. Експериментальні способи перераховані нижче. Результати показані на Фігурі 1.

Способи і матеріали

Тварини: використали самців бестимусних мишей *nude*. Тварин індивідуально нумерували проколами на вухах.

Пухлина: NCCIT, культивована *in vitro* лінія клітин карциноми сім'яників людини з медіастинальних змішаних зародкових клітин, початково одержана з американської колекції типів тканин. Лінію клітин передівали *in vitro* протягом шести пасажів в RPMI-1640/10% FBS без антибіотиків. Тваринам підшкірно імплантували 5×10^6 клітин/0,2мл матригелю в правий бік тварин.

№ групи	Обробка	Кількість мишей
1	Контрольний наповнювач, (25мМ фосфат натрію, 100мМ хлорид натрію, pH 7,2), 0,2мл/миша, в/о, Q14D, обробки починаються в день -1	20
2	A8G3.5, 1мг/кг/ін'єк., в/о, Q14D, обробки починаються в день -1	10
3	A8G3.5, 3мг/кг/ін'єк., в/о, Q14D, обробки починаються в день -1	10
4	A8G3.5, 10мг/кг/ін'єк., в/о, Q14D, обробки починаються в день -1	10
5	Цисплатин, 2мг/кг/ін'єк., п/ш, 3 х/тиждень (M, W, F), 6 обробок, обробки починаються в день 1	10

Схема обробки

День -1: Мишей випадковим чином розподіляли в контрольні групи і групи обробки. Реєстрували початкову вагу тіла тварин. Проводили перші обробки в групах з антитілом. Готували дозовані розчини. Фахівці проводили обробки наосліп аж до закінчення аналізу.

День 0: Імпантували пухлину. Розганяли бактеріальні культури з пухлини, імпантованої мишам.

День 1: Проводили першу обробку в групі, позитивній відносно хіміотерапевтичного засобу.

День 4: Реєстрували вимірювання початкового розміру пухлини для одержання вихідної лінії розміру пухлини на матригелі. Продовжували реєструвати розмір пухлини і вагу тіла мишей 2х/тиждень. Дослідження контролювали щодня і робили замітки при будь-якому незвичайному спостереженні за тваринами.

Кінцеві точки: початкова вага тіла, вимірювання розміру пухлини і ваги тіла.

Приклад 7: Модель ксенотрансплантованої пухлини in vivo - анти-Cripto-антитіло, що блокує EGF-подібний домен

Щоб оцінити відповідь NCCIT лінію клітин карциноми сім'яників людини імпантували підшкірно з антитілом, яке зв'язується з EGF-подібним доменом CripTo. Експериментальні способи перераховані нижче. Результати показані на Фігурі 2.

Способи і матеріали:

Тварини: використали самців бестимусних мишей nude. Тварин індивідуально нумерували проколами на вухах.

Пухлина: NCCIT, культивована in vitro лінія клітин карциноми сім'яників людини з медіастинальних змішаних зародкових клітин, початково одержана з американської колекції типів тканин. Лінію клітин пересівали in vitro протягом восьми пасажів в RPMI-1640/10% FBS без антибіотиків. Тваринам підшкірно імпантували 5×10^6 клітин/0,2мл матригелю в правий бік тварин.

№ групи	Обробка	Кількість мишей
1	Контрольний наповнювач, (25мМ фосфат натрію, 100мМ хлорид натрію, pH 7,2), 0,2мл/миша, в/о Q14D, обробки починаються в день -1	18
2	A27F6.1, 1мг/кг/ін'єк., в/о, Q14D, обробки починаються в день -1 ударною дозою 2,6мг/кг/миша	10
3	A27F6.1, 10мг/кг/ін'єк., в/о, Q14D, обробки починаються в день -1 ударною дозою 21,2мг/кг/миша	10
4	Цисплатин, 2мг/кг/ін'єк., п/ш, 3 х/тиждень (M, W, F), 6 обробок, обробки починались в день 1	10

Схема обробки

День -1: Мишей випадковим чином розподіляли в контрольні групи і групи обробки. Реєстрували початкову вагу тіла тварин. Проводили перші обробки в групах з антитілом. Готували дозовані розчини. Фахівці проводили обробки наосліп аж до закінчення аналізу.

День 0: Імпантували пухлину. Розганяли бактеріальні культури з пухлин, імпантованих мишам. Бактеріальні культури були негативними відносно забруднення через 24 і 48 годин після відбору зразка.

День 1: Проводили першу обробку в групі, позитивній відносно хіміотерапевтичного засобу.

День 4: Реєстрували вимірювання початкового розміру пухлини для одержання вихідної лінії розміру пухлини на матригелі. Продовжували реєструвати розмір пухлини і вагу тіла мишей 2х/тиждень. Дослідження контролювали щодня і робили замітки при будь-якому незвичайному спостереженні за тваринами.

Кінцеві точки: початкова вага тіла, вимірювання розміру пухлини і ваги тіла.

Приклад 8: Анти-Cripto-мАт, які блокують зв'язування ALK4

Для того, щоб визначити чи можуть CripTo-специфічні моноклональні антитіла перешкоджати здатності CripTo зв'язуватись з Alk4, рецептором активіну типу I, автори застосували аналіз проточною цитометрією з використанням лінії клітин 293, яка стабільно експресує Alk4. Щоб одержати таку лінію клітин клітини 293 спільно трансфікували плазмідом, яка експресує Alk4, мічений на С-кінці НА-епітопом, і плазмідом, яка експресує лікарський засіб пуроміцин, у співвідношенні 10:1. Потім проводили селекцію трансфікованих клітин у відношенні пуроміцину аж до утворення колоній. Потім колонії збирали, розмножували і аналізували відносно експресії Alk4, використовуючи Вестерн-блот-аналіз НА. Виявлено, що клон 21 (293-Alk4-21) експресує високі рівні Alk4 у порівнянні з контролем, нетрансфікованими клітинами 293.

Щоб проаналізувати зв'язування Cripto-Alk4 за допомогою проточної цитометрії, використали очищену розчинну форму Cripto людини (а/к 1-169), злили з Fc-частиною IgG людини Cr(delC)-Fc. Приблизно 5мкг/мл Cr(delC)-Fc або контрольного білка Fc інкубували з 3×10^5 клітин 293-Alk4-21 на льоду протягом 30 хвилин в загальному об'ємі 50мкл буфера для FACS (PBS з 0,1% БСА). У випадку зразків, що містять анти-Cripto-антитіла, 5мкг/мл Cr(delC)-Fc заздалегідь інкубували з 50мкг/мл кожного анти-Cripto-антитіла (A10.B2.18, A40.G12.8, A27.F6.1, A8.H3.1, A19.A10.30, A6.F8.6, A8.G3.5, A6.C12.11) на льоду перед додаванням клітин. Потім клітини промивали буфером для FACS, і пов'язаний білок Fc визначали за допомогою інкубування клітин з кон'югованим з R-фікоеритрином антитілом кози проти IgG людини

(специфічним по відношенню до Fc-фрагмента) з Jackson Immunologies. Потім зразки знов промивали, фіксували в 1% параформальдегіді в PBS і аналізували, використовуючи стандартні способи проточної цитометрії. Результати FACS-аналізу показані на Фігурі 3.

Деякі з варіантів описаного вище винаходу в загальних рисах вказані нижче і включають наступні варіанти, але не обмежені ними. Як буде зрозуміло фахівцям в даній області можна здійснити численні зміни і модифікації різних варіантів винаходу, не відходячи від суті винаходу. Мається на увазі, що всі такі зміни входять в об'єм винаходу.

Повний опис кожної публікації, цитованої в даній заявці, включений в даний опис у вигляді посилання.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Biogen, Inc.
Sanicola-Nadel, Michele
Williams, Kevin
Schiffer, Susan
Rayhorn, Paul

<120> Антитіла, які блокують Cripto, і їх застосування

<130> A117 PCT

<140> , ще не привласнений

<141> 2002-04-16

<150> 60/286,782

<151> 2001-04-26

<150> 60/293,020

<151> 2001-05-17

<150> 60/301,091

<151> 2001-06-26

<150> 60/367,002

<151> 2002-03-22

<160> 2

<170> FastSEQ для Windows версія 4.0

<210> 1

<211> 188

<212> блнк...

<213> Homo Sapien

<400> 1

Met	Asp	Cys	Arg	Lys	Met	Ala	Arg	Phe	Ser	Tyr	Ser	Val	Ile	Trp	Ile
1				5					10				15		
Met	Ala	Ile	Ser	Lys	Val	Phe	Glu	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Gly
			20					25					30		
His	Gln	Glu	Phe	Ala	Arg	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ala	Phe	Arg	Asp
		35				40						45			
Asp	Ser	Ile	Trp	Pro	Gln	Glu	Glu	Pro	Ala	Ile	Arg	Pro	Arg	Ser	Ser
		50				55					60				
Gln	Arg	Val	Pro	Pro	Met	Gly	Ile	Gln	His	Ser	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg
65					70					75				80	
Thr	Cys	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Ser	Phe	Cys	Ala
				85					90					95	

33 85163 34

Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
 100 105 110
 Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
 115 120 125
 Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
 130 135 140
 Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
 165 170 175
 Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
 180 185

<210> 2
 <211> 188
 <212> Blank...
 <213> Homo Sapien

<400> 2

Met Asp Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1 5 10 15
 Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
 20 25 30
 His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala Phe Arg Asp
 35 40 45
 Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
 50 55 60
 Gln Arg Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
 65 70 75 80
 Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Glu Ser Phe Cys Ala
 85 90 95
 Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
 100 105 110
 Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
 115 120 125
 Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
 130 135 140
 Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
 165 170 175
 Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
 180 185

Список последовательностей

Последовательность CR-1 з 188 амінокислот являє собою наступну послідовність [SEQ

ID NO: 1]:

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKSVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS
 IWPQEEPAIRPRSSQVRVPPMGIQHSKELNRTCCNLGGTCMLGSFCACPPPS
 FYGRNCEHDVRKENCSSVPHDTWLPKKCSLCKCWNGQLRCFPQAFPLPGCD
 GLVMDEHLVASRTPELPSPARTTTFMLVGICLSIQSY

Последовательность CR-3 з 188 амінокислот являє собою наступну послідовність [SEQ

ID NO: 2]:

MDCRKMFVSYSVIWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS
 IWPQEEPAIRPRSSQVRVPPMGIQHSKELNRTCCNLGGTCMLGSFCACPPSF
 YGRNCEHDVRKENCSSVPHDTWLPKKCSLCKCWNGQLRCFPQAFPLPGCDGL
 VMDEHLVASRTPELPSPARTTTFMLAGICLSIQSY

Відповідь NCCIT, лінії клітин карциноми сім'яників людини,
 на анти-CFC-мАт, що блокують Сіпрто, A8G3.5

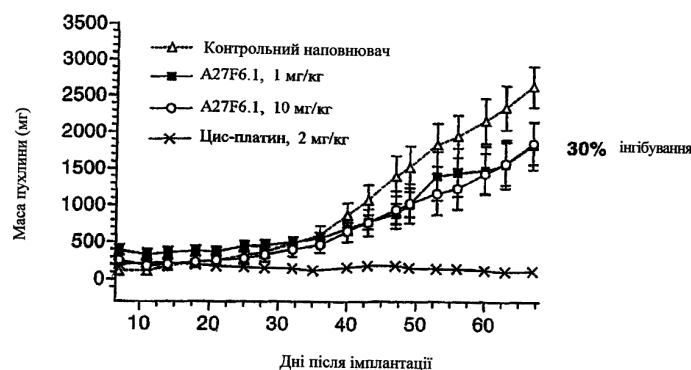
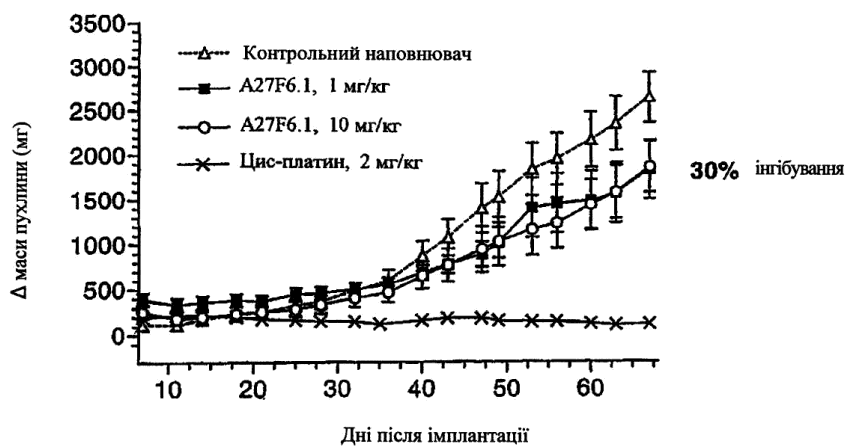


Fig. 1

Відповідь NCCIT, лінії клітин карциноми сім'яників людини,
на анти-EGF-мАт, що блокують Сгіпто, А27F6.1



Фіг. 2
FACS: Клітини 293/ALK4, що зв'язують CR-Fc



Фіг. 3