

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년06월22일 10-0592357 2006년06월15일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2003-7014078	(65) 공개번호	10-2004-0028744
(22) 출원일자	2003년10월27일	(43) 공개일자	2004년04월03일
번역문 제출일자	2003년10월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2002/011950	(87) 국제공개번호	WO 2002/088170
국제출원일자	2002년04월17일	국제공개일자	2002년11월07일

(30) 우선권주장	60/286,782	2001년04월26일	미국(US)
	60/293,020	2001년05월17일	미국(US)
	60/301,091	2001년06월26일	미국(US)
	60/367,002	2002년03월22일	미국(US)

(73) 특허권자 바이오젠 아이텍 엠에이 인코퍼레이티드
미국 매사츄세츠 02142 캄브리지 캄브리지 센터 14

(72) 발명자 사니콜라-나델마이클
미국매사츄세츠02142윈체스터메이플로드4

 윌리엄스케빈
 미국매사츄세츠01760나틱말덴스트리트7

 슈퍼수잔
 미국매사츄세츠02421렉싱턴몰랜드에브뉴6

 레이혼폴
 미국매사츄세츠02035폭스보로우미리미치로드48

(74) 대리인 김진희
 김성기

심사관 : 김지윤

(54) 크립토 차단 항체 및 그 용도

요약

본 발명은 크립토 차단 항체 또는 그 생물학적 작용성 단편과 그 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 크립토에 결합하고 크립토 신호 전달을 조절하는 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 크립토에 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하는 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 크립토에 결합하고 증양 성장을 조절하는 항체를 제공하기도 한다. 본 발명은 또한 크립

토에 결합하고 신호 전달을 조절하며 종양 성장을 조절하는 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 크립토에 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하며 종양 성장을 조절하는 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 항체를 치료, 진단 및 연구 용도로 사용하는 방법을 제공한다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 출원은 미국 출원 제60/367,002호(2002년 3월 22일 출원)의 일부 계속 출원이고, 후자의 출원은 미국 출원 제60/301,091호(2001년 6월 26일 출원)의 일부 계속 출원이며, 이 후자의 출원은 미국 출원 제60/293,020호(2001년 5월 17일 출원)의 일부 계속 출원이고, 상기 후자의 출원은 미국 출원 제60/286,782호(2001년 4월 26일 출원)의 일부 계속 출원이다. 전술한 특허 출원들의 각각의 전체 개시 내용은 본원에 참고로 인용한다.

본 발명은 일반적으로는 유전학, 세포 생물학 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 크립토에 결합하여 크립토의 신호 전달을 조절하는 항체, 그러한 항체들을 포함하는 키트 및 상기 항체들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

크립토(Cripto)는 인간의 배아 암종 라이브러리의 cDNA 선별에서 우연히 분리된 188개의 아미노산 잔기로 이루어진 세포 표면 단백질이다(Ciccocioppa 등, 1989, EMBO J., vol. 8, no. 7, pp.1987-1991). 크립토 단백질은 2개 이상의 특징적인 도메인, 즉 시스테인-풍부 도메인과, 표피 성장 인자(EGF) 패밀리에서 발견되는 도메인과 유사한 것을 주요 특징으로 하는 도메인을 가진다. 크립토는 본래 EGF 군의 일원으로 분류되었다(Ciccocioppa 등, 상기 참조). 그러나, 계속적인 분석 결과 크립토는 공지의 EGF 수용체 중 어디에도 결합하지 않으며, 그 EGF-유사 도메인이 실제로는 EGF 패밀리로부터 분기된다는 것이 밝혀졌다(Bianco 등, 1999, J. Biol. Chem., 274:8624-8629).

크립토 신호 전달 경로는 계속되는 연구에도 불구하고 규명되지 않고 있으며, 문헌에서는 여러 가지 상이한 경로, 예를 들어 MAP 키나제 경로(DeSantis 등, 1997, Cell Growth Differ., 8:1257-1266; Kannan 등, 1997, J. Biol. Chem., 272:3330-3335), TGF- β 경로(Gritsman 등, 1999, Development, 127:921-932; Schier 등, 2000, Nature, 403:385-389)의 활성화, Wnt 경로와의 가능한 상호작용(Salomon 등, Endocr Relat Cancer. 2000 Dec;7(4):199-226) 및 EGF 경로와의 교차 통신(Bianco 등, 1999, J. Biol. Chem., 274:8624-8629) 등의 기능을 지지하고 있다.

미국 특허 제5,256,643호 및 이와 관련된 두 개의 분할 출원(미국 특허 제5,654,140호 및 제5,792,616호)은 인간의 크립토 유전자, 크립토 단백질 및 크립토에 대한 항체를 개시하고 있다.

미국 특허 제5,264,557호 및 이와 관련된 세 개의 분할 출원(미국 특허 제5,620,866호, 제5,650,285호 및 제5,854,399호)은 인간의 크립토 관련 유전자 및 단백질을 개시하고 있다. 크립토 관련 단백질에는 결합하지만 크립토 단백질 자체에 결합함으로써 교차 반응하지 않는 항체들도 개시되어 있다.

크립토 단백질 과발현은 다수의 종양 유형(유방암, 고환암, 결장암, 폐암, 난소암, 방광암, 자궁암, 자궁 경부암, 췌장암 및 위암을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아님)과 관련되어 있는데, 이 사실은 인간 조직을 소형 크립토 펩티드에 대해 형성된 토끼의 폴리클로날 항체로 면역 염색하여 입증하였다(Panico 등, 1996, Int. J. Cancer, 65:51-56; Byrne 등, 1998, J Pathology, 185:108-111; De Angelis 등, 1999, Int J Oncology, 14:437-440). 그러므로, 본 기술 분야에는 그러한 과발현을 제어, 제한 및/또는 방지하는 수단, 크립토 신호 전달을 조절하는 수단 및 크립토 발현의 결과(즉, 세포 형질전환의 촉진 및/또는 유지)를 조절하는 수단이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명은 크립토에 특이적으로 결합하는 신규 항체, 그러한 항체의 제조 방법 및 사용 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 크립토에 결합하고, 크립토 신호 전달 또는 단백질 상호작용을 조절하는 항체, 예를 들어, 크립토와의 단백질 상호작용으로부터 생성되는 신호가 하방으로 조절되도록 크립토에 결합하는 항체를 제공한다. 또한 본 발명은 크립토에 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하는 항체를 제공한다. 또한 본 발명은 크립토에 결합하고 중앙 성장을 조절하는 항체를 제공하기도 한다. 본 발명은 또한 크립토에 결합하고, 크립토 신호 전달을 조절하고 중앙 성장을 조절하는 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 크립토에 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하며 중앙 성장을 조절하는 항체를 제공한다.

본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 항체는 항체 A6C12.11, A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A8H3.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310), A40G12.8(ATCC 수탁 번호 PTA-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319), B6G7.10(ATCC 수탁 번호 PTA-3313), B11H8.4가 결합하는 에피토프의 군에서 선택되는 에피토프에 특이적으로 결합한다.

본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 크립토의 리간드/수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 크립토는 CR-1(서열 번호 1) 또는 CR-3(서열 번호 2) 중에서 선택될 수 있다. 더 구체적인 예에서, 리간드/수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체의 예로는 A6C12.11, A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A19A10.30, A8H3.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3315), A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310), A40G12.8(ATCC 수탁 번호 PTA-3316), A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312) 및 B6G7.10(ATCC 수탁 번호 PTA-3313)이 있다.

한 구체예에서, 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프는 EGF-유사 도메인 내에 있다. EGF-유사 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로는 A40G12.8(ATCC 수탁 번호 PTA-3316), A8H3.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3315), A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310), B6G7.10(ATCC 수탁 번호 PTA-3313), A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314) 및 A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312)가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프는 cys-풍부 도메인 내에 있다. cys-풍부 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로는 A19A10.30, A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318) 및 A6C12.11이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프는 크립토의 아미노산 잔기 46~62에 이르는 도메인 내에 있다. 크립토의 아미노산 잔기 46~62에 이르는 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로는 A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319) 및 A17A2.16이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

본 발명은 또한 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토 신호 전달을 조절할 수 있는 항체를 고려한다. 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토 신호 전달을 조절할 수 있는 항체로는 A40G12.8(ATCC 수탁 번호 PTA-3316), A8H3.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3315), A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310) 및 A6C12.11이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토 신호 전달을 조절할 수 있는 본 발명의 항체는 크립토의 EGF-유사 도메인 또는 cys-풍부 도메인 내의 에피토프에 결합한다.

본 발명은 또한 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하는 항체를 고려한다. 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단할 수 있는 항체로는 A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318) 및 A6C12.11이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단할 수 있는 본 발명의 항체는 크립토의 EGF-유사 도메인 또는 cys-풍부 도메인 내의 에피토프에 결합한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 크립토에 특이적으로 결합하고 중앙 성장을 조절할 수 있는 항체를 고려한다. 크립토에 특이적으로 결합하고 중앙 성장을 조절할 수 있는 항체로는 A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310), B6G7.10(ATCC 수탁 번호 PTA-3313) 및 A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317)가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

한 구체예에서, 크립토에 특이적으로 결합하고 종양 성장을 조절할 수 있는 본 발명의 항체는 크립토의 EGF-유사 도메인 또는 cys-풍부 도메인 내의 에피토프에 결합한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 크립토에 특이적으로 결합하고, 크립토 신호 전달을 조절할 수 있으며, 종양 성장을 조절할 수 있는 항체를 고려한다. 크립토에 특이적으로 결합하고, 크립토 신호 전달을 조절할 수 있으며, 종양 성장을 조절할 수 있는 항체로는 A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310)이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

한 구체예에서, 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토 신호 전달을 조절할 수 있으며 종양 성장을 조절할 수 있는 본 발명의 항체는 크립토의 EGF-유사 도메인 또는 cys-풍부 도메인 내의 에피토프에 결합한다.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단할 수 있으며 종양 성장을 조절할 수 있는 항체를 고려한다. 크립토에 특이적으로 결합하고 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단할 수 있으며 종양 성장을 조절할 수 있는 항체로는 A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317)이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A8H3.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3315), A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310), A40G12.8(ATCC 수탁 번호 PTA-3316), A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312), B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319) 및 B6G7.10(ATCC 수탁 번호 PTA-3313)으로 구성된 군에서 선택되는 하이브리도마에 의해 생산되는 항체를 제공한다.

본 발명의 항체로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체 및 인간 항체를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

본 발명은 또한 전술한 항체들 중 1종 이상을 포함하며, 크립토를 발현시키는 종양을 가진 피험체에게 투여하기 위한 조성물을 제공한다. 더 구체적인 예에서 피험체는 인간이다. 본 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 전술한 항체들은 화학요법에 접합시키거나, 비접합 화학요법제와의 조합물로 제공될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면으로는 전술한 조성물을 샘플에 첨가하는 단계를 포함하는, 시험관내에서 샘플 중의 종양 세포의 성장을 조절하는 방법이 고려된다.

전술한 조성물의 유효량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 생체내에서 피험체의 종양 세포의 성장을 조절하는 방법도 고려된다. 구체적인 예에서, 피험체는 인간이다.

본 발명의 또 하나의 측면은 전술한 조성물을 유효량으로 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 크립토를 과발현시키는 종양을 가진 피험체를 치료하는 방법이다. 투여용 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 화학요법에 접합된 항체 및 비접합 화학요법제와 함께 투여되는 항체를 들 수 있다.

본 발명의 방법은 종양 세포의 성장을 조절하고/하거나, 종양을 가진 피험체(즉, 인간)를 치료하는 데 특히 유용하며, 이 때 상기 종양 세포는 유방, 고환, 결장, 폐, 난소, 방광, 자궁, 자궁 경부, 췌장 및 위 종양 세포로부터 선택된다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 조직이 크립토를 발현시키는지 여부를 결정하는 방법을 고려하는데, 이 방법은 전술한 항체들 중 어느 것을 사용하는 면역분석법으로 피험체 유래의 조직을 분석하는 단계를 포함한다. 세포주가 크립토를 과발현시키는지 여부를 결정하는 방법도 고려되는데, 이 방법은 전술한 항체들 중 어느 것을 사용하는 면역분석법으로 세포주를 분석하는 단계를 포함한다.

본 발명의 상기 및 기타 측면은 후술하는 발명의 상세한 설명에서 더욱 상세히 제시된다.

발명의 상세한 설명

본 발명자들은 크립토에 특이적으로 결합하는 항체 및 크립토 신호 전달 또는 단백질 상호작용을 조절하고/하거나, 크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하고/하거나, 종양 세포의 성장을 조절하는 데 사용되는 상기 항체의 용도를 발견하였다. 천연 크립토 단백질 또는 크립토의 변성된 형태 중 어느 하나의 리간드/수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체; EGF-유사 도메인, cys-풍부 도메인 또는 아미노산 잔기 46~150을 포함하는 영역으로부터의 펩티드(예

를 들어 약 3 ~ 약 20개 아미노산)에 결합하는 항체; 크립토에 결합하고 크립토 신호 전달을 조절하는 항체; 크립토에 결합하고 종양 세포 성장을 조절하는 항체; 및 크립토에 결합하고 크립토 신호 전달을 조절하며 종양 세포 성장을 조절하는 항체 등을 비롯하여 크립토에 특이적으로 결합하는 다양한 유형의 항체들을 발견하였다. 상기 항체들은 리간드/수용체 결합 도메인에 결합하거나, 크립토 신호 전달을 조절하거나, 또는 종양 세포 성장을 조절하는 항체를 선별하기 위한 전통적인 시험관내 분석법을 이용하여 선별한다.

본 발명의 방법은 종양의 성장률(정상 조직에 대한 비정상적 성장률)이 적어도 부분적으로는 크립토에 의존하는 경우에 해당하는 포유동물의 악성 또는 양성 종양의 치료에 유용하다. 비정상적 성장률은 정상 항상성에 요구되는 성장률을 초과하며 동일한 기원의 정상 조직에 대한 성장률을 초과하는 성장물이다.

정의

본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어들의 정의는 다음과 같다. 대부분의 용어는 당업자에 의해 그 용어라고 이해되는 그러한 의미를 가진다. 이하 또는 본 명세서의 어딘가에서 특별히 정의되는 용어들은 대개는 본 발명의 내용에서 제시되는 의미를 가지며, 당업자라면 통상 이해하는 의미이다.

본 명세서에서 "영역(region)"이란 용어는 생체 분자의 1차 구조의 물리적으로 인접한 부분을 의미한다. 단백질의 경우에, 영역은 그 단백질의 아미노산 서열의 인접 부분에 의해 정해진다.

본 명세서에서 "도메인"이란 용어는 생체 분자의 공지의 또는 추측되는 기능에 기여하는 생체 분자의 구조 부분을 의미한다. 도메인은 영역 또는 그 일부분과 동일한 공간에 걸쳐 있는(co-extensive) 것일 수 있다; 도메인은 또한 특정 영역의 전부 또는 일부 외에도 특정 영역과는 구별되는 생체 분자의 일부분을 포함할 수도 있다. 단백질 도메인의 예로는 세포의 도메인(크립토, CR-1(서열 번호 1) 및 CR-3(서열 번호 2)을 비롯하여 크립토의 대략 잔기 31에서 대략 잔기 188에 이름) 및 경막 도메인(크립토, CR-1(서열 번호 1) 및 CR-3(서열 번호 2)을 비롯하여 크립토의 대략 잔기 169에서 대략 잔기 188에 이름)을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 크립토 단백질의 리간드/수용체 결합 도메인은 크립토, CR-1(서열 번호 1) 및 CR-3(서열 번호 2)을 비롯하여 크립토의 대략 잔기 75에서 대략 잔기 150에 이르며, 크립토, CR-1(서열 번호 1) 및 CR-3(서열 번호 2)을 비롯하여 크립토의, 예를 들어, 대략 잔기 75에서 대략 잔기 112에 이르는 크립토의 EGF-유사 도메인과, 크립토, CR-1(서열 번호 1) 및 CR-3(서열 번호 2)을 비롯하여 크립토의, 예를 들어, 대략 잔기 114에서 대략 잔기 150에 이르는 크립토의 시스테인 풍부 도메인을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 다수의 모노클로날 항체는 EGF-유사 또는 cys-풍부 도메인에 결합하는 것으로 확인되었다. 또한, 모노클로날 항체 A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319) 및 A17A2.16은 EGF-유사 도메인의 상류인 아미노산 잔기 46~62에 이르는 영역 내의 도메인에서 형성된 에피토프에 결합하는 것으로 확인되었다. 하기 실시예 3 참조. 리간드/수용체 결합 도메인 내의 에피토프는 입체적(conformational) 천연 크립토 단백질에서 형성되든지 또는 변성된 크립토 단백질에서 형성되든지 간에 항체들이 결합할 수 있는 에피토프이다.

본 명세서에서 "항체"라는 용어는 완전한 원(intact) 항체와, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 이들의 기타 단편을 의미한다. 완전한 원 항체로는 모노클로날 항체(예, 쥐의 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화된 항체가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 표준 재조합 DNA 기법을 이용하여 다양한 형태의 항체를 제조할 수 있다(Winter 및 Milstein, Nature 349:293-99, 1991). 예를 들어, "키메라" 항체는 동물 항체 유래의 항원 결합 도메인이 인간의 불변 도메인에 연결되도록 제조할 수 있다(재조합 DNA 기법을 이용하여 중쇄의 힌지 및 불변 영역 및/또는 경쇄의 불변 영역의 전부 또는 일부를 인간 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 상응하는 영역으로 대체한, 원래 비인간 포유동물로부터 유도된 항체)(예를 들어, Cabilly 등, 미국 특허 제4,816,567호; Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55, 1984 참조). 키메라 항체는 인간의 임상 치료에 사용할 때 동물 항체에 의해 유발되는 면역원성 반응을 감소시킨다.

"인간화된" 재조합 항체 역시 합성할 수 있다. 인간화된 항체는 재조합 DNA 기법을 이용하여 항원 결합에 요구되지 않는 아미노산의 일부 또는 전부를 인간 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 상응하는 영역의 아미노산으로 대체한, 원래 비인간 포유동물로부터 유도된 항체이다. 즉, 이들 항체는 특이적 항원 결합을 담당하는 영역이 내부에 삽입되어 있으며 주로 인간의 면역글로불린 서열을 포함하는 키메라이다(예를 들어, PCT 특허 출원 WO 94/04679호 참조). 동물들을 소정의 항원으로 면역화하고, 해당 항체를 분리하며, 특이적 항원 결합을 담당하는 가변 영역 서열의 일부를 제거한다. 그 후, 그 동물 유래의 항원 결합 영역을 이 영역이 결실된 인간 항체 유전자의 적당한 위치 내로 클로닝한다. 인간화된 항체는 인간 치료용 항체의 이중성(중간) 서열의 사용을 최소화하며, 원치 않는 면역 반응을 유발할 가능성이 적다. 영장류화된 항체도 유사하게 제조할 수 있다.

본 발명의 또 다른 구체예는 인간 항체의 사용을 포함하는데, 이 항체는 하나 이상의 인간 면역글로불린 도입유전자(transgene)를 보유하는 유전자 도입 동물과 같은 비인간 동물에서 생산할 수 있다. 미국 특허 제5,569,825호에 기재된 바와 같이, 그러한 동물을 하이브리도마 생산용 비장세포 공급원으로서 사용할 수 있다.

항체 단편 및 1가(univalent) 항체를 본 발명의 방법 및 조성물에 사용할 수도 있다. 1가 항체는 제2 중쇄의 Fc(또는 스템) 영역에 결합된 중쇄/경쇄 이량체를 포함한다. "Fab 영역"은 중쇄의 Y 분지 부분을 포함하는 서열 및 전체 경쇄와 대체로 동등하거나 유사하고, 집합적으로(결집체로서) 항체 활성을 나타내는 것으로 확인된, 사슬의 해당 부분들을 의미한다. Fab 단백질은, 결집체가 특정 항원 또는 항원패밀리와 특이적으로 반응할 수 있는 한, 이들 중 어느 것이 공유 결집되든지 비공유적 결집되든지 간에, Fab 단백질은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄의 결집체(통상 Fab'라 칭함)뿐 아니라 항체의 두 개의 분절 Y에 해당하는 사량체(통상 F(ab)₂라 칭함)를 포함한다.

본 발명의 항체들 중 어느 것은, 경우에 따라 하기에 정의된 바와 같이 화학요법에 접합시킬 수 있다.

본 명세서에서 "결합"이라는 용어는 항체와 단백질 간의 상호작용을 포함하여, 두 단백질 또는 화합물이나 회합된 단백질 또는 화합물이나 그 조합 간의 물리적 또는 화학적 상호작용을 의미한다. 결합으로는 이온 결합, 비이온 결합, 수소 결합, 반데르발스 결합, 소수성 상호작용 등을 포함한다. 물리적 상호작용인 결합은 직접 또는 간접 결합일 수 있는데, 간접 결합은 다른 단백질 또는 화합물의 효과를 통해 또는 그 효과에 의해 발생할 수 있다. 직접 결합은 다른 단백질 또는 화합물의 효과를 통해 또는 그 효과에 의해 발생하는 것이 아니라, 대신에 다른 실질적인 화학적 중간체 없이 일어나는 상호작용을 의미한다. 결합은 다수의 상이한 방식으로 검출할 수 있다. 결합을 검출하는 방법은 당업자에게는 주지되어 있다.

본 명세서에서 "크립토를 내부화(internalizing)할 수 있는 항체"란 크립토를 세포 표면으로부터 제거하면서 세포 내로 진입하는 항체를 의미한다. 형광 표지된 크립토 모노클로날 항체를 사용하여 크립토를 내부화할 수 있는 크립토 항체를 선별할 수 있다. 항체가 크립토 양성 세포 내로 내부화하는지를 확인하기 위해서는, 형광 및/또는 공초점 현미경으로 세포를 관찰함으로써 세포 내로의 항체의 형광 신호의 흡수를 분석할 수 있다. 내부화된 항체들은 세포질 및/또는 세포의 소낭에서 형광 신호로서 관찰되어진다. 크립토를 내부화할 수 있는 크립토 항체의 비제한적인 예로는 A27F6.1 및 B3F6.17이 있다.

본 명세서에서 "화합물"이란 용어는 임의의 확인 가능한 화합물 또는 분자를 의미하며, 그 예로는 이온, 원자, 소형 분자, 펩티드, 단백질, 당(sugar), 뉴클레오티드 또는 핵산을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니며, 그러한 화합물은 천연 화합물 또는 합성 화합물일 수 있다.

본 명세서에서 "조절하다(modulate) 또는 "변형시키다(modify)"라는 용어는 특정 활성 또는 단백질의 양, 질 또는 효과의 증가 또는 감소를 의미한다.

본 명세서에서 "크립토 신호 전달을 조절하다"라는 말은 크립토 활성의 양, 질 또는 효과를 약 5%, 바람직하게는 10%, 더 바람직하게는 20%, 더욱 바람직하게는 30%, 더 바람직하게는 40%, 더 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 60%, 더 바람직하게는 70%, 더 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 100% 증가 또는 감소시키는 것을 의미한다. 활성은 실시예 3에 제시된 무기능성(null) 세포 분석과 같은 당해 분야에 공지된 분석법으로 측정할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 크립토와 다른 단백질 간의 단백질 상호작용은 본 발명 항체의 결합을 통해 하방으로 유사하게 조절된다.

본 명세서에서 "크립토와 ALK4 간의 상호작용을 차단하다"라는 말은 크립토와 ALK4 간의 상호작용, 즉 결합을 약 5%, 바람직하게는 10%, 더 바람직하게는 20%, 더욱 바람직하게는 30%, 더 바람직하게는 40%, 더 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 60%, 더 바람직하게는 70%, 더 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 100% 증가 또는 감소시키는 것을 의미한다. 활성은 실시예 8에 제시된 결합 분석과 같은 당해 분야에 공지된 분석법으로 측정할 수 있다.

본 명세서에서 "시험관내에서 종양 세포의 성장을 조절하다"라는 말은 시험관내에서 종양 세포의 수를 약 5%, 바람직하게는 10%, 더 바람직하게는 20%, 더욱 바람직하게는 30%, 더 바람직하게는 40%, 더 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 60%, 더 바람직하게는 70%, 더 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 100% 증가 또는 감소시키는 것을 의미한다. 종양 세포 성장의 시험관내 조절은 실시예 4에 제시된 GEO 세포 연결 아가 분석과 같은 당해 분야에 공지된 분석법으로 측정할 수 있다.

본 명세서에서 "생체내에서 종양 세포의 성장을 조절하다"라는 말은 생체내에서 종양 세포의 수를 약 5%, 바람직하게는 10%, 더 바람직하게는 20%, 더욱 바람직하게는 30%, 더 바람직하게는 40%, 더 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 60%, 더 바람직하게는 70%, 더 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 100% 증가 또는 감소시키는 것을 의미한다. 종양 세포 성장의 생체내 조절은 실시예 5에 제시된 것과 같은 당해 분야에 공지된 분석법으로 측정할 수 있다.

"예방"이라는 용어는 유기체가 비정상적 상태를 발달시키거나 진행시키는 가능성을 감소시키는 것을 의미한다.

"치료"라는 용어는 유기체 내 비정상적 상태를 적어도 부분적으로 완화 또는 제거하는 치료 효과를 나타내는 것을 의미한다. 치료란 용어는 억제된 종양 성장의 유지 및 경감의 유도를 포함한다.

"치료 효과"란 용어는 비정상적 상태의 억제를 의미한다. 치료 효과는 비정상적 상태의 하나 이상의 징후를 어느 정도까지 경감시킨다. 비정상적 상태의 치료와 관련하여, 치료 효과는 다음 중 하나 이상을 의미할 수 있다: (a) 세포의 증식, 성장 및/또는 분화의 증가 또는 감소; (b) 세포 사멸의 억제(즉, 완화 또는 정지) 또는 촉진; (c) 변성의 억제; (d) 비정상적 상태와 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 경감시킴; 및 (e) 세포 집단의 기능을 향상시킴. 비정상적 상태에 대한 효능을 나타내는 화합물은 본 명세서에 기재하는 바와 같이 확인할 수 있다.

"투여"라는 용어는 유기체의 세포 또는 조직 내로 화합물을 도입시키는 방법을 의미한다. 비정상적 상태는 유기체의 세포 또는 조직이 유기체 내부 또는 외부에 존재하는 경우에 예방하거나 치료할 수 있다. 유기체 외부에 존재하는 세포는 세포 배양 접시에서 또는 다른 유기체에서 유지하거나 성장시킬 수 있다. 유기체 내에 보유된 세포의 경우에는, 비제한적으로, 경구, 비경구, 피하 주사 및 에어로졸 적용을 비롯하여 화합물을 투여하기 위한 다양한 기법이 당해 분야에 존재한다. 유기체의 외부에 있는 세포의 경우에는, 비제한적으로, 세포 미세주사 기법, 형질전환 기법 및 담체 기법을 비롯하여 화합물을 투여하기 위한 다수의 기법이 당해 분야에 존재한다. 투여는 경구, 정맥내, 복강내, 근육내 투여 등과 같이 당해 분야에 공지된 여러 방식으로 수행할 수 있다. 생체내 요법에 사용할 경우, 본 발명의 항체는 유효량으로 피험체에게 투여한다. 본 명세서에서 "유효량"이란 이로운 또는 원하는 임상 결과를 나타내기에 충분한 양(즉, 환자의 종양 부하를 제거 또는 감소시키는 양)이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여할 수 있다. 본 발명의 목적상, 본 발명 항체의 유효량은 크립토 관련 질병 상태, 특히 크립토 관련 종양의 발달을 완화, 안정화 또는 지연시키기에 충분한 항체의 양이다. 상기한 효능의 지시인자의 검출 및 측정법은 아래에서 설명한다. 통상적인 치료 계획의 한 예로는 본 발명 항체를 주단위 계획으로 약 2~5 mg/kg의 양으로 정맥 주입으로 투여하는 것을 포함한다. 항체들은 환자가 입원을 요하지 않는다면, 외래 환자 화학주입 단위(chemoinfusion)로 투여한다. 당해 분야에 공지된 기타 투여 계획 역시 고려한다.

비정상적 상태는 또한 유기체로의 신호 변환 경로에 이상이 있는 세포군에 본 발명 항체를 투여함으로써 예방 또는 치료할 수 있다. 그 후 화합물의 투여가 유기체 기능에 미치는 효과를 모니터링할 수 있다. 유기체는 인간이 바람직하다.

"크립토 과발현"은 발현이 통계학적 유의 수준의 양으로 인접 정상 조직의 크립토 발현보다 더 많은 조직에 의한 크립토의 발현을 의미한다.

"화학요법제"란 종양 성장의 억제, 억제된 종양 성장의 유지 및/또는 경감의 유도에 치료 효과를 나타내는 것으로 당해 분야에 확인되어 있는 임의의 작용제를 말하며, 그 예로는 천연 화합물, 합성 화합물, 단백질, 변형된 단백질 및 방사성 화합물이 있다. 여기서 고려되는 화학요법제로는 본 발명 항체에 접합될 수 있는 작용제 또는 항체에 접합시키지 않고 본 발명 항체와 함께 사용될 수 있는 작용제를 들 수 있다. 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 화학요법제의 예로는 방사성접합체(90Y, 131I, 99mTc, 111In, 186Rh 등), 종양 활성화된 전구약물(메이탄시노이드, CC-1065 유사체, 클리케아미신 유도체, 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드 등), 리신, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

화학요법제는 본 발명 항체에 접합시키지 않은 채 본 발명 항체와 함께 사용할 수 있는데(즉, 비접합된 화학요법제), 그 예로는 백금(즉, 시스 백금), 안트라사이클린, 뉴클레오시드 유사체(푸린 및 피리미딘), 탁산, 캄프토테신, 에피포도필로톡신, DNA 알킬화제, 엽산염 길항제, 빈카 알칼로이드, 리보뉴클레오티드 리덕타제 억제제, 에스트로겐 억제제, 프로게스테론 억제제, 안드로겐 억제제, 아로마타제 억제제, 인터페론, 인터류킨, 모노클로날 항체, 탁술, 캄프토테신, 아드리아마이신(독스), 5-FU 및 젤시타빈이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 그러한 화학요법제는 항체와 비접합 화학요법제의 동시 투여에 의해 본 발명 항체와 함께 본 발명의 실시예에 이용될 수 있다.

"약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제"란 당해 분야에 알려져 있고 본 발명 항체의 투여에 이용되는 생물학적으로 비활성인 화합물을 의미한다. 허용 가능한 담체는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Gennaro 편집, Mack Publishing Co., 1990]에 기재되어 있다. 허용 가능한 담체로는 생체적합성, 비활성 및 생체흡수성 염, 완충액, 올리고당류, 다당류, 중합체, 점탄성 화합물, 예를 들어 히알루론산, 점도 개선제, 방부제 등을 포함할 수 있다.

"피험체(subject)"란 척추 동물, 특히 포유동물종의 일원을 말하며, 가축, 스포츠 동물 및 영장류(인간을 포함)를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

본 발명의 항체

본 발명의 항체는 크립토에 특이적으로 결합한다: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 크립토는 CR-1 크립토 단백질, CR-3 크립토 단백질 및 그 단편을 포함한다. 상기 단편은 세포외 또는 세포내 도메인, EGF-유사 도메인, cys-풍부 도메인, 수용체 결합 도메인 등과 같이 전체 도메인일 수 있다. 상기 단편은 또한 크립토 단백질의 임의의 도메인 내의 인접 및 비인접 에피토프를 포함할 수도 있다.

CR-1에 대한 188개 아미노산 서열은 다음과 같다(서열 번호 1):

```
MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDSS
IWPQEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSEFCACPPS
FYGRNCEHDVRKENCSSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
GLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLVGIQLSIQSY
```

CR-3에 대한 188개 아미노산 서열은 다음과 같다(서열 번호 2):

```
MDCRKMVRFYSYSVIWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDSS
IWPQEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLESEFCACPPSF
YGRNCEHDVRKENCSSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGL
VMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLAGIQLSIQSY
```

한 구체예에서, 본 발명의 항체는 크립토의 EGF-유사 도메인 내의 에피토프에 결합한다. EGF-유사 도메인은 성숙 크립토 단백질의 대략 아미노산 잔기 75에서 대략 아미노산 잔기 112에 이른다. EGF-유사 도메인 내의 에피토프는 아미노산 잔기의 선형 또는 비선형 길이를 포함할 수 있다. 고려되는 선형 에피토프의 예로는 대략 잔기 75~85, 80~90, 85~95, 90~100, 95~105, 100~110 또는 105~112를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, EGF 도메인 내의 에피토프는 변성된 크립토 단백질에 비하여 입체적 천연 크립토 단백질 내에 형성된 에피토프이다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 크립토의 cys-풍부 도메인 내의 에피토프에 결합한다. cys-풍부 도메인은 성숙 크립토 단백질의 대략 아미노산 잔기 114 에서 대략 아미노산 잔기 150에 이른다. cys-풍부 도메인 내의 에피토프는 아미노산 잔기의 선형 또는 비선형 길이를 포함할 수 있다. 고려되는 선형 에피토프의 예로는 대략 잔기 114~125, 120~130, 125~135, 130~140, 135~145 또는 140~150를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, cys-풍부 도메인 내의 에피토프는 변성된 크립토 단백질에 비하여 입체적 천연 크립토 단백질 내에 형성된 에피토프이다.

일단 항체가 형성되면, 크립토에 대한 항체의 결합은 ELISA와 같이 당해 분야에 공지된 표준 기법을 이용하여 분석할 수 있는 반면에, 세포 표면 상의 크립토의 존재는 실시예 2에 제시된 바와 같은 유세포 분석법(FACS)을 이용하여 분석할 수 있다. 그러한 결합을 측정하는 임의의 다른 기법을 이용할 수도 있다.

본 발명은 크립토 또는 그 단편에 특이적인 항체(예를 들어, 본 발명 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 CDR 서열을 포함하는 화합물을 비롯하여, 모노클로날 및 폴리클로날 항체, 단일쇄 항체, 키메라 항체, 이중 작용성/이중 특이성 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 및 상보성 결정 영역(CDR)-이식된 항체)를 제공한다. Fab, Fab', F(ab')₂ 및 F_v를 비롯한 항체 단편도 본 발명에 의해 제공된다. 본 발명 항체의 결합을 설명하는 데 사용할 때 "특이적인" 및 "선택적인"이란 용어는 본 발명 항체의 가변 영역이 크립토 폴리펩티드를 인식하여 결합한다는 것을 나타낸다. 본 발명의 특이적 항체는 또한 항체의 가변 영역 외부에 있고, 특히 분자의 불변 영역 내에 있는 서열과의 상호작용을 통해 다른 단백질(예를 들어, S. 오리어스(*S. aureus*) 단백질 A 또는 ELISA 기법에서의 기타 항체)과 상호작용할 수 있음은 이해될 것이다. 본 발명의 항체(즉, 리간드/수용체 결합 도메인과 아미노산 잔기 46~62에 이르는 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체)의 결합 특이성을 측정하기 위한 선별 분석법은 당해 분야에는 공지되어 있고 통상적으로 실시되고 있다. 그러한 분석법의 종합적인 설명

은 문헌[Harlow 등(편집), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6]을 참조할 수 있다. 항체가 크립토 폴리펩티드에 특이적이라면, 크립토 단백질의 단편을 인식하고 결합하는 항체 역시 고려된다. 본 발명의 항체는 당해 분야에서 공지되어 있고 통상 실시되는 임의의 방법을 이용하여 생산할 수 있다.

한 구체예에서, 본 발명은 크립토의 리간드/수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 항체 특이성은 이하에서 더 상세히 설명한다. 그러나, 문헌에 이미 기재되어 있는 다른 폴리펩티드로부터 생성될 수 있고, 크립토와 우연히 교차 반응할 수 있는(예를 들어, 두 폴리펩티드에 유사한 에피토프가 우연히 존재함으로 인해) 항체는 "교차 반응성" 항체로 간주된다는 것이 강조되어야 한다. 그러한 교차 반응성 항체는 크립토에 "특이적"인 항체는 아니다. 항체가 크립토의 에피토프에 특이적으로 결합하는지 여부의 결정은 당해 분야에 공지된 웨스턴 블로팅 분석과 같은 각종 분석법 중 어느 것을 이용하여 수행한다. 크립토를 발현시키는 세포를 확인하고, 또 크립토 리간드/수용체 결합 활성을 조절하는 데에는, 크립토 단백질의 세포외 에피토프(즉, 세포 외부에서 발견되는 크립토 단백질의 부분)에 특이적으로 결합하는 항체가 특히 유용하다.

한 구체예에서, 본 발명은 항체들 중 1종 이상이 크립토에 특이적인 본 발명의 항체인 폴리클로날 항체를 포함하는 무세포 조성물을 제공한다. 동물로부터 분리된 항혈청이 예시적인 조성물이며, 물 또는 기타 희석제, 부형제 또는 담체에 재현탁된 항혈청의 항체 분획을 포함하는 조성물 역시 예시적인 조성물이다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 모노클로날 항체를 제공한다. 모노클로날 항체는 단일 항원성 부위에 대해 유도된 것으로 특이성이 매우 크다. 또한, 통상 각종 에피토프에 대해 유도된 각종 항체를 포함하는 폴리클로날 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 유도된 것이다. 모노클로날 항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석 방법의 선택성 및 특이성을 향상시키는 데 유용하다. 모노클로날 항체의 또 다른 장점은 이들이 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양물에 의해 합성된다는 것이다. 그러한 항체를 생산하는 하이브리도마 역시 본 발명의 한 측면을 구성한다.

또 다른 관련 구체예에서, 본 발명은 크립토에 특이적인 항체에 특이성이 있는 항-인자형(anti-idiotypic) 항체를 제공한다. 항-인자형 항체에 관한 더 상세한 설명은, 예를 들어 미국 특허 제6,063,379호 및 제5,780,029호를 참조할 수 있다.

항체가 화학적으로 또는 재조합 기법에 의해 분리될 수 있는 비교적 작은 항원 결합 도메인을 보유한다는 것은 널리 공지되어 있다. 그러한 도메인은 자체가 유용한 크립토 결합 분자이고, 또한 인간 항체 내로 재도입되거나 화학요법제 또는 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 따라서, 또 다른 구체예에서, 본 발명은, 존재한다면, 단편 및 관련 분자가 크립토에 결합하는 크립토-특이 항체의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 비제한적인 예로, 본 발명은 단일쇄 항체 및 CDR-이식 항체인 폴리펩티드를 제공한다. CDR-이식 항체에 대한 더 상세한 설명은, 예를 들어 미국 특허 제5,859,205호 참조할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 비인간 항체는 당해 분야에 공지된 방법 중 어느 하나에 의해 인간화할 수 있다. 인간화된 항체는 생체내 치료용으로 유용하다. 또한, "인간화된" 재조합 항체를 합성할 수도 있다. 인간화된 항체는 재조합 DNA 기법을 이용하여 항원 결합에 요구되지 않는 아미노산의 일부 또는 전부를 인간 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 상응하는 영역으로부터의 아미노산으로 대체한, 원래 비인간 포유동물로부터 유도된 항체이다. 즉, 이들은 특이적 항원 결합을 담당하는 영역이 내부에 삽입되어 있으며 주로 인간의 면역글로불린 서열을 포함하는 키메라이다(예를 들어, PCT 특허 출원 WO 94/04679호 참조). 동물들을 소정의 항원으로 면역화하고, 해당 항체를 분리하며, 특이적 항원 결합을 담당하는 가변 영역 서열의 일부를 제거한다. 그 후에, 그 동물 유래의 항원 결합 영역을 이 영역이 결실된 인간 항체 유전자의 적당한 위치 내로 클로닝한다. 인간화된 항체는 인간 치료용 항체의 이중성(중간) 서열의 사용을 최소화하며, 원치 않는 면역 반응을 유발할 가능성이 적다. 영장류(예, 레서스 원숭이, 비비 및 침팬지) 항체 유전자를 사용하여 영장류화된 항체도 유사한 방법으로 제조할 수 있다. 그 후에, 항체 구조틀 내로 다른 변형을 도입하여 친화도 또는 면역원성을 조절할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호, 제5,693,761호, 제5,693,762호 및 제6,180,370호를 참조할 수 있다.

본 발명의 또 다른 구체예는 인간 항체의 사용을 포함하는데, 인간 항체는 하나 이상의 인간 면역글로불린 도입유전자를 보유하는 유전자 도입 동물과 같은 비인간 동물에서 생산할 수 있다. 본 명세서에서 참고로 인용하는 미국 특허 제 5,569,825호, WO 00076310호, WO 00058499호 및 WO 00037504호에 기재된 바와 같이 그러한 동물을 하이브리도마 생산용 비장세포 공급원으로서 사용할 수 있다.

신호 조절

또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 크립토에 결합하고, 크립토 신호 전달 또는 크립토-단백질 상호작용을 조절한다. 크립토 활성의 과발현은 간엽 세포 특성을 촉진하는 탈분화된 상태, 증가된 증식 및 세포 이동(Salomon 등, BioEssays 21:61-70, 1999; Ciardiello 등, Oncogene 9:291-298, 1994; 및 Baldassarre 등, Int. J. Cancer 66:538-543, 1996), 신생물 형성에서 관찰되는 세포 형질전환과 관련된 표현형을 초래할 수 있다.

항-크립토 항체의 활성과 이들 항체가 크립토 신호 전달을 조절하는 능력을 시험하는 한 가지 방법은 F9-크립토 넷-아웃(knock-out; KO) 세포주를 사용하는 것이다(Minchiotti 등, Mech. Dev. 90:133-142, 2000). 크립토는 제노푸스 배에서 smad2 인산화 및 전사 인자 FAST를 자극하고, 전사 인자 FAST의 활성은 FAST 조절 요소-루시퍼라제 리포터 유전자로부터 루시퍼라제 활성을 측정하여 모니터링할 수 있다(Saijoh 등, Mol. Cell 5:35-47, 2000). F9-크립토 KO 세포는 크립토 유전자가 결실되어 있으며, 따라서 크립토 및 크립토-의존성 신호 전달 기능이 없다(Minchiotti 등, Mech. Dev. 90:133-142, 2000). 크립토 신호 전달은 크립토, FAST 및 FAST 조절 요소-루시퍼라제 유전자 구조체로 형질감염시켜 F9 크립토 세포에서 평가할 수 있다. 크립토 의존성 FAST 루시퍼라제 활성은 크립토 cDNA 및 FAST cDNA가 세포주 내로 형질감염되지 않는 한 상기 세포주에서 관찰되지 않을 것이다. 크립토-의존성 Nodal 신호 전달을 차단할 수 있는 항체는 크립토 신호 전달 기능을 차단하는 항체이다.

연질 아가 분석에서의 성장(하기 실시예 4 참조)과 같이 크립토의 활성을 측정할 수 있는 기타 분석법이 당업자에 의해 이용될 수 있다. 세포가 연질 아가에서 성장하는 능력은 세포 형질전환과 관련되고, 분석은 종양 세포 성장의 억제를 측정하는 전통적 시험관내 분석이다. 활성의 억제를 측정하는 데 유용한 기타 분석법으로는 플라스틱 상에서의 시험관내 분석법 등이 있다.

치료적 용도

본 발명의 항체는 또한 종양 세포 성장의 조절, 크립토를 검출 또는 정량하기 위한 진단 목적 및 크립토의 정제와 같은 치료적 용도에 유용하다.

본 발명의 한 구체예에서는, 크립토에 특이적으로 결합할 수 있고 환자의 종양 세포의 성장을 조절하는 항체가 제공된다. 한 구체예에서, 종양 세포는 고환, 유방, 결장, 폐, 난소, 방광, 자궁, 자궁 경부, 췌장 및 위의 종양 세포이다.

또 다른 구체예에서는, 크립토에 특이적으로 결합할 수 있고 크립토를 과발현시키는 종양 세포의 성장을 조절하는 항체가 제공된다. 한 구체예에서, 종양 세포는 유방, 고환, 결장, 폐, 난소, 방광, 자궁, 자궁 경부, 췌장 및 위의 암에서 유래한 세포주와 같이 크립토를 과발현시키는 종양 세포주이다.

항-크립토 항체는 하기 실시예 4에 예시한 바와 같이, 당업자에 의해 이용되는 표준 프로토콜에 따라 유효 항암제로서의 생체내 활성에 대해 선별할 수 있다. 그러한 프로토콜의 예는 국립 암 연구소(NCI)에 의해 그 "생체내 암 모델 선별" 프로토콜(NIH 공보 번호 84-2635(1984년 2월)에서 요약되어 있다.

본 발명의 또 하나의 구체예에서, 본 발명의 항체는 암성 종양을 가진 환자를 치료하는 데 사용된다.

본 발명의 항체는 약학적으로 허용되는 부형제와 조합하여 환자에게 치료 유효량으로 투여한다. 종양 성장을 억제하는 방법에 관한 설명은, 예를 들어 미국 특허 제6,165,464호를 참조할 수 있다.

본 발명은 에피토프가 크립토의 EGF-유사 도메인 또는 cys-풍부 도메인 내에 있는 경우를 비롯하여(이에 국한되지 않음) 크립토의 리간드/수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체의 유효량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 크립토의 이상 수치(즉, 상승 또는 저하)와 관련된 질환을 앓고 있는 피험체를 치료하는 방법도 포함한다.

본 발명은 크립토와 함께 특이적으로 복합체를 형성하고, 하기에 제시된 항체들로 구성된 군에서 선택되는 항체를 유도하는 에피토프에 대해 유도된 유효량의 항체를 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 크립토의 이상 수치(즉, 상승 또는 저하)와 관련된 질환을 앓고 있는 피험체를 치료하는 방법도 포함한다: A6C12.11, A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A8H3.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), A27F6.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3310), A40G12.8(ATCC 수탁 번호 PTA-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319) 및 B6G7.10(ATCC 수탁 번호 PTA-3313).

크립토의 검출을 통한 진단은 본 발명의 신규 항체를 사용하는 표준 결합 분석을 통해 용이하게 수행하여, 당업자가 구체적으로 다양한 샘플, 배양물 등에서 크립토의 존재를 검출할 수 있게 한다.

본원에 설명한 목적들 중 어느 하나에 사용하기 위한 본 발명의 항체를 포함하는 키트 역시 본 발명에 포함된다. 일반적으로, 본 발명의 키트는 또한 그 항체가 면역특이적인 대조군 항원을 포함한다. 구체에는 시약 일체와 그 사용 설명서를 포함하는 키트를 포함한다.

본 발명의 추가적인 특징은 하기의 예시적 실시예를 참고하면 명백하게 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 cys-풍부 차단 항-크립토 항체에 대한 인간 고환 암종 세포주 NCCIT의 반응에 대한 평가 결과를 도시한 것이다.

도 2는 EGF-유사 도메인 차단 항-크립토 항체에 대한 인간 고환 암종 세포주 NCCIT의 반응에 대한 평가 결과를 도시한 것이다.

도 3은 ALK4 결합을 차단하는 크립토 모노클로날 항체에 대한 FACS 분석의 결과를 도시한 것이다.

실시예

실시예 1: 크립토의 발현 및 정제

인간 IgG₁ Fc 도메인(즉, "CR(del C)-Fc")에 융합된 크립토의 인간 크립토 아미노산 잔기 1~169[서열 번호 1의 아미노산 1~169]를 코딩하는 cDNA를 벡터 pEAG1100에 서브클로닝하여 pSGS480으로 명명된 발현 플라스미드를 구성하였다. 상기 벡터에 대한 더 상세한 설명은 공개류종인 미국 특허 제60/233,148호(2000년 9월 18일 출원)를 참조할 수 있다. 벡터 pEAG1100은 GIBCO-BRL 라이프 테크놀로지스 플라스미드 pCMV-스포트-베타갈의 유도체인데, CHO 일시적 형질감염에서의 그 용도가 문헌[Schifferli 등, 1999, Focus 21:16]에 기재되어 있다. 이것은 리포터 유전자 베타-갈락토시다제 NotI 단편을 플라스미드 pCMV-스포트-베타갈(카탈로그 번호 10586-014)로부터 다음과 같이 제거하여 구성하였다: 상기 플라스미드는 NotI 및 EcoRV로 분해하고 4.38 kb의 NotI 벡터 골격 단편을 겔 정제하여 걸찰시켰다. 걸찰된 DNA로 적격성이. 콜라이 DH5 알파를 형질전환시켰다. pEAG1100은 분리된 단일 콜로니로부터 원하는 재조합체를 보유하는 플라스미드로서 분리하였다. 프로모터, 폴리링커 및 전사 종결 신호에 이르는 pEAG1100의 서열을 확인하였다.

플라스미드 pSGS480은 CHO 세포에 일시적 형질감염시키고, 이 세포들을 28°C에서 7일 동안 배양하였다. 상기 세포 및 조절(conditioned) 배지 중의 CR(del C)-Fc 단백질의 존재를 웨스턴 블롯 분석에 의해 관찰하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, 조절 배지 및 크립토 형질감염된 세포 유래의 세포들을 환원 조건 하에 4~20% 구배 겔로 SDS-PAGE 하고, 니트로셀룰로스에 전기영동으로 이전시키고, 크립토 17량체 펩티드(서열 번호 1의 잔기 97~113을 포함)-키홀 림펫 헤모시아닌 접합체에 대한 토끼 폴리클로날 항혈청으로 크립토 융합 단백질을 검출하였다. 원심분리하여 세포를 제거한 후 수행한 웨스턴 블롯 분석 결과에 의하면 CR(del C)-Fc 단백질이 조절된 배지(상청액) 내로 효과적으로 분비된 것으로 확인되었다. 상청액을 단백질 A-세파로스(파마시아)에 적용하고, 결합된 단백질을 25 mM 인산나트륨(pH 2.8), 100 mM NaCl로 용출시켰다. 용출된 단백질은 0.5 M 인산나트륨(pH 8.6)으로 중화시키고, 240 ~ 340 nm에서 흡광도를 측정하여 전체 단백질 함량을 분석하였으며, 순도는 SDS-PAGE로 분석하였다. 용출된 단백질을 0.2 마이크론 필터에 통과시켜 여과하고, -70°C에서 보관하였다.

실시예 2: 항체의 생성 및 선별

용출된 CR(del C)-Fc 단백질을 마우스에 주사하고, 당업자에게 공지된 표준 하이브리도마 기법을 이용하여 모노클로날 항체를 생산하였다.

A. 항체의 생산

구체적으로, 자성 로버트소니언 마우스(잭슨 랩)를 완전 프로인트 면역보조제(Gibco BRL #15721-012)로 유화시킨 정제된 인간 CR del C-Fc 25 µg을 복강내 투여하여 면역화하였다. 이 마우스에 불완전 프로인트 보조제(Gibco BRL #15720-

014)로 유화시킨 CR del C-Fc 25 μg 을 복강내로 2회 재투여하고, 단백질 A 비드 상에서 1회 정제하였다. 혈청을 선별하고, 마지막 재투여 3주 후에, 최상의 역가를 가진 마우스에 주입 3일 전에 가용성 CR del C-Fc 50 μg 을 복강내로 재투여하였다. 마우스에게 주입 전날 CR del C-Fc 50 μg 를 정맥내로 재투여하였다. 마우스 비장 세포를 FL653 골수종 세포와 1 비장 : 6 골수종의 비율로 융합시키고, 선별 배지에서 96웰 조직 배양 평판 내로 웰당 100,000, 33,000 및 11,000개 세포의 비율로 도말하였다. 성장에 대해 양성인 웰을 FACS로, 1주 후에는 ELISA로 선별하였다. 두 번의 융합을 실시하였다.

B. 항체의 선별

1차 또는 2차 융합으로부터 생성된 상청액을 크립토 del C 및/또는 크립토 EGF-유사 도메인 단백질의 인식에 대하여 ELISA 평판 상에서 먼저 선별하였다. 대조군 융합 단백질(LT-베타 수용체-Fc)을 ELISA 평판에 코팅하여 인간 Fc 에피토프를 인식한 모노클로날 항체를 제거하였다. ELISA는 섹션 C에서 후술하는 바와 같이 수행하였다. 1차 융합에서는 또한, 1차 상청액을 이들이 고환 종양 세포주 NCCIT 상의 세포 표면 크립토 단백질을 인식하는 능력에 대해 FACS에 의해 선별하였다. 2차 융합의 경우에는, 상청액이 두 종양 세포주 NCCIT 및 유방암 세포주 DU4475 상의 크립토를 인식하는 능력을 FACS에 의해 분석하였다. 2차 선별은 모노클로날 항체 상청액이 일군의 종양 세포주 상의 세포 표면 크립토를 인식하는 능력(결과는 표 1 및 2 참조), 모노클로날 항체가 인간 유방 및 결장 종양 조직 절편 상에서 인간 크립토를 면역조직화학적으로 인식하는 능력, 모노클로날 항체가 크립토-노달 신호 전달 분석에서 차단하는 능력, 플라스틱 또는 연질 아가 분석에서 종양 세포주의 성장을 차단하는 능력 및 세포 표면 크립토를 내부화하는 능력을 시험하는 것을 포함하였다.

C. ELISA

ELISA 분석은 다음과 같이 수행하였다:

재료:

평판: 코스타 고결합능 용이-세척 96웰 평판(07-200-642)

2차 항체: 피어스 Gt 항-Ms IgG(H+L)-HRP(P131430)

기질: 피어스 TMB 기질 키트(34021)

반응 종결 용액: 1 N H_2SO_4

완충액:

결합 완충액: 0.1 M NaHPO_4 pH 9.0

차단 완충액: PBS + 10% 공여자 송아지 혈청

세척 완충액: PBS + 0.1% 트윈-20

항원 CR-del-C-Fc 및 CR-EGF-Fc, 대조군 hu IgG1 융합 단백질을 결합 완충액으로 500 ng/ml로 희석시켰다. 웰당 100 μl 를 첨가하고 37°C에서 1 시간 또는 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 액체는 따라 버리고, 평판은 뒤집어 마를 때까지 압지로 빨아들였다. 웰당 250 μl 의 차단 완충액을 첨가한 다음, 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 다시, 액체를 따라 버리고, 평판을 뒤집어 마를 때까지 압지로 빨아들였다. 상청액을 세척 완충액에서 1:50으로 희석시키고, 웰당 50 μl 를 도말한 다음, 실온에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 평판들을 웰당 250 μl 의 세척 완충액으로 3회 격렬히 세척하였다. 그 후, 세척 완충액으로 1:10,000으로 희석시킨 2차 항체를 웰당 100 μl 씩 첨가하고, 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 후, 평판들을 웰당 250 μl 의 세척 완충액으로 3회 격렬히 세척한 다음, 웰당 100 μl 의 기질을 첨가하였다. 충분히 진한 발색 반응이 전개되도록 한 후, 웰당 100 μl 의 반응 종결 용액을 첨가하고, 450 nm에서 평판들의 흡광도를 판독하였다.

D. 유세포 분석법

다음과 같이 세포 표면 염색 및 유세포 분석법을 이용하여, 모노클로날 항체가 크립토에 결합하는지를 분석하기 위해 크립토 양성 세포주를 사용할 수 있다.

5 mM EDTA를 함유하는 2 ml의 PBS를 포함한 T162 플라스크로부터 37°C에서 10분 동안 세포를 방출시킨다. 혈청 함유 배지로 20 ml로 만들고, 피펫을 사용하여 상하로 수차례 흡입, 흡출하여 세포들을 분리하였다. 1200 rpm으로 5분 동안 회전시킨다. 0.1% BSA를 함유한 4°C PBS(세척 완충액) 5~10 ml로 세포를 세척한다. 1200 rpm으로 5분 동안 회전시킨다. 세척 완충액에서 $4 \times 10^6 \sim 10^7$ /ml로 재현탁시킨다. 얼음 위에서 보관한다.

염색을 위해 항체를 준비한다. 정제된 항체를 세척 완충액으로 1~10 µg/ml로 희석시킨다. 50 µl의 세포를 96웰 린브로(Linbro) V자형 바닥 평판(ICN 7632105)에 첨가한다. 항체가 없는 세포, 2차 항체만 있는 세포, 하이브리도마 배지, 양성 대조군 항체 상청액(입수 가능하거나 정제되는 경우), 및 IgG 서브클래스 대조군(정제된 항체를 사용하는 경우)을 비롯하여, 분석하고자 하는 각 세포주에 대한 각 대조군용으로 1개의 웰에 세포를 도말한다.

분석하고자 하는 각 세포주에 대한 각각의 실험 샘플용으로 1개의 웰에 세포를 도말한다. 4°C에서 테이블 톱 원심분리기를 사용하여 1200 rpm으로 5분 동안 평판을 회전시킨다. 평판을 뒤집고 액체가 거의 제거될 때까지 흔들어 줌으로써 완충액을 제거한다. 40~50 µl의 항체(또는 무-항체 및 2차 항체만 있는 대조군 웰의 경우 세척 완충액)를 웰에 첨가한다. 4°C에서 30분 내지 1 시간 동안 항온처리한다. 평판을 1200 rpm으로 5분 동안 회전시킨다. 항체 용액을 털어버린다. 매회 세척 후에 회전시키면서 웰당 200 µl의 세척 완충액으로 웰을 2회 세척한다. 완충액을 털어버린다.

Fc 특이적인 R-PE 표지된 염소 항-마우스 IgG(잭슨 임뮤노리서치 래보러토리즈 카탈로그 번호 115-116-071)의 1:200 희석액(세척 완충액 중에) 50 µl로 각 웰에 세포를 재현탁시킨다. 4°C 암실에서 20분 동안 항온처리한다. 각 웰의 세포에 150 µl의 세척 완충액을 첨가한다. 1200 rpm으로 5분 동안 평판을 회전시킨다. 웰당 200 µl의 세척 완충액으로 1회 세척한다. PBS 중의 1% PFA 150 µl에 세포를 재현탁시킨다. 각 웰의 내용물을 별개의 튜브(5 ml의 펠콘 폴리스티렌 둥근 바닥 튜브-352052)로 옮긴다. 주석 호일로 튜브를 감싼다.

그 후 튜브의 내용물을 유세포 분석법으로 판독한다.

상기 방법으로 생산한 모노클로날 항체의 2회 스크리닝 결과에 의해 하기 표 1 및 2에 요약된 결과가 얻어졌는데, 하기 표의 첫 번째 컬럼은 하이브리도마 서브클론에 명명한 명칭을 기재하였고, 다음 두 컬럼에는 ELISA 선별 결과를 기재하였으며, 나머지 컬럼에는 4개의 크립토-양성 세포주에 대한 유세포 분석법 분석 결과를 기재하였다. 결과는 평균 형광 지수(MFI) 단위로 나타내었다.

[표 1]
항-크립토 모노클로날 항체의 특성 분석

하이브리도마 서브클론	ATCC 수탁 번호	ELISA 크립토 deIC Sups	ELISA 크립토 EGF 유사 도메인 Sups	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
대조군-ELISA		0.06	0.07				
대조군-마우스 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

[표 2]
항-크립토 모노클로날 항체의 특성 분석

하이브리도마 서브 클론	ATCC 수탁 번호	ELISA 크립토 deIC	ELISA 크립토 EGF 유사 도메인	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
대조군-ELISA		0.05	0.05				
대조군-마우스 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

실시에 3: 크립토 신호 전달의 억제에 대한 무기능성 세포 분석

아래에서는 크립토 신호 전달의 억제를 평가하는 데 이용된 F9 크립토 무기능성 세포 신호 전달 분석을 설명한다.

0일째:

6웰 평판을 웰당 2 ml의 0.1% 젤라틴으로 37°C에서 15분 동안 코팅한다.

1일째:

형질감염

하기 샘플 각각을 300 μl OptiMem1에 첨가하여 각 샘플에 대해 용액 A를 형성한다:

샘플 1: 0.5 μg (N₂)₇ 루시퍼라제 FAST 리포터 cDNA + 1.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 2: 0.5 μg (N₂)₇ 루시퍼라제, 0.5 μg FAST 및 1 μg 공백터 cDNA.

샘플 3: 0.5 μg (N₂)₇ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 4: 0.5 μg (N₂)₇ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 5: 0.5 μg (N₂)₇ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 6: 0.5 μg (N₂)₇ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 7: 0.5 μg $(\text{N}_2)_7$ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 8: 0.5 μg $(\text{N}_2)_7$ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

샘플 9: 0.5 μg $(\text{N}_2)_7$ 루시퍼라제, 0.5 μg 크립토, 0.5 FAST 및 0.5 μg 공백터 cDNA.

용액 B는 리포펙타민 30 μl + OptiMem1 270 μl 를 포함한다.

각 샘플에 대해, 용액 A 및 용액 B를 서로 혼합한다. 실온에서 45분 동안 항온처리한다. 웰을 웰당 2 ml의 OptiMem1으로 세척한다. 다음 단계 직전에 흡기한다.

용액 A+B의 각 혼합물에 2.4 ml의 OptiMem1을 첨가하고, 혼합하고, 웰당 1.5 ml를 첨가하여 웰을 복제한다. 37°C에서 5 시간 동안 항온처리한다. 샘플 1~3을 함유한 웰에 웰당 1.5 ml의 DMEM + 20% FCS, 2 mM Gln, P/S를 첨가한다. 항-크립토 항체를 다음과 같이 첨가한다: 샘플 4 웰: A27F6.1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 샘플 5 웰: A27F6.1, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 샘플 6 웰: A40G12.8, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 샘플 7 웰: A40G12.8, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 샘플 8 웰: A10B2.18, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 샘플 9 웰: A10B2.18, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2일째

배지를 제거하고, 세포를 웰당 2 ml의 PBS로 세척한다. 전날과 동량의 크립토 항체와 함께 DMEM + 0.5% FCS, 2 mM Gln, P/S를 같은 웰에 첨가한다.

3일째

루시퍼라제 신호를 발현시킨다. 웰당 PBS + Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 2 ml로 웰을 세척한다. 루크라이트(LucLite) 키트 패카드 카탈로그 번호 6016911을 사용한다. 완충액 및 기질은 실온으로 유지한다. 빛을 희미하게 한다. 기질을 완충액 10 ml로 재구성한다. PBS + Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 로 1:1로 희석시킨다. 웰을 흡기한다. 반복 피펫터를 사용하여 웰당 희석된 기질 250 μl 를 신속히 첨가한다. 용액을 와류시키고, 백색 불투명 바닥의 96웰 평판(펠콘 35-3296)의 웰로 200 μl 를 옮긴다. 윙글로우(Winglow)를 사용하여 발광측정기 상에서 평판을 판독하여 데이터를 엑셀로 송출한다.

이러한 분석 결과는 하기 표 3에 요약하였다.

[표 3]
크립토 신호 전달 분석: 항-크립토 모노클로날 항체에 의한 억제

형질감염된 cDNA	항-크립토 항체	상대 발광 단위
$(\text{N}_2)_7$ luc	무	123
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST	무	259
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	무	3091
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	A27F6.1 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1507
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	A27F6.1 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2297
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	A40G12.8 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1213
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	A40G12.8 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2626
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	A10B2.18 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3466
$(\text{N}_2)_7$ luc, FAST, 크립토	A10B2.18 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3103

실시예 4: 종양 세포 성장의 시험관내 억제에 대한 분석

크립토 신호 전달의 억제는 연결 아가에서 GEO 세포의 성장을 측정하여 분석할 수도 있다. 이에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Ciardiello 등, Oncogene. 1994 Jan;9(1):291-8; Ciardiello 등, Cancer Res. 1991 Feb 1;51(3):1051-4]을 참조할 수 있다.

먼저, 3% 박토아가를 용융시킨다. 수조에서 42°C로 유지한다. 그 후, 3% 박토아가 용액을 예열된 완전 배지와 혼합하여 0.6% 박토아가 용액을 제조하여 42°C로 유지한다. 6 cm 접시에 용액 4 ml을 도말하여 30분 이상 동안 냉각시켜 기저 아가층을 형성한다. GEO 세포를 트립신 처리하여 완전 배지에 웰당 10⁵ 세포로 재현탁시킨다. 항체를 20 µg~1 µg으로 적정 하면서, 분석하고자 하는 항체 또는 대조군을 세포 현탁액에 첨가한다. 동부피의 GEO 세포 현탁액과 0.6% 박토아가를 혼합하고, 기저 아가층의 상부에 2 ml를 적층한다. 1 시간 이상 동안 냉각시킨다. CO₂ 인큐베이터에서 37°C로 14일 동안 항온처리한다. 현미경을 사용하지 않고도 관찰되는 콜로니의 수를 센다. 음성 대조군과 비교하여 콜로니가 존재하지 않는 것은 시험되는 항체가 시험관내 종양 세포 성장을 억제한다는 것을 나타낸다.

상기 분석법을 이용하여 항체 A27F6.1 및 B6G7.10에 대해 표 4에 제시된 결과를 얻었으며, 상기 두 항체는 GEO 세포 콜로니의 성장을 감소시키는 능력을 나타낸다.

[표 4]
연결 아가 분석에서의 성장의 결과

항체	콜로니의 평균 갯수
무	109.0
무	104.3
A27F6 20 µg/ml	82.0
A27F6.1 10 µg/ml	78.3
A27F6.1 5 µg/ml	79.0
A27F6.1 1 µg/ml	108.7
B6G7.10 20 µg/ml	102.3
B6G7.10 10 µg/ml	71.7

실시예 5: 종양 세포 성장의 생체내 억제에 대한 분석

종양 세포 성장의 억제를 평가하기 위해, 인간의 종양 세포주를 무흉선 누드 마우스에 피하 이식하고, 종양 억제에 상승적 또는 부가적 효과를 발휘할 수 있는 추가의 화학요법 치료를 이용하거나 이용하지 않고, 본 발명 항체의 효과를 관찰하였다.

상기 분석은 대안으로, 예를 들어 GEO(잘 분화된 인간 결장암 시험관내 세포주, 미국 표준 균주 보관 기관(ATCC)으로부터 입수), DU-4475(ATCC로부터 입수한 유방암 시험관내 세포주), NCCIT(ATCC로부터 입수한 고환 종양 세포주) 또는 당해 분야에 공지된 기타 세포주와 같은 여러 종류의 종양 세포주를 사용하여 수행할 수 있다. 그러한 분석법의 한 예를 들면 다음과 같다:

동물들은 귀를 천공하여 개별적으로 표식을 한다. GEO 세포주는 시험관내 또는 생체내에서 1~4회 계대 배양한다. 동물들의 우측 옆구리 부분 피하에 GEO 세포를 이식한다. 하기 군의 동물들을 사용할 수 있다:

군 번호	처리	마우스의 수
1	염수 대조군, 0.2 ml/마우스, i.p. 주당 3회(M,W,F)	20
2	mAb, 저용량, i.p.	10
3	mAb, 중간용량, i.p.	10
4	mAb, 고용량, i.p.	10
5	5-FU, 30 mg/kg/주사, i.p., 3 Rx/wk(M,W,F)	10
6	시스플라틴, 2 mg/kg/주사, s.c., 3 Rx/wk(M,W,F)	10
7	아드리아마이신, 1.6 mg/kg/주사, i.p., 3 Rx/wk(M,W,F)	10

8	이리노테칸, 10 mg/kg/주사, i.p., 5 Rx/wk(M-F)	10
9	mAb, 저용량, i.p. + 5-FU(중간 용량)	10
10	mAb, 중간용량, i.p. + 5-FU(중간 용량)	10
11	mAb, 고용량, i.p. + 5-FU(중간 용량)	10
12	mAb, 저용량, i.p. + 시스플라틴(중간 용량)	10
13	mAb, 중간용량, i.p. + 시스플라틴(중간 용량)	10
14	mAb, 고용량, i.p. + 시스플라틴(중간 용량)	10
15	mAb, 저용량, i.p. + 아드리아마이신(중간 용량)	10
16	mAb, 중간용량, i.p. + 아드리아마이신(중간 용량)	10
17	mAb, 고용량, i.p. + 아드리아마이신(중간 용량)	10
18	mAb, 저용량, i.p. + 이리노테칸(중간 용량)	10
19	mAb, 중간용량, i.p. + 이리노테칸(중간 용량)	10
20	mAb, 고용량, i.p. + 이리노테칸(중간 용량)	10

상기 표에서 i.p.는 복강내 투여를, s.c.는 피하 투여를 의미한다.

0일째: 종양을 이식하고, 동물의 초기 체중을 기록한다.

1일째: 상기한 바와 같이 처리를 개시한다.

5일째: 종양 크기 및 체중 측정을 개시하고, 실험 종료시까지 주당 2회 계속한다.

초기 체중, 종양 크기 및 체중 측정과, 희생시의 조직학적 분석 및 종양에 대한 면역조직화학적 분석을 실시하여 크립토 발현, 종양 성장 및 그 억제에 대해 분석한다.

실시에 6: 생체내 이중이식편 종양 모델 - Cys-풍부 차단 항-크립토 항체

NCCIT의 반응을 평가하기 위해, 인간 고환의 암종 세포주에 크립토의 cys-풍부 도메인에 결합하는 항체를 피하 이식하였다. 실험 방법은 후술하는 바와 같다. 그 결과를 도 1에 제시한다.

방법 및 재료

동물: 무흉선 누드 웅성 마우스를 사용하였다. 동물들은 귀를 천공하여 개별적으로 번호를 부여하였다.

종양: 종격동 혼합 배 세포 인간 고환 암종 시험관내 세포주인 NCCIT는 본래 미국 표준 균주 보관 기관으로부터 입수한 것이었다. 세포주를 시험관내에서 항생제 무함유 RPMI-1640/10% FBS에서 6회 계대 배양하였다. 동물들의 우측 옆구리 피하에 5 x 10 세포/0.2 ml 매트릭셀을 이식하였다.

군 번호	처리	마우스의 수
1	부형제 대조군, (25 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, pH 7.2), 0.2 ml/마우스, i.p., Q14D 처리는 -1일째에 개시함	20
2	A8G3.5, 1 mg/kg/주사, i.p., Q14D 처리는 -1일째에 개시함	10
3	A8G3.5, 3 mg/kg/주사, i.p., Q14D 처리는 -1일째에 개시함	10
4	A8G3.5, 10 mg/kg/주사, i.p., Q14D 처리는 -1일째에 개시함	10
5	6회 처리에 대하여 Cys-백금, 2 mg/kg/주사, s.c., 3 x/wk(M,W,F) 처리는 1일째 개시함	10

시험 일정표

-1일째: 마우스를 대조군과 처리군으로 무작위로 나누었다. 동물들의 초기 체중을 기록하였다. 제1 처리제를 항체 군에 투여하였다. 투여 용액을 제조하였다. 시험 기술자에게는 분석 종료 시까지 처리 사실을 알리지 않았다.

0일째: 종양을 이식하였다. 마우스 내로 이식된 종양에 대해 박테리아 배양을 실시하였다.

1일째: 양성 화학요법 군에 1차 처리제를 투여하였다.

4일째: 매트릭셀 상의 종양 기준선에 대해 초기 종양 크기 측정치를 기록하였다. 주당 2회 마우스의 종양 크기 및 체중을 계속 기록하였다. 연구 결과를 매일 모니터링하고, 동물들에 대한 임의의 특이한 관찰 사항을 기록하였다.

종료점: 초기 체중

종양 크기 및 체중 측정

실시에 7: 생체내 이중이식편 종양 모델 - EGF-유사 도메인 차단 항-크립토 항체

NCCIT의 반응을 평가하기 위해, 인간의 고환 암종 세포주에 크립토의 EGF-유사 도메인에 결합하는 항체를 피하 이식하였다. 실험 방법은 후술하는 바와 같다. 그 결과는 도 2에 제시한다.

방법 및 재료

동물: 무흉선 누드 웅성 마우스를 사용하였다. 동물들은 귀를 천공하여 개별적으로 번호를 부여하였다.

종양: 종격동 혼합 배 세포 인간 고환암 시험관내 세포주인 NCCIT는 본래 미국 표준 균주 보관 기관으로부터 입수한 것이었다. 세포주를 시험관내에서 항생물질 무함유 RPMI-1640/10% FBS에서 8회 계대 배양하였다. 동물들의 우측 옆구리 피하에 5×10^6 세포/0.2 ml 매트릭셀을 이식하였다.

군 번호	처리	마우스의 수
1	부형제 대조군, (25 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, pH 7.2), 0.2 ml/마우스, i.p., Q14D 처리는 -1일째에 개시함	18
2	A27F6.1, 1 mg/kg/주사, i.p., Q14D 처리는 2.6 mg/kg/마우스의 용량으로 -1일째에 개시함	10
3	A27F6.1, 10 mg/kg/주사, i.p., Q14D 처리는 21.2 mg/kg/마우스의 용량으로 -1일째에 개시함	10
4	6회의 처리에 대하여 Cys-백금, 2 mg/kg/주사, s.c., 3 x/wk(M,W,F) 처리는 1일째 개시함	10

삭제

시험 일정표

-1일째: 마우스를 대조군과 치료군으로 무작위로 나누었다. 동물들의 초기 체중을 기록하였다. 1차 처리제를 항체 군에 투여하였다. 투여 용액을 제조하였다. 시험 기술자에게는 분석 종료 시까지 처리 사실을 알리지 않았다.

0일째: 종양을 이식하였다. 마우스 내로 이식된 종양에 대해 박테리아 배양을 실시하였다. 박테리아 배양물은 샘플링 24 시간 및 48 시간 후에 오염 여부가 음성으로 나타났다.

1일째: 양성 화학요법 군에 1차 처리제를 투여하였다.

4일째: 매트릭셀 상의 종양 기준선에 대해 초기 종양 크기 측정치를 기록하였다. 주당 2회 마우스의 종양 크기 및 체중을 계속 기록하였다. 연구 결과를 매일 모니터링하고, 동물들에 대한 특이한 관찰 사항을 기록하였다.

종료점: 초기 체중

종양 크기 및 체중 측정

실시예 8: ALK 결합을 차단하는 크립토 mabs

크립토-특이 모노클로날 항체가, 크립토가 액티빈 I형 수용체인 Alk4에 결합하는 능력을 방해할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, Alk4를 안정하게 발현시키는 293 세포주를 사용하여 유세포 분석법을 이용하였다. 상기 세포주를 생산하기 위해, C-말단에 HA 에피토프가 태깅된 Alk4를 발현시키는 플라스미드와 약물 퓨로마이신을 발현시키는 플라스미드를 10:1의 비율로 293 세포에 동시 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 콜로니가 형성될 때까지 퓨로마이신에서 선별하였다. 그 후, 콜로니를 피킹하여 증폭시킨 다음, HA에 대한 웨스턴 블로팅을 이용하여 Alk4 발현에 대해 분석하였다. 클론 21(293-Alk-21)은 대조군인 비형질감염된 293 세포와 비교하여 높은 수준의 Alk4를 발현시키는 것으로 확인되었다.

유세포 분석법에 의해 크립토-Alk4 결합을 분석하기 위해, 인간 IgG의 Fc 부분(CrdelC-Fc)에 융합된 인간 크립토(aa 1~169)의 정제된 가용성 형태를 이용하였다. 대략 5 µg/ml의 CrdelC-Fc 또는 대조군 Fc 단백질을 총 부피 50 µl의 FACS 완충액(0.1% BSA를 함유한 PBS) 중에서 3 x 10⁵개 293-Alk-21 세포와 얼음 상에서 30분 동안 항온처리하였다. 항-크립토 항체를 함유하는 샘플의 경우, 5 µg/ml의 CrdelC-Fc를, 세포 첨가 전에 얼음 위에서, 50 µg/ml의 각 크립토 항체(A10.B2.18, A40.G12.8, A27.F6.1, A8.H3.1, A19.A10.30, A6.F8.6, A8.G3.5, A6.C12.11)와 사전 항온처리하였다. 그 후, 세포들을 FACS 완충액으로 세척하고, 세포들을 짝슨 이뮤놀로지스에서 입수한 R-피코에리테린-접합된 염소 항-인간 IgG(Fc 단편 특이적인)와 항온처리함으로써 결합된 Fc 단백질을 검출하였다. 그 후, 샘플들을 다시 세척하고, PBS 중의 1% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 표준 유세포 분석법을 이용하여 분석하였다. FACS 분석 결과는 도 3에 나타내었다.

전술한 본 발명의 구체예의 일부는 이하에 요약하며, 다음 구체예를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 당업자라면, 본 발명의 사상으로부터 벗어남이 없이 본 발명의 다양한 구체예에 대하여 다수의 변경 및 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

본 명세서에 인용된 각 공개 문헌의 전문은 본 명세서에 참고로 인용한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 아미노산 46에서 아미노산 62에 이르는 도메인에 포함되는 크립토(Cripto)의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 2.

제1항에 있어서, A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311) 및 B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319)로 구성된 군에서 선택되는 하이브리도마에 의해 생산되는 항체가 결합하는 에피토프의 군에서 선택되는 에피토프에 결합하는 것인 항체.

청구항 3.

서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 제시된 크립토 아미노산 서열에 특이적으로 결합하고 크립토를 내부화(internalizing)할 수 있는 항체로서, 이 항체는 (i) 서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 아미노산 46에서 아미노산 62에 이르는 도메인에 포함되는 크립토의 에피토프에 특이적으로 결합하거나; (ii) 서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 아미노산 잔기 114에서 아미노산 잔기 150에 이르는 크립토의 시스템인 풍부 도메인에 포함되는 에피토프에 특이적으로 결합하거나; 또는 (iii) 하이브리도마 A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312), 및 B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319)에 의해 생산되는 항체가 결합하는 에피토프의 군에서 선택되며, 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열로 나타내어지는 크립토의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 항체.

청구항 4.

서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 아미노산 잔기 114에서 아미노산 잔기 150에 이르는 크립토의 시스테인 풍부 도메인에 포함되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 5.

제4항에 있어서, A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317) 및 A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318)로 구성된 군에서 선택되는 하이브리도마에 의해 생산되는 항체가 결합하는 에피토프의 군에서 선택되는 에피토프에 결합하는 것인 항체.

청구항 6.

서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 제시된 크립토 아미노산 서열에 특이적으로 결합하고 크립토와 ALK4의 상호작용을 억제하는 항체로서, 이 항체는 (i) 서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 아미노산 잔기 46에서 아미노산 잔기 62에 이르는 도메인에 포함되는 크립토의 에피토프에 특이적으로 결합하거나; (ii) 서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 아미노산 잔기 114에서 아미노산 잔기 150에 이르는 크립토의 시스테인 풍부 도메인에 포함되는 에피토프에 특이적으로 결합하거나; 또는 (iii) 하이브리도마 A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312), 및 B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319)에 의해 생산되는 항체가 결합하는 에피토프의 군에서 선택되며, 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열로 나타내어지는 크립토의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 항체.

청구항 7.

하이브리도마 A6F8.6(ATCC 수탁 번호 PTA-3318), A8G3.5(ATCC 수탁 번호 PTA-3317), A10B2.18(ATCC 수탁 번호 PTA-3311), A17G12.1(ATCC 수탁 번호 PTA-3314), A18B3.11(ATCC 수탁 번호 PTA-3312), 및 B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319)에 의해 생산되는 항체가 결합하는 에피토프의 군에서 선택되며, 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 제시된 아미노산으로 나타내어지는 크립토의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, Fab, Fab' 및 F(ab)₂ 단편으로 구성된 군에서 선택되는 항체 단편인 항체.

청구항 9.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 전체 길이 항체인 항체.

청구항 10.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단일쇄 항체인 항체.

청구항 11.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 화학요법에 접합된 것인 항체.

청구항 12.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 비접합 화학요법제와 함께 투여되는 것인 항체.

청구항 13.

제11항에 있어서, 상기 화학요법제는 종양 활성화된 전구약물, 방사성 핵종 및 독소로 구성된 군에서 선택되는 것인 항체.

청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 화학요법제가 메이탄시노이드인 항체.

청구항 15.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체인 항체.

청구항 16.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 17.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 항체인 항체.

청구항 18.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체 1종 이상과 담체를 포함하는, 종양 성장을 감소시키는 데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 항체는 화학요법제에 접합된 것인 약학 조성물.

청구항 20.

제18항에 있어서, 비접합 화학요법제를 더 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 21.

메이탄시노이드에 접합된 서열 번호 1 또는 2의 아미노산 잔기 46~62를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 종양 치료용 약학 조성물.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 B3F6.17(ATCC 수탁 번호 PTA-3319)에 의해 생산되는 인간화된 항체인 약학 조성물.

청구항 23.

제18항에 있어서, 시험관내에서 종양 성장을 억제하기 위한 것인 약학 조성물.

청구항 24.

제18항에 있어서, 생체내에서 종양 성장을 억제하기 위한 것인 약학 조성물.

청구항 25.

제23항에 있어서, 종양 세포가 유방, 고환, 결장, 폐, 난소, 방광, 자궁, 자궁 경부, 췌장 및 위 종양 세포로 구성된 군에서 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 26.

제24항에 있어서, 종양 세포가 유방, 고환, 결장, 폐, 난소, 방광, 자궁, 자궁 경부, 췌장 및 위 종양 세포로 구성된 군에서 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 27.

삭제

청구항 28.

제18항의 약학 조성물을 샘플에 첨가하는 단계를 포함하는, 시험관내에서 샘플 내 종양 세포 성장을 조절하는 방법.

청구항 29.

제21항 또는 제22항에 있어서, 시험관내에서 종양 성장을 감소시키기 위한 것인 약학 조성물.

청구항 30.

제21항 또는 제22항에 있어서, 생체내에서 종양 성장을 감소시키기 위한 것인 약학 조성물.

청구항 31.

삭제

청구항 32.

제21항 또는 제22항의 약학 조성물을 샘플에 첨가하는 단계를 포함하는, 시험관내에서 샘플 내 종양 세포의 성장을 조절하는 방법.

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제

청구항 42.

삭제

청구항 43.

삭제

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

청구항 51.

삭제

청구항 52.

삭제

청구항 53.

삭제

청구항 54.

삭제

청구항 55.

삭제

청구항 56.

삭제

청구항 57.

삭제

청구항 58.

삭제

청구항 59.

삭제

청구항 60.

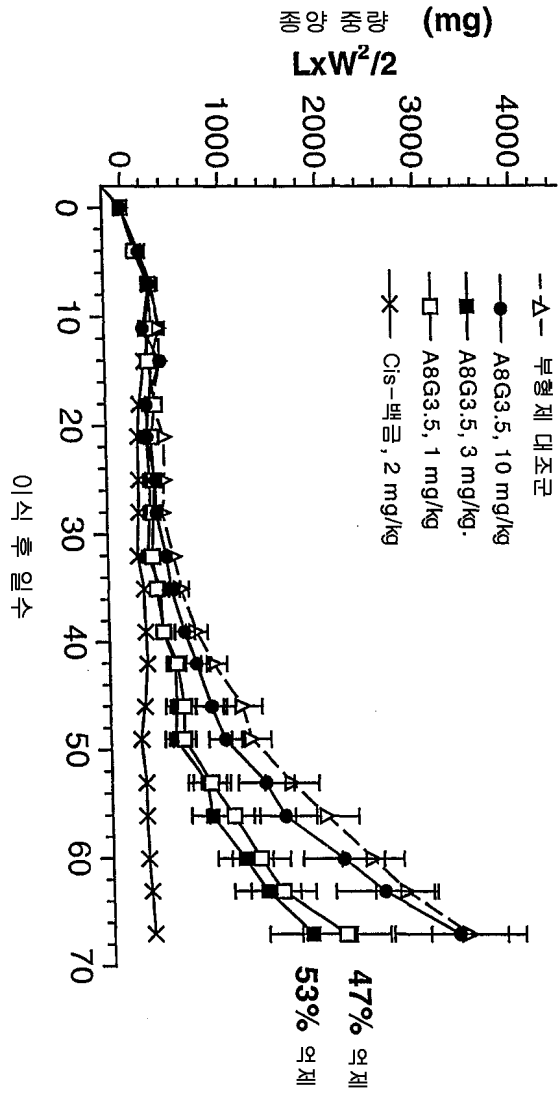
삭제

청구항 61.

삭제

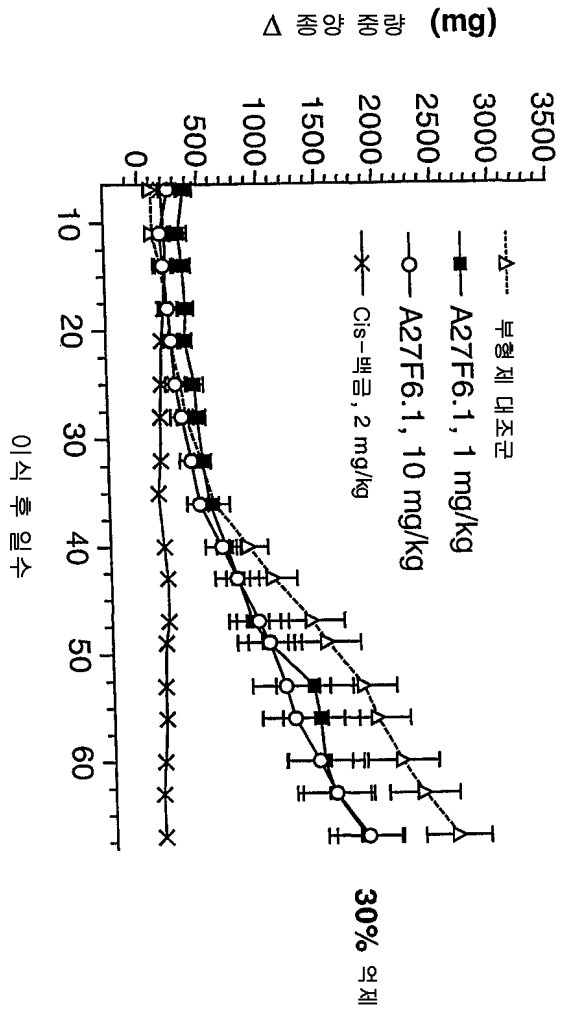
도면

도면1



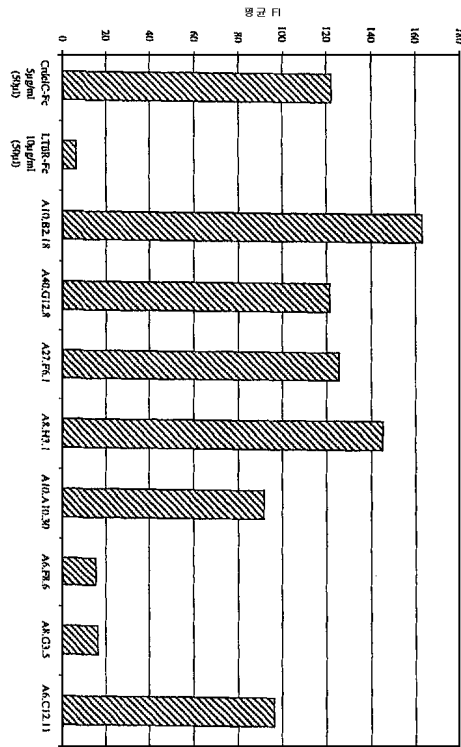
항-CFC 차단 크립토 mAb A8G3.5에 대한
NOCIT, 인간 고환 암종 세포주의 반응

도면2



항-EGF 차단 크립톤 mAb A27F6.1에 대한
NCCIT, 인간 고환 암종 세포주의 반응

도면3



FACS: 293/ALK4 세포 결합 CR-Fc

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Biogen, Inc.
Sanicola-Nadel, Michele
Williams, Kevin
Schiffer, Susan
Rayhorn, Paul
- <120> Cripto Blocking Antibodies and Uses
Thereof
- <130> A117 PCT
- <140> not assigned yet
- <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 for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 188
- <212> PRT

<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
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> PRT

<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