

### Родственные заявки

Данная заявка является продолжением заявки на выдачу патента U.S.S.N. 60/367002, поданной 22 марта 2002, которая является частичным продолжением заявки U.S.S.N. 60/301091, поданной 26 июня 2001, которая является частичным продолжением заявки U.S.S.N. 60/293020, поданной 17 мая 2001, которая является частичным продолжением заявки U.S.S.N. 60/286782, поданной 26 апреля 2001. Полное описание каждой из вышеуказанных заявок на выдачу патентов включено в данное описание в виде ссылки.

### Область техники изобретения

Данное изобретение, в общем, относится к области генетики и клеточной и молекулярной биологии. Более конкретно изобретение относится к антителам, которые связываются и модулируют передачу сигнала Cripto, к наборам, содержащим такие антитела, и способам, в которых антитела используются.

### Предпосылка изобретения

Cripto является белком клеточной поверхности, состоящим из 188 аминокислотных остатков, случайно выделенным при скрининге кДНК библиотеки эмбриональной карциномы человека (Ciccociola et al., 1989, EMBO J., vol. 8, No. 7, pp. 1987-1991). Белок Cripto имеет, по меньшей мере, два заметных домена: богатый цистеином домен и домен, сначала охарактеризованный как домен, сходный с доменом, обнаруженным в семействе эпидермального фактора роста (EGF). Cripto первоначально классифицировали как представителя семейства EGF (Ciccociola et al., выше); однако последующий анализ показал, что Cripto не связывает ни один из известных рецепторов EGF и его EGF-подобный домен в действительности отличается от семейства EGF (Bianco et al., 1999, J. Biol. Chem., 274:8624-8629).

Сигнальный путь Cripto остается неясным, несмотря на продолжающееся исследование при наличии сведений в литературе, подтверждающих активацию нескольких различных путей, включая MAP-киназный путь (DeSantis et al., 1997, Cell Growth Differ., 8:1257-1266; Kannan et al., 1997, J. Biol. Chem., 272:3330-3335), путь TGF- $\beta$  (Gritsman et al., 1999, Development, 127:921-932; Schier et al., 2000, Nature, 403:385-389), возможные взаимодействия с путем Wnt (Salomon et al., Endocr. Relat. Cancer. 2000 Dec; 7(4):199-226) и взаимное влияние в случае пути EGF (Bianco et al., 1999, J. Biol. Chem., 274:8624-8629).

В патенте США 5256643 и двух родственных ему выделенных заявках (патенты США 5654140 и 5792616) описан ген Cripto человека, белок Cripto и антитела к Cripto.

В патенте США 5264557 и трех родственных ему выделенных заявках (патенты США 5620866, 5650285 и 5854399) описан родственный Cripto ген и белок человека. Также заявлены антитела, которые связываются с белком, родственным Cripto, но перекрестно не реагируют посредством связывания с самим белком Cripto.

Сверхэкспрессия белка Cripto связана со многими типами опухолей (включая, но не ограничиваясь указанным, опухоли молочной железы, семенников, толстой кишки, легкого, яичника, мочевого пузыря, матки, шейки матки, поджелудочной железы и желудка), как показано с помощью иммуноокрашивания ткани человека поликлональными антителами кролика, полученными против небольших пептидов 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 образом, в данной области существует необходимость в средствах контроля, ограничения и/или предотвращения такой сверхэкспрессии, модулирования передачи сигнала Cripto и модулирования последствий экспрессии Cripto (т.е. стимулирования и/или поддержания клеточной трансформации).

### Сущность изобретения

Данное изобретение относится к новым антителам, которые специфично связываются с Cripto, и способам получения и применения таких антител. Изобретение также относится к антителам, которые связываются с Cripto и модулируют передачу сигнала Cripto или взаимодействие белков, например, к антителу, которое связывается с Cripto так, что сигнал, возникающий в результате взаимодействия белков с Cripto, подавляется. Изобретение также относится к антителам, которые связываются с Cripto и блокируют взаимодействие между Cripto и ALK4. Изобретение также относится к антителам, которые связываются с Cripto и модулируют рост опухоли. Изобретение также относится к антителам, которые связываются с Cripto, модулируют передачу сигнала Cripto и модулируют рост опухоли. Изобретение также относится к антителам, которые связываются с Cripto, блокируют взаимодействие между Cripto и ALK4 и модулируют рост опухоли.

В одном аспекте изобретения антитело согласно данному изобретению специфично связывается с эпитопом, выбранным из группы эпитопов, с которыми связываются антитела A6C12.11, A6F8.6 (АТСС инвентарный № РТА-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317), A8H3.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18 (АТСС инвентарный №. РТА-3311), A27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310), A40G12.8 (АТСС инвентарный №. РТА3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3314), A17H6.1, A18B3.11 (АТСС инвентарный №. РТА-3312), A19E2.7, B3F6.17 (АТСС инвентарный №. РТА-3319), B6G7.10 (АТСС инвентарный №. РТА-3313), B11H8.4.

В другом аспекте изобретения антитело согласно данному изобретению специфично связывается с эпитопом в лиганд/рецептор-связывающем домене Cripto. Cripto может быть выбран из CR-1 (SEQ ID №:

1) или CR-3 (SEQ ID №: 2). В более конкретном варианте антитела, которые специфично связываются с эпитопом в лиганд/рецептор-связывающем домене, включают, например, А6С12.11, А6F8.6 (АТСС инвентарный №. РТА-3318), А8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317), А19А10.30, А8Н3.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3315), А27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310), А40G12.8 (АТСС инвентарный №. РТА-3316), А17G12.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3314), А18В3.11 (АТСС инвентарный №. РТА-3312) и В6G7.10 (АТСС инвентарный №. РТА-3313).

В одном варианте эпитоп, с которым связываются антитела согласно данному изобретению, находится в EGF-подобном домене. Антитела, которые специфично связываются с эпитопом в EGF-подобном домене, включают, но не ограничены указанным, А40G12.8 (АТСС инвентарный №. РТА-3316), А8Н3.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3315), А27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310), В6G7.10 (АТСС инвентарный №. РТА-3313), А17G12.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3314) и А18В3.11 (АТСС инвентарный №. РТА-3312).

В другом варианте эпитоп, с которым связываются антитела согласно данному изобретению, находится в Cys-богатом домене. Антитела, которые специфично связываются с эпитопом в Cys-богатом домене, включают, но не ограничены указанным, А19А10.30, А8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317), А6F8.6 (АТСС инвентарный №. РТА-3318) и А6С12.11.

В другом варианте эпитоп, с которым связываются антитела согласно данному изобретению, находится в домене, охватывающем аминокислотные остатки 46-62 Cripto. Антитела, которые специфично связываются с эпитопом в домене, охватывающем аминокислотные остатки 4 6-62 Cripto, включают, но не ограничены указанным, А10В2.18 (АТСС инвентарный №. РТА-3311), В3F6.17 (АТСС инвентарный №. РТА-3319) и А17А2.16.

Данное изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с Cripto и способны модулировать передачу сигнала Cripto. Антитела, которые специфично связываются с Cripto и способны модулировать передачу сигнала Cripto, включают, но не ограничены указанным, А40G12.8 (АТСС инвентарный №. РТА-3316), А8Н3.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3315), А27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310) и А6С12.11. В одном варианте антитела согласно данному изобретению, которые специфично связываются с Cripto и способны модулировать передачу сигнала Cripto, связываются с эпитопом в EGF-подобном домене или Cys-богатом домене Cripto.

Данное изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с Cripto и блокируют взаимодействие между Cripto и ALK4. Антитела, которые специфично связываются с Cripto и способны блокировать взаимодействие между Cripto и ALK4, включают, но не ограничены указанным, А8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317), А6F8.6 (АТСС инвентарный №. РТА-3318) и А6С12.11. В одном варианте антитела согласно данному изобретению, которые специфично связываются с Cripto и способны блокировать взаимодействие между Cripto и ALK4, связываются с эпитопом в EGF-подобном домене или Cys-богатом домене Cripto.

В другом аспекте данное изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с Cripto и способны модулировать рост опухоли. Антитела, которые специфично связываются с Cripto и способны модулировать рост опухоли, включают, но не ограничены указанным, А27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310), В6G7.10 (АТСС инвентарный №. РТА-3313) и А8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317).

В одном варианте антитела согласно данному изобретению, которые специфично связываются с Cripto и способны модулировать рост опухоли, связываются с эпитопом в EGF-подобном домене или Cys-богатом домене Cripto.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с Cripto, которые способны модулировать передачу сигнала Cripto и которые способны модулировать рост опухоли. Антитела, которые специфично связываются с Cripto, которые способны модулировать передачу сигнала Cripto и которые способны модулировать рост опухоли, включают, но не ограничены указанным, А27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310).

В одном варианте антитела согласно данному изобретению, которые специфично связываются с Cripto, которые способны модулировать передачу сигнала Cripto и которые способны модулировать рост опухоли, связываются с эпитопом в EGF-подобном домене или Cys-богатом домене Cripto.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с Cripto, которые способны блокировать взаимодействие между Cripto и ALK4 и которые способны модулировать рост опухоли. Антитела, которые специфично связываются с Cripto, которые способны блокировать взаимодействие между Cripto и ALK4 и которые способны модулировать рост опухоли, включают, но не ограничены указанным, А8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317).

В другом варианте данное изобретение относится к антителу, продуцируемому гибридомой, выбранной из группы, состоящей из А6F8.6 (АТСС инвентарный №. РТА-3318), А8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317), А8Н3.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3315), А10В2.18 (АТСС инвентарный №. РТА-3311), А27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310), А40G12.8 (АТСС инвентарный №. РТА-3316), А17G12.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3314), А18В3.11 (АТСС инвентарный №. РТА-3312), В3F6.17 (АТСС\*инвентарный №. РТА-3319) и В6G7.10 (АТСС инвентарный №. РТА-3313).

Антитела согласно данному изобретению включают, но не ограничены указанным, моноклональные, поликлональные, гуманизированные, химерные и человеческие антитела.

Данное изобретение также относится к композиции для введения субъекту, имеющему опухоль, которая экспрессирует Cripto, содержащей по меньшей мере одно из антител, описанных выше. В более конкретном варианте субъектом является человек. Композиция может содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. Описанные выше антитела можно конъюгировать с химиотерапевтическим средством или вводить в комбинации с неконоъюгированным химиотерапевтическим средством.

В другом аспекте изобретения рассматриваются способы модулирования роста опухолевых клеток в образце *in vitro*, включающие стадию добавления к образцу описанных выше композиций.

Также рассматриваются способы модулирования роста опухолевых клеток у субъектов *in vivo*, включающие стадию введения субъекту эффективного количества описанных выше композиций. В конкретном варианте субъектом является человек.

Другим аспектом настоящего изобретения являются способы лечения субъектов, имеющих опухоль, которая сверхэкспрессирует Cripto, включающие введение субъекту описанных выше композиций в эффективном количестве. Композиции для введения могут включать фармацевтически приемлемые наполнители, антитела, конъюгированные с химиотерапевтическими средствами, и антитела, вводимые в комбинации с неконоъюгированными химиотерапевтическими средствами.

Способы согласно данному изобретению особенно полезны для модулирования роста опухолевых клеток и/или лечения субъекта (т.е. человека), имеющего опухоль, в том случае, когда опухолевая клетка выбрана из опухолевых клеток молочной железы, семенников, толстой кишки, легкого, яичника, мочевого пузыря, матки, шейки матки, поджелудочной железы и желудка.

В еще одном варианте данное изобретение относится к способам определения того, экспрессирует ли ткань Cripto, включающим стадию анализа ткани субъекта в иммуноанализе с использованием любого из описанных выше антител. Также рассматриваются способы определения того, сверхэкспрессирует ли линия клеток Cripto, включающие стадию анализа линии клеток в иммуноанализе с использованием любого из описанных выше антител.

Указанные и другие аспекты изобретения более подробно представлены ниже в подробном описании изобретения.

#### **Подробное описание изобретения**

Обнаружены антитела, которые специфично связываются с Cripto, и их применения для модулирования передачи сигнала Cripto или взаимодействия белков и/или для блокирования взаимодействия между Cripto и ALK4, и/или модулирования роста опухолевых клеток. Обнаружены различные классы антител, которые специфично связываются с Cripto, включая, например, антитела, которые специфично связываются с эпитопом в лиганд/рецептор-связывающем домене либо нативного белка Cripto, либо денатурированной формы Cripto; антитела, которые связывают EGF-подобный домен, Cys-богатый домен или пептид (например, примерно из 3-20 аминокислот) из области, содержащей аминокислотные остатки 46-150; антитела, которые связывают Cripto и модулируют передачу сигнала Cripto; антитела, которые связывают Cripto и модулируют рост опухолевых клеток; и антитела, которые связывают Cripto, модулируют передачу сигнала Cripto и модулируют рост опухолевых клеток. Указанные антитела выбраны с использованием обычных анализов *in vitro* для отбора антител, которые связывают лиганд/рецептор-связывающий домен, модулируют передачу сигнала Cripto или модулируют рост опухолевых клеток.

Способы согласно данному изобретению применимы в терапии злокачественных или доброкачественных опухолей млекопитающих в том случае, когда скорость роста опухоли (которая является аномальной скоростью для нормальной ткани), по меньшей мере, частично зависит от Cripto. Аномальной скоростью роста является скорость роста, которая превышает скорость, необходимую для нормального гомеостаза и превышает скорость для нормальных тканей того же происхождения.

#### **Определения**

На протяжении документа приведены различные определения. Большинство слов имеют значение, которое может приписываться таким словам специалистом в данной области. Слова, конкретное определение которых приведено либо ниже, либо в ином месте данного документа, имеют значение, приведенное в контексте данного изобретения в целом, и которое обычно понимается специалистами в данной области.

В используемом в данном описании смысле термин «область» означает физически непрерывную часть первичной структуры биомолекулы. В случае белков область определяют как непрерывную часть аминокислотной последовательности данного белка.

В используемом в данном описании смысле термин «домен» относится к структурной части биомолекулы, которая вносит вклад в известную или ожидаемую функцию биомолекулы. Домены могут иметь равную протяженность с областями или их частями; домены также могут включать часть биомолекулы, которая отлична от конкретной области, наряду с полной указанной областью или ее частью. Примеры белковых доменов включают, но не ограничены указанным, внеклеточный домен (простирается примерно от остатка 31 до остатка 188 Cripto, включая Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO: 2)) и трансмембранный домен (простирается примерно от остатка 169 до остатка 188 Cripto, включая Cripto,

CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO: 2)). Лиганд/рецептор-связывающий домен белка Cripto простирается примерно от остатка 75 до остатка 150 Cripto, включая Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO: 2) и содержит EGF-подобный домен Cripto, который простирается, например, примерно от остатка 75 до остатка 112 Cripto, включая Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO: 2), и богатый цистеином домен Cripto, который простирается, например, примерно от остатка 114 до остатка 150 Cripto, включая Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO: 2). Например, многие моноклональные антитела согласно данному изобретению были идентифицированы как антитела, связывающиеся с EGF-подобным или Cys-богатым доменами. Кроме того, моноклональные антитела A10B2.18 (АТСС инвентарный №. РТА-3311), В3F6.17 (АТСС инвентарный №. РТА-3319) и А17А2.16 были идентифицированы как антитела, связывающиеся с эпитопом, образованным в домене в области, охватывающей аминокислотные остатки 46-62, «левее» EGF-подобного домена. Смотри пример 3 ниже. Эпитоп в лиганд/рецептор-связывающем домене является эпитопом, образуемым либо в конформационно нативном белке, либо в денатурированном белке Cripto, с которым могут связываться антитела.

В используемом в данном описании смысле подразумевается, что термин «антитело» относится к полным интактным антителам и Fab, Fab', F(ab)2 и другим их фрагментам. Полные интактные антитела включают, но не ограничены указанным, моноклональные антитела, такие как мышинные моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные антитела, человеческие антитела и гуманизированные антитела. Различные формы антител можно получить с использованием стандартных способов на основе рекомбинантной ДНК (Winter and Milstein, Nature 349: 293-99, 1991). Например, можно сконструировать «химерные» антитела, в которых антиген-связывающий домен из антитела животного связан с константным доменом человека (антитело, исходно полученное от млекопитающего, отличного от человека, для которого использовали технологию рекомбинантной ДНК, чтобы заменить все или часть областей шарнирной и константной областей тяжелой цепи и/или константной области легкой цепи соответствующими областями из легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина человека) (см., например, Cabilly et al., патент США 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-55, 1984). Химерные антитела уменьшают иммуногенные ответы, вызываемые антителами животных в случае использования при клиническом лечении людей.

Кроме того, можно синтезировать рекомбинантные «гуманизированные» антитела. Гуманизированные антитела являются антителами, исходно полученными от млекопитающего, отличного от человека, для которых использовали технологию рекомбинантной ДНК, чтобы заменить некоторые или все аминокислоты, не требующиеся для связывания антигена, аминокислотами из соответствующих областей легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина человека. То есть, они являются химерами, главным образом содержащими последовательности иммуноглобулина человека, в которые были встроены области, ответственные за специфичное связывание антигена (смотри, например, заявку на выдачу патента PCT WO 94/04679). Животных иммунизируют требуемым антигеном, выделяют соответствующие антитела и удаляют часть последовательностей переменных областей, ответственных за специфичное связывание антигена. Полученные от животного антигенсвязывающие области затем клонируют в соответствующем положении генов антитела человека, в которых были делетированы антигенсвязывающие области. Гуманизированные антитела минимизируют использование гетерологичных (межвидовых) последовательностей в антителах для применения в терапии человека, и меньше вероятность того, что они вызовут нежелательные иммунные ответы. Подобным образом можно получить приматизированные антитела.

Другой вариант изобретения включает применение человеческих антител, которые можно продуцировать в животных, отличных от человека, таких как трансгенные животные, несущие один или несколько трансгенов иммуноглобулина человека. Таких животных можно использовать в качестве источника спленоцитов для получения гибридом, как описано в патенте США 5569825.

Фрагменты антител и моновалентные антитела также можно использовать в способах и композициях согласно данному изобретению. Моновалентные антитела содержат димер тяжелая цепь/легкая цепь, связанный с областью Fc (или стволовой областью) второй тяжелой цепи. «Fab-область» относится к тем частям цепей, которые примерно эквивалентны или аналогичны последовательностям, которые содержат Y-разветвленные части тяжелой цепи, и полностью к легкой цепи, и которые, как было показано, совместно (в агрегатах) проявляют активность антитела. Белок Fab включает агрегаты одной тяжелой и одной легкой цепи (обычно известные как Fab'), а также тетрамеры, которые соответствуют двум разветвленным участкам антитела Y (обычно известные как F(ab)2), при ковалентной или нековалентной агрегации любых указанных выше компонентов, при условии, что агрегат способен специфично реагировать с конкретным антигеном или семейством антигенов.

Любое из антител согласно изобретению необязательно может быть конъюгировано с химиотерапевтическим средством, определение которого приведено ниже.

В используемом в данном описании смысле термин «связывание» означает физическое или химическое взаимодействие между двумя белками или соединениями или ассоциированными белками или соединениями или их комбинациями, включая взаимодействие между антителом и белком. Связывание включает ионные, неионные, водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия и т.д. При физическом взаимодействии связывание может быть либо прямым, либо непрямым, при этом

непрямое осуществляется посредством или благодаря влиянию другого белка или соединения. Прямое связывание относится к взаимодействиям, которые не происходят при посредстве или за счет влияния другого белка или соединения, а напротив происходит без других реальных химических промежуточных соединений. Связывание можно регистрировать многими различными способами. Способы регистрации связывания хорошо известны специалистам в данной области.

В используемом в данном описании смысле «антитело, способное интернализировать Cripto» означает антитело, которое проникает в клетку, удаляя Cripto с клеточной поверхности. Можно провести скрининг в отношении антител к Cripto, которые способны интернализировать Cripto, с использованием флуоресцентных меченых моноклональных антител к Cripto. Для того чтобы определить, какие антитела интернализуются в Cripto-позитивные клетки, можно провести анализ в отношении поглощения флуоресцентного сигнала антител в клетки, наблюдая клетки в флуоресцентном и/или конфокальном микроскопе. Указанные антитела, которые интернализуются, будут видны как флуоресцентные сигналы в цитоплазматических и/или клеточных везикулах. Неограничивающие примеры антител к Cripto, способных интернализировать Cripto, включают A27F6.1 и B3F6.17.

В используемом в данном описании смысле термин «соединения» означает любой идентифицируемый химический агент или молекулу, включая, но не ограничиваясь указанным, ион, атом, небольшую молекулу, пептид, белок, сахар, нуклеотид или нуклеиновую кислоту, и такое соединение может быть природным или синтетическим.

В используемом в данном описании смысле термины «модулирует» или «модифицирует» означают увеличение или уменьшение количества, качества или влияния конкретной активности или белка.

В используемом в данном описании смысле термин «модулирует передачу сигнала Cripto» означает увеличение или уменьшение количества, качества или влияния активности Cripto, примерно на 5%, предпочтительно на 10%, более предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, более предпочтительно на 40%, более предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 60%, более предпочтительно на 70%, более предпочтительно на 80%, более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100%. Активность можно измерить с помощью анализов, известных в данной области, таких как анализ нулевых клеток, показанный в примере 3. В другом варианте белковое взаимодействие между Cripto и другим белком сходным образом подавляют посредством связывания антител согласно изобретению.

В используемом в данном описании смысле термин «блокирование взаимодействия между Cripto и ALK 4» означает увеличение или уменьшение взаимодействия, т.е. связывания между Cripto и ALK4 примерно на 5%, предпочтительно на 10%, более предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, более предпочтительно на 40%, более предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 60%, более предпочтительно на 70%, более предпочтительно на 80%, более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100%. Активность можно измерить с помощью анализов, известных в данной области, таких как анализ связывания, показанный в примере 8.

В используемом в данном описании смысле термин «модулирование роста опухолевых клеток in vitro» означает увеличение или уменьшение количества опухолевых клеток in vitro примерно на 5%, предпочтительно на 10%, более предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, более предпочтительно на 40%, более предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 60%, более предпочтительно на 70%, более предпочтительно на 80%, более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100%. Модулирование роста опухолевых клеток in vitro можно измерить с помощью анализов, известных в данной области, таких как анализ в мягком агаре клеток GEO, показанный в примере 4.

В используемом в данном описании смысле «модулирование роста опухолевых клеток in vivo» означает увеличение или уменьшение количества опухолевых клеток in vivo примерно на 5%, предпочтительно на 10%, более предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, более предпочтительно на 40%, более предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 60%, более предпочтительно на 70%, более предпочтительно на 80%, более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100%. Модулирование роста опухолевых клеток in vivo можно измерить с помощью анализов, известных в данной области, таких как анализ, показанный в примере 5.

Термин «профилактика» относится к уменьшению вероятности того, что организм будет заражен или будет развиваться аномальное состояние.

Термин «лечение» относится к получению терапевтического эффекта и, по меньшей мере, частичному ослаблению или отмене аномального состояния организма. Лечение включает поддержание роста опухоли в подавленном состоянии и индукцию ремиссии.

Термин «терапевтический эффект» относится к подавлению аномального состояния. Терапевтический эффект в некоторой степени уменьшает один или несколько симптомов аномального состояния. По отношению к лечению аномальных состояний терапевтический эффект может относиться к одному или нескольким из следующих показателей:

- (a) увеличение или уменьшение пролиферации, роста и/или дифференцировки клеток;
- (b) ингибирование (т.е. замедление или остановка) или стимуляция гибели клеток;
- (c) ингибирование дегенерации;

(d) уменьшение в некоторой степени одного или нескольких симптомов, связанных с аномальным состоянием; и

(e) усиление функционирования популяции клеток.

Соединения, проявляющие эффективность, направленную против аномальных состояний, можно идентифицировать, как указано в данном описании.

Термин «введение» относится к способу включения соединения в клетки или ткани организма. Можно проводить профилактику или лечение аномального состояния в том случае, когда клетки или ткани организма существуют в организме или вне организма. Клетки, существующие вне организма, можно поддерживать или выращивать на чашках для культуры ткани или в другом организме. Для клеток, которые содержатся в организме, в данной области существует много способов, чтобы ввести соединения, включая (без ограничения) пероральное, парентеральное, дермальное, инъекционное и аэрозольное применения. Для клеток вне организма в данной области существует множество способов, чтобы ввести соединения, включая (без ограничения) способы микроинъекции в клетки, способы трансформации и способы на основе носителей. Введение можно осуществить множеством способов, известных в данной области, например, перорально, внутривенно, внутривенно, внутривенно, внутривенно и т.д. В случае использования для терапии *in vivo* антитела согласно данному изобретению вводят пациенту в эффективных количествах. В используемом в данном описании смысле «эффективным количеством» является количество, достаточное для того, чтобы получить положительные или требуемые клинические результаты (т.е. количества, которые удаляют или уменьшают опухолевую нагрузку пациента). Эффективное количество можно ввести в одно или несколько введений. В целях данного изобретения эффективное количество антител согласно данному изобретению представляет собой количество антител, которое является достаточным для улучшения, стабилизации или замедления развития связанного с *Cripto* патологического состояния, в частности связанных с *Cripto* опухолей. Детенция и измерение указанных индикаторов эффективности обсуждается ниже. Пример обычного режима лечения включает введение субъекту с помощью внутривенной инфузии антител согласно изобретению по схеме один раз в неделю в дозе примерно 2-5 мг/кг. Антитела вводят амбулаторно в отделении хемоинфузии, если нет необходимости в госпитализации пациента. Другие схемы введения известны в данной области и также предполагаются в изобретении.

Профилактику и лечение аномального состояния также можно проводить с помощью введения антитела согласно изобретению в группу клеток, имеющих отклонения в пути сигнальной трансдукции в организме. Затем можно осуществлять мониторинг влияния введения соединения на функцию организма. Организм предпочтительно является организмом человека.

Подразумевается, что «сверхэкспрессия *Cripto*» означает экспрессию *Cripto* тканью, экспрессия в которой выше, чем экспрессия *Cripto* в близлежащей нормальной ткани, в статистически значимом количестве.

Термин «химиотерапевтические средства» относится к любым средствам, идентифицированным в данной области как средства, оказывающие терапевтическое воздействие на ингибирование роста опухоли, поддержание роста опухоли в подавленном состоянии и/или индукцию ремиссии, таким как природные соединения, синтетические соединения, белки, модифицированные белки и радиоактивные соединения. Химиотерапевтические средства, рассматриваемые в данном описании, включают средства, которые можно конъюгировать с антителами согласно данному изобретению, или альтернативно средства, которые можно использовать в комбинации с антителами согласно данному изобретению, не конъюгируя их с антителом. Примеры химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с антителами согласно данному изобретению, включают, но не ограничены указанным, радиоактивные конъюгаты ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ , и др.), активируемые в опухоли пролекарства (мейтанзиноиды, аналоги  $\text{CC-1065}$ , производные клихеамицина, антрациклины, алкалоиды винка и др.), ризин, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas*.

Химиотерапевтические средства, которые можно использовать в комбинации с антителами согласно изобретению, а не конъюгировать с ними (т.е. неконъюгированные химиотерапевтические средства), включают, но не ограничены указанным, следующие средства: платину (т.е., цисплатин), антрациклины, аналоги нуклеозидов (пурина и пиримидина), таксаны, камптотецины, эпиподофиллотоксины, ДНК-алкилирующие агенты, антагонисты фолатов, алкалоиды винка, ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, ингибиторы эстрогена, ингибиторы прогестерона, ингибиторы андрогена, ингибиторы ароматазы, интерфероны, интерлейкины, моноклональные антитела, таксол, камптосар, адриамицин (*dox*), 5-FU и гемцитабин. Такие химиотерапевтические средства можно использовать в практике изобретения в комбинации с антителами согласно изобретению путем совместного введения антитела и неконъюгированного химиотерапевтического средства.

«Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель» относится к биологически инертным соединениям известным в данной области и используемым в случае введения антител согласно изобретению. Приемлемые носители хорошо известны в данной области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., 1990. Приемлемые носители могут включать биосовместимые, инертные или биологически всасываемые соли, забуферивающие агенты олиго- или

полисахариды, полимеры, вязкоупругое соединение, такое как гиалуроновая кислота, агенты, повышающие вязкость, консерванты и тому подобное.

«Субъект» относится к позвоночным, в частности к представителям видов млекопитающих, и включает, но не ограничен указанным, домашних животных, спортивных животных и приматов, включая людей.

#### Антитела согласно изобретению

Антитела согласно изобретению специфично связываются с Cripto. В используемом в данном описании смысле Cripto включает белок Cripto CR-1, белок Cripto CR-3 и их фрагменты. Такие фрагменты могут представлять собой полные домены, такие как внеклеточный или внутриклеточный домены, EGF-подобный домен, Cys-богатый домен, домен, связывающий рецептор, и тому подобное. Такие фрагменты также могут включать в себя непрерывные и прерывистые эпитопы в любом домене белка Cripto.

Последовательность CR-1 длиной 188 аминокислот представляет собой следующую последовательность [SEQ ID NO: 1]:

**MDCRKMARFSYSVIWIMAI SKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS  
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS  
FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKCCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCD  
GLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTTFMLVGLICLSIQSY**

Последовательность CR-3 длиной 188 аминокислот представляет собой следующую последовательность [SEQ ID NO: 2]:

**MDCRKMVRFYSYSVIWIMAI SKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS  
IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSF  
YGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKCCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGL  
VMDEHLVASRTPPELPPSARTTTTFMLAGICLSIQSY**

В одном варианте антитела согласно изобретению связываются с эпитопом в EGF-подобном домене Cripto. EGF-подобный домен простирается примерно от аминокислотного остатка 75 до аминокислотного остатка 112 зрелого белка Cripto. Эпитопы в EGF-подобном домене могут содержать линейные или нелинейные участки аминокислотных остатков. Пример рассматриваемых линейных эпитопов включает, но не ограничен указанным, примерно остатки 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105, 100-110 или 105-112. В одном варианте эпитоп в EGF-доме является эпитопом, образуемым в конформационно нативном белке Cripto в отличие от денатурированного белка Cripto.

В другом варианте антитела согласно изобретению связываются с эпитопом в Cys-богатом домене Cripto. Cys-богатый домен простирается примерно от аминокислотного остатка 114 до аминокислотного остатка 150 зрелого белка Cripto. Эпитопы в Cys-богатом домене могут содержать линейные или нелинейные участки аминокислотных остатков. Пример рассматриваемых линейных эпитопов включает, но не ограничен указанным, примерно остатки 114-125, 120-130, 125-135, 130-140, 135-145 или 140-150. В одном варианте эпитоп в Cys-богатом домене является эпитопом, образуемым в конформационно нативном белке Cripto в отличие от денатурированного белка Cripto.

После создания антител связывание антител с Cripto можно анализировать с использованием стандартных способов, известных в данной области, таких как ELISA, тогда как присутствие Cripto на клеточной поверхности можно анализировать с использованием проточной цитометрии (FACS), как показано в примере 2. Альтернативно можно использовать любой другой способ измерения такого связывания.

Данное изобретение относится к антителам (например, моноклональным и поликлональным антителам, одноцепочечным антителам, химерным антителам, бифункциональным/биспецифичным антителам, гуманизированным антителам, человеческим антителам и антителам с привитыми районами, определяющими комплементарность (CDR), включая соединения, которые содержат последовательности CDR, которые специфично узнают полипептид согласно изобретению), специфичным по отношению к Cripto или его фрагментам. Изобретение также относится к фрагментам антител, включая Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и F<sub>v</sub>. Термины «специфичное» и «избирательное» в случае использования для описания связывания антител согласно изобретению указывают, что переменные области антител согласно изобретению узнают и связывают полипептиды Cripto. Будет понятно, что специфичные антитела согласно изобретению также могут взаимодействовать с другими белками (например, белком A. S. aureus или другими антителами в способах ELISA) посредством взаимодействий с последовательностями вне переменных областей антител и, в частности, в константной области молекулы. Скрининговые анализы для определения специфичности связывания антитела согласно изобретению (т.е. антител, которые специфично связываются с эпитопом в лиганд/рецептор-связывающем домене и домене, охватывающем остатки аминокислот 46-62) хорошо известны и постоянно используются на практике в данной области. С целью полного обсуждения таких анализов, смотри Harlow et al. (Eds.), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6. Также представлены антитела, которые узнают и связывают фрагменты белка Cripto, при условии, что антитела являются специфичными по отношению к полипептидам Cripto. Антитела согласно изобретению можно получить с использованием любого способа, хорошо известного и постоянно используемого на практике в данной области.

В одном варианте изобретение относится к антителу, которое специфично связывается с эпитопом в лиганд/рецептор-связывающем домене Crip10. Специфичность антитела более подробно описана ниже. Однако следует подчеркнуть, что антитела, которые можно создать на основе других полипептидов, которые были ранее описаны в литературе и которые способны случайно перекрестно реагировать с Crip10 (например, вследствие случайного существования сходного эпитопа в обоих полипептидах), считаются «перекрестно реагирующими» антителами. Такие перекрестно реагирующие антитела не являются антителами, «специфичными» по отношению к Crip10. Определение того, связывается ли антитело специфично с эпитопом Crip10, осуществляют с использованием любого из нескольких анализов, таких как Вестерн-блот-анализ, которые хорошо известны в данной области. Антитела, которые специфично связываются с внеклеточным эпитопом белка Crip10 (т.е. с частями белка Crip10, выявляемыми снаружи клетки) особенно полезны для идентификации клеток, которые экспрессируют Crip10, а также для модулирования лиганд/рецептор-связывающей активности Crip10.

В одном варианте изобретение относится к бесклеточной композиции, содержащей поликлональные антитела, где по меньшей мере одно из антител является антителом согласно изобретению, специфичным в отношении Crip10. Примером композиции является антисыворотка, выделенная из животного, которая представляет собой композицию, содержащую фракцию антител антисыворотки, которая была ресуспендирована в воде или в другом разбавителе, наполнителе или носителе.

В другом варианте изобретение относится к моноклональным антителам. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, поскольку направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от поликлональных препаратов, которые обычно содержат различные антитела, направленные против разных эпитопов, каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на антигене. Моноклональные антитела пригодны для повышения избирательности и специфичности способов диагностического и аналитического исследования с использованием связывания антиген-антитело. Другое преимущество моноклональных антител состоит в том, что они синтезируются культурой гибридомы, не содержащей примесей других иммуноглобулинов. Гибридомы, которые продуцируют такие антитела, также считаются аспектами изобретения.

В еще одном родственном варианте изобретение относится к антиидиотипическому антителу, специфичному в отношении антитела, которое специфично для Crip10. В целях более подробного обсуждения антиидиотипических антител смотри, например, патенты США 6063379 и 5780029.

Хорошо известно, что антитела содержат относительно небольшие антигенсвязывающие домены, которые можно выделить химическим способом или получить рекомбинантными способами. Такие домены как таковые являются пригодными в качестве молекул, связывающих Crip10, а также их можно повторно ввести в человеческие антитела или слить с химиотерапевтическим средством или полипептидом. Таким образом, в еще одном варианте изобретение относится к полипептиду, содержащему фрагмент Crip10-специфичного антитела, где фрагмент и ассоциированная молекула, если она существует, связываются с Crip10. В качестве неограничивающего примера изобретение относится к полипептидам, которые являются одноцепочечными антителами и CDR-привитыми антителами. Для более подробного обсуждения CDR-привитых антител см., например, патент США 5859205.

В другом варианте нечеловеческие антитела можно гуманизировать любым способом, известным в данной области. Гуманизированные антитела пригодны для терапевтических применений *in vivo*. Кроме того, можно синтезировать рекомбинантные «гуманизированные» антитела. Гуманизированные антитела представляют собой антитела, исходно полученные из млекопитающего, отличного от человека, для которых использовали технологию рекомбинантной ДНК, чтобы заменить некоторые или все аминокислоты, не требуемые для связывания антигена, аминокислотами из соответствующих областей легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина человека. То есть, они являются химерами, главным образом содержащими последовательности иммуноглобулина человека, в которые были встроены области, ответственные за специфичное связывание антигена (см., например, заявку на выдачу патента PCT WO 94/04679). Животных иммунизируют требуемым антигеном, выделяют соответствующие антитела и удаляют часть последовательностей переменных областей, ответственных за специфичное связывание антигена. Полученные от животного антигенсвязывающие области затем клонируют в соответствующем положении генов антитела человека, в которых были делетированы антигенсвязывающие области. Гуманизированные антитела минимизируют использование гетерологичных (межвидовых) последовательностей в антителах для применения в терапии человека, и менее вероятно, что они вызовут нежелательные иммунные ответы. Подобным образом можно получить приматизированные антитела, используя гены антител примата (например, резуса, бабуина и шимпанзе). Затем можно ввести другие изменения в каркас антитела, чтобы модулировать аффинность или иммуногенность. См., например патенты США №. 5585089, 5693761, 5693762 и 6180370.

Другой вариант изобретения включает применение человеческих антител, которые можно продуцировать в животных, отличных от человека, таких как трансгенные животные, несущие один или несколько трансгенов иммуноглобулина человека. Таких животных можно использовать в качестве источника спленоцитов для получения гибридом, как описано в патенте США 5569825, заявках на выдачу патента WO 00076310, WO 00058499 и WO 00037504, включенных в данное описание в виде ссылок.

### Модулирование сигнала

В другом варианте антитела согласно изобретению связываются с Cripto и модулируют передачу сигнала Cripto или взаимодействия Cripto-белок. Сверхэкспрессия активности Cripto может приводить к состоянию дедифференцировки, способствующему проявлению характеристик мезенхимальных клеток, повышенной пролиферации и миграции клеток (Salomon et al., *BioEssays* 21: 61-70,1999; Ciardiello et al., *Oncogene* 9: 291-298,1994; и Baldassarre et al., *Int. J. Cancer* 66: 538-543,1996), проявлению фенотипов, связанных с трансформацией клеток, наблюдаемой при неоплазии.

Одними из способов тестирования активности анти-Cripto-антител и их способности модулировать передачу сигнала Cripto является способ с использованием линии клеток F9, «нокаутированных» (КО) по Cripto (Minchiotti et al., *Mech. Dev.* 90: 133-142,2000). Cripto стимулирует фосфорилирование smad2 и фактор транскрипции FAST в эмбрионах Хепорус, и активность фактора транскрипции FAST можно контролировать, измеряя активность люциферазы репортерного гена регуляторный элемент FAST-люцифераза (Saijoh et al., *Mol. Cell* 5:35-47, 2000). В клетках F9-Cripto-КО делетирован ген Cripto, и таким образом они являются нулевыми клетками в отношении Cripto и зависимой от Cripto передачи сигнала (Minchiotti et al., *Mech. Dev.* 90: 133-142, 2000). Передачу сигнала Cripto можно оценить в клетках F9-Cripto-КО путем трансфекции генной конструкции Cripto, FAST и регуляторный элемент FAST-люцифераза. В указанных линиях клеток зависимой от Cripto FAST-люциферазной активности не наблюдается, пока в них не трансфицируют кДНК Cripto и кДНК FAST. Антитела, способные блокировать Cripto-зависимую передачу сигнала Nodal, являются антителами, которые блокируют функцию передачи сигнала Cripto.

Специалисты в данной области могут использовать другие анализы, позволяющие измерять активность Cripto, такие как анализ роста в мягком агаре (см. пример 4 ниже). Способность клеток расти в мягком агаре связана с трансформацией клеток, и анализ является классическим анализом *in vitro* для измерения ингибирования роста опухолевых клеток. Другие анализы, применимые для определения ингибирования активности, включают анализы *in vitro* на пластике и тому подобные.

### Терапевтические применения

Антитела согласно изобретению также применимы для терапевтических целей, таких как модулирование роста опухолевых клеток, диагностических целей для выявления или количественного измерения Cripto и для очистки Cripto.

В одном варианте изобретения представлены антитела, которые способны специфично связываться с Cripto и которые модулируют рост опухолевых клеток у пациента. В одном варианте опухолевыми клетками являются клетки опухоли семенников, молочной железы, толстой кишки, легкого, яичника, мочевого пузыря, матки, шейки матки, поджелудочной железы и желудка.

В другом варианте представлены антитела, которые способны специфично связываться с Cripto и которые модулируют рост опухолевых клеток, которые сверхэкспрессируют Cripto. В одном варианте опухолевыми клетками являются линии клеток, которые сверхэкспрессируют Cripto, такие как линии клеток, полученные из злокачественной опухоли молочной железы, семенников, толстой кишки, легкого, яичника, мочевого пузыря, матки, шейки матки, поджелудочной железы и желудка.

Можно проводить скрининг анти-Cripto-антител в отношении активности *in vivo* в качестве потенциальных противораковых средств, следуя стандартным протоколам, используемым специалистами в данной области, как показано в примере 4 ниже. Примеры таких протоколов в общем описаны National Cancer Institute (NCI) в их протоколах «скрининга моделей злокачественных опухолей *in vivo*», номер публикации NIH 84-2635 (февраль 1984).

В другом варианте изобретения антитела согласно изобретению используют для лечения пациента, имеющего злокачественную опухоль.

Антитела согласно данному изобретению можно комбинировать с фармацевтически приемлемым наполнителем и вводить пациенту в терапевтически эффективной дозе. Для обсуждения способов ингибирования роста опухолей смотри, например, патент США 6165464.

Также предусмотрены способы лечения субъекта, страдающего нарушением, связанным с аномальными уровнями (т.е. повышенными или пониженными) Cripto, при этом способ включает в себя введение субъекту эффективного количества антитела, которое специфично связывается с эпитопом в лиганд/рецептор-связывающем домене Cripto, включая, но не ограничиваясь указанным, случаи, когда эпитоп находится в EGF-подобном домене или Cys-богатом домене Cripto.

Также предусмотрены способы лечения субъекта, страдающего нарушением, связанным с аномальными уровнями (т.е. повышенными или пониженными) Cripto, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела, которое специфично образует комплекс с Cripto и направлено эпитопу, к которому направлено антитело, выбранное из группы, состоящей из A6C12.11, A6F8.6 (АТСС инвентарный №. РТА-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5 (АТСС инвентарный №. РТА-3317), A8H3.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18 (АТСС инвентарный №. РТА-3311), A27F6.1 (АТСС инвентарный №. РТА-3310), A40G12.8 (АТСС инвентарный №. РТА-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (АТСС инвентарный №. РТА-

3314), A17H6.1, A18B3.11 (АТСС инвентарный №. РТА-3312), A19E2.7, В3F6.17 (АТСС инвентарный №. РТА-3319) и В6G7.10 (АТСС инвентарный №. РТА-3313).

Диагностику с помощью детекции Сrpto легко осуществить посредством стандартных анализов связывания с использованием новых антител согласно изобретению, позволяющих специалистам специфично выявлять наличие Сrpto в широком круге образцов, культур и т.д.

Также предусмотрены наборы, содержащие антитело согласно изобретению, для любых приведенных в данном описании целей. Как правило, набор согласно изобретению также содержит контрольный антиген, по отношению к которому антитело является иммуноспецифичным. Варианты включают наборы, содержащие все реагенты и инструкции по их применению.

Дополнительные характерные особенности изобретения будут понятны на основе следующих иллюстративных примеров.

### Примеры

#### Пример 1. Экспрессия и очистка Сrpto.

Экспрессирующую плазмиду, названную рSGS480, конструировали с помощью субклонирования к ДНК, кодирующей аминокислотные остатки 1-169 Сrpto человека [аминокислоты 1-169 SEQ ID NO: 1], слитые с Fc-доменом IgG<sub>1</sub> человека (т.е., «CR(del C)-Fc»), в векторе рEAG1100. Для знакомства с более подробным описанием указанного вектора, см. находящуюся на совместном рассмотрении заявку на выдачу патента США с регистрационным №. 60/233148, поданную 18 сентября 2000. Вектор рEAG1100 является производным плазмиды рCMV-Sport-betaagal GIBCO-BRL Life Technologies, применение которого для временных трансфекций CHO описано Schifferli et al., 1999, Focus 21: 16. Он был получен удалением NotI-фрагмента репортерного гена бета-галактозидазы из плазмиды рCMV-Sport-Betagal (номер в каталоге 10586-014) следующим образом: плазмиду расщепляли NotI и EcoRV, NotI-фрагмент остова вектора размером 4,38 т.п.н. подвергали очистке в геле и лигировали. Лигированную ДНК трансформировали в компетентные клетки E. coli DH5-альфа. рEAG1100 выделяли в виде плазмиды, содержащей требуемый рекомбинант, из отдельной изолированной колонии. Подтверждали последовательность рEAG1100, охватывающую промотор, полилинкер и сигнал терминации транскрипции.

Плазмиду рSGS480 временно трансфицировали в клетки CHO, и клетки выращивали при 28°C в течение 7 дней. Наличие белка CR(del C)-Fc в указанных клетках и кондиционированных средах оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа. Для Вестерн-блот-анализа кондиционированные среды и клетки из Сrpto-трансфицированных культур клеток подвергали SDS-ПААГ в 4-20%-градиентных гелях при восстанавливающих условиях, с помощью электрофореза переносили на нитроцеллюлозу, и слитый белок Сrpto выявляли с помощью поликлональной кроличьей антисыворотки, полученной против конъюгата 17-мерного пептида Сrpto (содержащего остатки 97-113 SEQ ID NO: 1) с гемоцианином морского блюдечка «замочная скважина». После центрифугирования для удаления клеток проведенный Вестерн-блот-анализ показал, что белок CR(del C)-Fc эффективно секретируется в кондиционированные среды (надосадок). Надосадок наносили на белок А-сефарозу (Pharmacia), и связанный белок элюировали 25 мМ фосфатом натрия, рН 2,8, 100 мМ NaCl. Элюированный белок нейтрализовали 0,5М фосфатом натрия при рН 8,6 и анализировали в отношении содержания общего белка на основе измерений поглощения при 240-340 нм и в отношении чистоты с помощью SDS-ПААГ. Элюированный белок фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 микрона и хранили при -70°C.

#### Пример 2. Создание и скрининг антител.

Элюированный белок CR(del C)-Fc инъецировали мышам и использовали стандартные способы гибридом, известные специалистам в данной области, чтобы создать моноклональные антитела.

##### А. Создание антител.

В частности, самок мышей Robertsonian (Jackson Labs) внутрибрюшинно иммунизировали 25 мкг очищенного CR(del C)-Fc, эмульгированного с полным адьювантом Фрейнда (GibcoBRL №15721-012). Мышей два раза подвергали бустер-иммунизации внутрибрюшинно 25 мкг CR(del C)-Fc, эмульгированного с неполным адьювантом Фрейнда (GibcoBRL №15720-014), и один раз на шариках с белком А. Проводили скрининг сывороток и через 3 недели после последней бустер-иммунизации мышь с самым высоким титром бустер-иммунизировали внутрибрюшинно, используя 50 мкг растворимого CR(del C)-Fc, за три дня до слияния. Мышь бустер-иммунизировали внутривенно, используя 50 мкг CR(del C)-Fc за день до слияния. Клетки селезенки мыши сливали с клетками миеломы FL653 в соотношении 1 клетка селезенки: 6 клеток миеломы и высевали при плотности 100000, 33000 и 11000 клеток на лунку в 96-луночный планшет для культуры ткани в селективные среды. Неделю спустя проводили скрининг лунок, позитивных в отношении роста, с помощью FACS и ELISA. Проводили два слияния.

##### В. Скрининг антител.

Проводили скрининг надосадков, полученных в результате первого или второго слияния, сначала на планшетах для ELISA для узнавания белков Сrpto del C и/или EGF-подобного домена Сrpto. Планшеты ELISA покрывали контрольным слитым белком (LT-бета-рецептор-Fc), чтобы избавиться от моноклональных антител, которые узнавали эпигот Fc человека. ELISA выполняли как описано ниже в разделе С. В случае первого слияния также проводили скрининг первичных надосадков в отношении их способности узнавать белок Сrpto на клеточной поверхности линии клеток опухоли семенников NCCIT с

помощью FACS. В случае второго слияния анализировали способность надосадков узнавать Cripto на двух линиях опухолевых клеток, NCCIT и линии клеток рака молочной железы DU4475, с помощью FACS. Вторичные скрининги включали тестирование способности надосадков моноклональных антител узнавать Cripto клеточной поверхности на панели линий опухолевых клеток (см. результаты в табл. 1 и 2), способности моноклональных антител узнавать Cripto человека иммуногистохимически на срезах ткани опухоли молочной железы и толстой кишки человека, способности моноклональных антител блокировать при анализе передачи сигнала Cripto-Nodal, способности блокировать рост линий опухолевых клеток при анализах на пластике или в мягком агаре и способности интернализировать Cripto клеточной поверхности.

#### С. ELISA

Анализы ELISA выполняли следующим образом:

Материалы:

Планшеты: 96-луночные с высокой способностью к связыванию и легко промываемые планшеты Costar (07-200-642);

2-е антитело: антитело козы против мышинового IgG (H+L)-HRP (P131430);

Субстрат: субстратный набор TMB Pierce (34021);

Раствор для остановки: 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

Буферы:

Буфер для связывания: 0,1 M NaHPO<sub>4</sub>, pH 9,0;

Блокирующий буфер: PBS + 10% донорская сыворотка теленка;

Буфер для промывки: PBS + 0,1% Твин-20;

Антигены CR(del C)-Fc и CR EGF-Fc, контрольный слитый белок IgG1 человека разбавляли в буфере для связывания до 500 нг/мл. Добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C или в течение ночи при 4°C. Жидкость декантировали, и планшет переворачивали и промокали досуха. Затем добавляли 250 мкл/лунку блокирующего буфера, после чего инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Жидкость снова декантировали, и планшет переворачивали и промокали досуха. Надосадки разводили 1:50 в буфере для промывки и помещали в планшеты по 50 мкл/лунку с последующей инкубацией в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты 3 раза энергично промывали 250 мкл/лунку буфера для промывки. Затем добавляли 100 мкл/лунку 2-ого антитела, разведенного в буфере для промывки в соотношении 1:10000, с последующей инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем планшеты 3 раза энергично промывали 250 мкл/лунку буфера для промывки, затем добавляли субстрат по 100 мкл/лунку. Давали возможность окраске развиться до достаточной интенсивности, затем добавляли 100 мкл/лунку раствора для остановки и проводили регистрацию планшетов в отношении поглощения при 450 нм.

#### Р. Проточная цитометрия.

Cripto-позитивные линии клеток можно использовать для анализа моноклональных антител в отношении связывания с Cripto, используя окрашивание клеточной поверхности и проточную цитометрию следующим образом.

Клетки высвобождают из флаконов T162, используя 2 мл PBS с 5 mM EDTA в течение 10 мин при 37°C. Доводят до 20 мл средой с сывороткой, несколько раз пипетируют вверх и вниз, чтобы разъединить клетки. Центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин. Клетки промывают 5-10 мл PBS с температурой 4°C с 0,1% БСА (буфер для промывки). Центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин. Ресуспендируют при концентрации  $4 \times 10^6$ - $10^7$ /мл в буфере для промывки. Хранят на льду.

Готовят антитела для окрашивания. Очищенные антитела разводят до 1-10 мкг/мл в буфере для промывки. Добавляют по 50 мкл клеток в 96-луночные планшеты Linbro с V-образным дном (ICN 7632105). По одной лунке засевают клетками для каждого из контролей каждой линии клеток, которую необходимо анализировать, включая клетки без антитела, только со 2-м антителом, со средой для гибридом, с надосадком антител позитивного контроля, если таковой имеется или очищен, и контролем под-класса IgG (в случае использования очищенных антител).

Засевают по одной лунке для каждого экспериментального образца для каждой анализируемой линии клеток. Планшет центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин, используя настольную центрифугу, при 4°C. Быстро удаляют буфер, переворачивая планшет и встряхивая до тех пор, пока жидкость в основном не стечет. Добавляют в лунки по 40-50 мкл антител (или буфера для промывки в случае лунок без антитела или контрольных лунок только со 2-м антителом). Инкубируют по меньшей мере 30 мин-1 ч при 4°C. Планшет центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин. Быстро удаляют растворы антител. Лунки дважды промывают 200 мкл буфера для промывки на лунку, центрифугуя после каждой промывки. Буфер быстро удаляют.

Клетки в каждой лунке ресуспендируют в 50 мкл меченого R-PE антитела козы против мышинового IgG, Fc-специфичного (Jackson Immunoresearch Laboratories катал. № 115-116-071), в разведении 1:200 (в буфере для промывки). Инкубируют 20 мин при 4°C в темноте. К клеткам в каждой лунке добавляют 150 мкл буфера для промывки. Планшет центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин. Один раз промывают 200 мкл буфера для промывки на лунку. Клетки ресуспендируют в 150 мкл 1% PFA в PBS. Со-

держимое каждой лунки переносят в отдельные пробирки (круглодонные полистироловые пробирки объемом 5 мл Falcon 352052). Пробирки заворачивают в оловянную фольгу.

Затем содержимое пробирок регистрируют проточной цитометрией.

Результаты двух скрининговых исследований моноклональных антител, полученные указанным способом, дали следующие данные, суммированные в табл. 1 и 2 ниже, где в первой колонке приведены названия субклонов гибридом, в следующих двух колонках показаны результаты скрининга в ELISA, а в остальных колонках показаны результаты анализа проточной цитометрией, полученные на четырех Cripto-позитивных линиях клеток. Результаты приведены в единицах среднего показателя флуоресценции (MFI).

Таблица 1. Характеристика анти-Cripto-моноклонального антитела

Субклон гибридомы	№ депозита ATCC	ELISA Cripto delC Sups	ELISA EGF-подобный домен Cripto	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Контроль - ELISA		0,06	0,07				
Контроль - мышинный 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

Таблица 2. Характеристика анти-Cripto-моноклонального антитела

Субклон гибридомы	№ депозита ATCC	ELISA Cripto delC	ELISA EGF-подобный домен Cripto	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Контроль - ELISA		0,05	0,05				
Контроль - мышинный 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

Пример 3. Анализ нулевых клеток в отношении ингибирования передачи сигнала Cripto.

Нижеследующее является описанием анализа передачи сигнала в Cripto-нулевых клетках F9, используемого для оценки ингибирования передачи сигнала Cripto.

День 0. 6-луночные планшеты покрывают 0,1% желатином по 2 мл/лунку при 37°C в течение 15 мин.

Клетки высевают при плотности  $6 \times 10^5$  Cripto-нулевых клеток F9 на лунку.

День 1. Трансфекция.

Каждый из следующих образцов добавляют к 300 мкл OptiMem1, чтобы получить раствор А для каждого образца.

Образец 1: 0,5 мкг репортерной кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы-FAST плюс 1,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 2: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК FAST и 1 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 3: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и +0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 4: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и 0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 5: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и 0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 6: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и 0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 7: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и 0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 8: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и 0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Образец 9: 0,5 мкг кДНК (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-люциферазы, 0,5 мкг кДНК Cripto, 0,5 мкг кДНК FAST и 0,5 мкг кДНК пустого вектора.

Раствор В содержит 30 мкл липофектамина плюс 270 мкл OptiMem1.

Для каждого образца смешивают вместе раствор А и раствор В. Инкубируют 45 мин при комнатной температуре. Лунки промывают 2 мл/лунку OptiMem1. Жидкость удаляют непосредственно перед следующей стадией.

К каждой смеси растворов А+В добавляют 2,4 мл OptiMem1, перемешивают, добавляют в лунки по 1,5 мл/лунку в повторах. Инкубируют 5 ч при 37°C. Добавляют 1,5 мл/лунку DMEM + 20% FCS, 2 mM Gln, P/S в лунки, в которые вносили образцы 1-3. Анти-Cripto-антитела добавляют следующим образом: лунки с образцом 4: A27F6.1, 10 мкг/мл; лунки с образцом 5: A27F6.1, 2 мкг/мл; лунки с образцом 6: A40G12.8; 10 мкг/мл, лунки с образцом 7: A40G12.8, 2 мкг/мл; лунки с образцом 8: A10B2.18, 10 мкг/мл; лунки с образцом 9: A10B2.18, 2 мкг/мл.

День 2. Удаляют среды, клетки промывают PBS, 2 мл/лунку. Добавляют DMEM+0,5% FCS, 2 mM Gln, P/S с такими же количествами Cripto-антител, как в предыдущий день в те же самые лунки.

День 3. Проявляют сигнал люциферазы. Лунки промывают PBS + Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, 2 мл/лунку. Используют набор LucLite, Packard катал. № 6016911. Буфер и субстрат доводят до комнатной температуры. Комнату затемняют. Субстрат перерастворяют с использованием 10 мл буфера. Разбавляют 1:1 PBS + Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Жидкость из лунок удаляют. Быстро добавляют 250 мкл разбавленного субстрата в лунку, используя устройство для пипетирования нескольких образцов. Раствор перемешивают и переносят по 200 мкл в лунки 96-луночного планшета с белым непрозрачным дном Falcon 35-3296. Считывают планшет в люминометре, используя Winglow, выдавая данные в Excel. Результаты анализа суммированы ниже в табл. 3.

Таблица 3. Анализ передачи сигнала Cripto: Ингибирование анти-Cripto-моноклональными антителами.

Трансфицированная кДНК	Анти-Cripto-антитело	Относительные единицы люминесценции
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc	Отсутствует	123
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST	Отсутствует	259
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	Отсутствует	3091
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A27F6.1 10мкг/мл	1507
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A27F6.1 2мкг/мл	2297
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A40G12.8 10мкг/мл	1213
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A40G12.8 2мкг/мл	2626
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A10B2.18 10мкг/мл	3466
(N <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> luc, FAST, Cripto	A10B2.18 2мкг/мл	3103

Пример 4. Анализ ингибирования роста опухолевых клеток *in vitro*.

Ингибирование передачи сигнала *Src* также можно анализировать посредством измерения роста клеток GEO в мягком агаре. См., например, Ciardiello et al., *Oncogene*. 1994 Jan; 9 (1): 291-8; Ciardiello et al., *Cancer Res*. 1991 Feb 1; 51 (3): 1051-4.

Сначала расплавляют 3% бактоагар. Хранят при 42°C на водяной бане. Затем смешивают 3% раствор бактоагара с предварительно нагретой полной средой, чтобы получить раствор 0,6% бактоагара, который держат при 42°C. Помещают 4 мл раствора в 6-см чашки и дают возможность остыть, по меньшей мере, в течение 30 мин с образованием нижнего слоя агара. Трипсинизируют клетки GEO и ресуспендируют до 10<sup>5</sup> клеток/мл в полной среде. К суспензиям клеток добавляют анализируемые антитела или контроли, титруя антитела от 20 до 1 мкг. Смешивают равные объемы суспензий клеток GEO и 0,6% бактоагара и наслаивают по 2 мл сверху на нижний слой агара. Дают возможность остыть, по меньшей мере, в течение 1 ч. Инкубируют в течение 14 дней при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Подсчитывают колонии, видимые без применения микроскопа. Отсутствие колоний по сравнению с негативными контролями свидетельствует о том, что тестируемые антитела ингибируют рост опухолевых клеток *in vitro*.

Указанный анализ использовали для получения результатов, показанных в таблице 4, для антител A27F6.1 и B6G7.10, которые оба проявляют способность уменьшать рост колоний клеток Geo.

Таблица 4. Результаты анализа роста в мягком агаре

Антитело	Среднее количество колоний
Отсутствует	109,0
Отсутствует	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
B6G7.10 20мкг/мл	102,3
B6G7.10 10мкг/мл	71,7

Пример 5. Анализ ингибирования роста опухолевых клеток *in vivo*.

Чтобы оценить ингибирование роста опухолевых клеток линию опухолевых клеток человека имплантируют подкожно бестимусным мышам *nude* и исследуют влияние антител согласно изобретению с использованием или без дополнительных химиотерапевтических обработок, которые могут оказывать синергетическое или аддитивное действие на ингибирование опухоли.

Анализ можно проводить альтернативно с использованием различных линий опухолевых клеток, например, таких как GEO (хорошо дифференцированная линия клеток рака толстой кишки человека, культивируемая *in vitro*, получена из американской коллекции типов тканей (ATCC)), DU-4475 (линия клеток рака молочной железы *in vitro*, полученная из ATCC), NCCIT (линия клеток опухоли семенника, полученная из ATCC) или других линий, известных в данной области. Одним из примеров таких анализов является следующий анализ.

Животных индивидуально маркируют прокалыванием ушей. Линию клеток GEO пересевают *in vitro* или *in vivo* на протяжении 1-4 пассажей. Животным имплантируют клетки GEO подкожно в область правого бока. Можно использовать следующие группы животных:

№ группы	Обработка	Количество мышей
1	Контрольный физиологический раствор, 0,2 мл/мышь, в/б три раза в неделю (M,W,F)	20
2	мАт, низкая доза, в/б	10
3	мАт, средняя доза, в/б	10
4	мАт, высокая доза, в/б	10
5	5-FU, 30 мг/кг/инъекц., в/б, 3 приема/неделю (M,W,F)	10
6	Цисплатин, 2 мг/кг/инъекц., п/к, 3 приема/неделю (M,W,F)	10
7	Адриамицин, 1,6 мг/кг/инъекц., в/б, 3 приема/неделю (M,W,F)	10
8	Иринотекан, 10 мг/кг/инъекц., в/б, 5 приемов/неделю (M-F)	10
9	мАт, низкая доза, в/б + 5-FU (промежуточная доза)	10
10	мАт, средняя доза, в/б + 5-FU (промежуточная доза)	10
11	мАт, высокая доза, в/б + 5-FU (промежуточная доза)	10
12	мАт, низкая доза, в/б+цисплатин (промежуточная доза)	10
13	мАт, средняя доза, в/б+цисплатин (промежуточная доза)	10
14	мАт, высокая доза, в/б+цисплатин (промежуточная доза)	10
15	мАт, низкая доза, в/б+адриамицин (промежуточная доза)	10
16	мАт, средняя доза, в/б + адриамицин (промежуточная доза)	10
17	мАт, высокая доза, в/б+адриамицин (промежуточная доза)	10

18	мАт, низкая доза, в/б+иринотекан (промежуточная доза)	10
19	мАт, средняя доза, в/б+иринотекан (промежуточная доза)	10
20	мАт, высокая доза, в/б+иринотекан (промежуточная доза)	10

День 0: Имплантируют опухоль, регистрируют начальный вес тела животных.

День 1: Начинают обработку, как указано выше.

День 5: Начинают измерения размера опухоли и веса тела и продолжают измерения два раза в неделю вплоть до окончания эксперимента.

Оценивают измерения начального веса тела, размера опухоли, гистологию при умерщвлении и иммуногистохимический анализ опухолей, анализируя экспрессию Cripto, рост опухоли и их ингибирование.

Пример 6. Модель ксенотрансплантированной опухоли *in vivo* - анти-Cripto-антитело, блокирующее Cys-богатый домен.

Чтобы оценить ответ NCCIT линию клеток карциномы семенников человека имплантировали подкожно с антителом, которое связывается с Cys-богатым доменом Cripto.

Экспериментальные способы перечислены ниже. Результаты показаны на фиг. 1.

#### Способы и материалы

Животные: использовали самцов бестимусных мышей *nude*. Животных индивидуально нумеровали проколами на ушах.

Опухоль: NCCIT, культивируемая *in vitro* линия клеток карциномы семенников человека из медиастинальных смешанных зародышевых клеток, исходно полученная из американской коллекции типов тканей. Линию клеток пересевали *in vitro* на протяжении шести пассажей в RPMI-1640/10% FBS без антибиотиков. Животным подкожно имплантировали  $5 \times 10^6$  клеток/0,2 мл матригеля в правый бок животных.

№ группы	Обработка	Количество мышей
1	Контрольный наполнитель, (25 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, рН 7,2), 0,2 мл/мышь, в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1	20
2	A8G3.5, 1 мг/кг/инъек., в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1	10
3	A8G3.5, 3 мг/кг/инъек., в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1	10
4	A8G3.5, 10 мг/кг/инъек., в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1	10
5	Цисплатин, 2 мг/кг/инъек., п/к, 3 х/неделю (M,W,F), 6 обработок, обработки начинаются в день 1	10

#### Схема обработки

День -1. Мышей случайным образом распределяли в контрольные группы и группы обработки. Регистрировали начальный вес тела животных. Проводили первые обработки в группах с антителом. Готовили дозированные растворы. Специалисты проводили обработки вслепую вплоть до окончания анализа.

День 0. Имплантировали опухоль. Разгоняли бактериальные культуры из опухоли, имплантированной мышам.

День 1. Проводили первую обработку в группе, позитивной в отношении химиотерапевтического средства.

День 4. Регистрировали измерения начального размера опухоли для получения исходной линии размера опухоли на матригеле. Продолжали регистрировать размер опухоли и вес тела мышей 2х/неделю. Исследование контролировали ежедневно и делали заметки при любом необычном наблюдении за животными.

Конечные начальный вес тела, измерения размера опухоли и точки: веса тела.

Пример 7. Модель ксенотрансплантированной опухоли *in vivo* - анти-Cripto-антитело, блокирующее EGF-подобный домен.

Чтобы оценить ответ NCCIT линию клеток карциномы семенников человека имплантировали подкожно с антителом, которое связывается с EGF-подобным доменом Cripto.

Экспериментальные способы перечислены ниже. Результаты показаны на фиг. 2.

#### Способы и материалы

Животные: использовали самцов бестимусных мышей *nude*. Животных индивидуально нумеровали проколами на ушах.

Опухоль: NCCIT, культивируемая *in vitro* линия клеток карциномы семенников человека из медиастинальных смешанных зародышевых клеток, исходно полученная из американской коллекции типов тканей. Линию клеток пересевали *in vitro* на протяжении восьми пассажей в RPMI-1640/10% FBS без антибиотиков. Животным подкожно имплантировали  $5 \times 10^6$  клеток/0,2 мл матригеля в правый бок животных.

№ группы	Обработка	Количество мышей
1	Контрольный наполнитель, (25 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, рН 7,2), 0,2 мл/мышь, в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1	18
2	A27F6.1, 1 мг/кг/инъек., в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1 ударной дозой 2,6 мг/кг/мышь	10
3	A27F6.1, 10 мг/кг/инъек., в/б, Q14D, обработки начинаются в день -1 ударной дозой 21,2 мг/кг/мышь	10
4	Цисплатин, 2 мг/кг/инъек., п/к, 3 х/неделю (M,W,F), 6 обработок, обработки начинались в день 1	10

### Схема обработки

День -1. Мышей случайным образом распределяли в контрольные группы и группы обработки. Регистрировали начальный вес тела животных. Проводили первые обработки в группах с антителом. Готовили дозированные растворы. Специалисты проводили обработки вслепую вплоть до окончания анализа.

День 0. Имплантировали опухоль. Разгоняли бактериальные культуры из опухолей, имплантированных мышам. Бактериальные культуры были негативными в отношении загрязнения через 24 и 48 ч после отбора образца.

День 1. Проводили первую обработку в группе, позитивной в отношении химиотерапевтического средства.

День 4. Регистрировали измерения начального размера опухоли для получения исходной линии размера опухоли на матригеле. Продолжали регистрировать размер опухоли и вес тела мышей 2х/неделю. Исследование контролировали ежедневно и делали заметки при любом необычном наблюдении за животными.

Конечные начальный вес тела, измерения размера опухоли и точки: веса тела.

Пример 8. Анти-Cripto-мАт, которые блокируют связывание ALK4.

Для того чтобы определить могут ли Cripto-специфичные моноклональные антитела препятствовать способности Cripto связываться с Alk4, рецептором активина типа I, авторы применили анализ проточной цитометрией с использованием линии клеток 293, которая стабильно экспрессирует Alk4. Чтобы получить такую линию клеток клетки 293 совместно трансфицировали плазмидой, которая экспрессирует Alk4, меченый на С-конце НА-эпитопом, и плазмидой, которая экспрессирует лекарственное средство пуромидин, в соотношении 10:1. Затем проводили селекцию трансфицированных клеток в отношении пуромидина вплоть до образования колоний. Затем колонии собирали, размножали и анализировали в отношении экспрессии Alk4, используя Вестерн-блот-анализ НА. Обнаружено, что клон 21 (293-Alk4-21) экспрессирует высокие уровни Alk4 по сравнению с контролем, нетрансфицированными клетками 293.

Чтобы проанализировать связывание Cripto-Alk4 с помощью проточной цитометрии использовали очищенную растворимую форму Cripto человека (а/к 1-169), слитую с Fc-частью IgG человека Cr(delC)-Fc. Примерно 5 мкг/мл Cr(delC)-Fc или контрольного белка Fc инкубировали с  $3 \times 10^5$  клеток 293-Alk4-21 на льду в течение 30 мин в общем объеме 50 мкл буфера для FACS (PBS с 0,1% БСА). В случае образцов, содержащих анти-Cripto-антитела, 5 мкг/мл Cr(delC)-Fc предварительно инкубировали с 50 мкг/мл каждого анти-Cripto-антитела (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 льду перед добавлением клеток. Затем клетки промывали буфером для FACS, и связанный белок Fc определяли посредством инкубирования клеток с конъюгированным с R-фикоэритрином антителом козы против IgG человека (специфичным по отношению к Fc-фрагменту) из Jackson Immunologics. Затем образцы снова промывали, фиксировали в 1% параформальдегиде в PBS и анализировали, используя стандартные способы проточной цитометрии. Результаты FACS-анализа показаны на фиг. 3.

Некоторые из вариантов описанного выше изобретения в общих чертах указаны ниже и включают следующие варианты, но не ограничены ими. Как будет понятно специалистам в данной области можно осуществить многочисленные изменения и модификации различных вариантов изобретения, не отходя от сути изобретения. Подразумевается, что все такие изменения входят в объем изобретения.

Полное описание каждой публикации, цитированной в данной заявке, включено в данное описание в виде ссылки.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфично связывается с эпитопом Cripto, находящимся в домене, охватывающем аминокислотные остатки аминокислот 46-62 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.
2. Антитело, которое специфично связывается с эпитопом, выбранным из группы эпитопов, с которыми связываются продуцируемые гибридомой антитела, выбранные из группы, состоящей из A10B2.18 и B3F6.17.
3. Антитело, которое специфично связывается с Cripto и способно интернализировать Cripto.

4. Антитело, которое специфично связывается с эпитопом, находящимся в Cys-богатом домене Cripto, охватывающем аминокислотные остатки аминокислот 114-150 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.
5. Антитело, которое связывается с эпитопом, выбранным из группы эпитопов, с которыми связываются продуцируемые гибридомой антитела, выбранные из группы, состоящей из A6C12.11, A8G3.5 и A6F8.6.
6. Антитело, которое специфично связывается с Cripto и способно блокировать взаимодействие между Cripto и ALK4.
7. Моноклональное антитело, которое специфично связывается с эпитопом, выбранным из группы эпитопов, с которыми связываются продуцируемые гибридомой антитела A6C12.11, A6F8.6, A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5, A19A10.30, A10B2.18, A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1, A17H6.1, A18B3.11, B3F6.17 и B11H8.4.
8. Антитело по любому из пп.1-7, которое является фрагментом антитела, выбранного из группы, состоящей из Fab, Fab' и F(ab)2 фрагментов.
9. Антитело по любому из пп.1-7, которое является полным интактным антителом.
10. Антитело по любому из пп.1-7, которое является одноцепочечным антителом.
11. Антитело по любому из пп.1-7, которое конъюгировано с химиотерапевтическим средством.
12. Антитело по любому из пп.1-7, которое вводится в комбинации с неконъюгированным химиотерапевтическим средством.
13. Антитело по п.11, в котором химиотерапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из активируемого в опухоли пролекарства, радионуклида и токсина.
14. Антитело по п.13, в котором указанным средством является мейтанзиноид.
15. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело является антителом человека.
16. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело является моноклональным антителом.
17. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело является гуманизированным антителом.
18. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно из антител по любому из пп.1-10 и наполнитель.
19. Композиция по п.18, в которой антитело конъюгировано с химиотерапевтическим средством.
20. Композиция по п.18, дополнительно содержащая неконъюгированное химиотерапевтическое средство.
21. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент, которое специфично связывается с эпитопом, находящимся в домене, охватывающем аминокислотные остатки 46-62 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, конъюгированное с мейтанзиноидом.
22. Композиция по п.21, в которой антителом является гуманизированное антитело B3F6.17.
23. Применение композиции по любому из пп.18-22 в качестве средства, подавляющего рост опухоли *in vitro*.
24. Применение композиции по любому из пп.18-22 в качестве средства, подавляющего рост опухоли *in vivo*.
25. Применение по п.23, в котором опухолевая клетка выбрана из группы, состоящей из клеток опухоли молочной железы, семенников, толстой кишки, легкого, яичника, мочевого пузыря, матки, шейки матки, поджелудочной железы и желудка.
26. Применение по п.24, в котором опухолевая клетка выбрана из группы, состоящей из клеток опухоли молочной железы, семенников, толстой кишки, легкого, яичника, мочевого пузыря, матки, шейки матки, поджелудочной железы и желудка.
27. Применение композиции по любому из пп.18-22 для воздействия на нежелательную пролиферацию клеток.
28. Способ модулирования роста опухолевых клеток в образце *in vitro*, включающий стадию добавления к образцу композиции по любому из пп.18-22.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

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

<120> Антитела, блокирующие Cripto, и их применения  
 Thereof

<130> A117 PCT

<140> еще не присвоен  
 <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 версия 4.0

<210> 1  
 <211> 188  
 <212> белок  
 <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> белок  
 <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 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

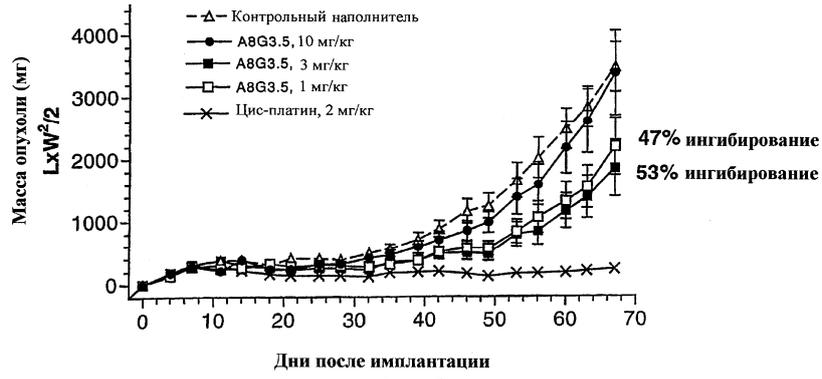
## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Последовательность CR-1 из 188 аминокислот представляет собой следующую последовательность  
 [SEQ ID NO: 1]:

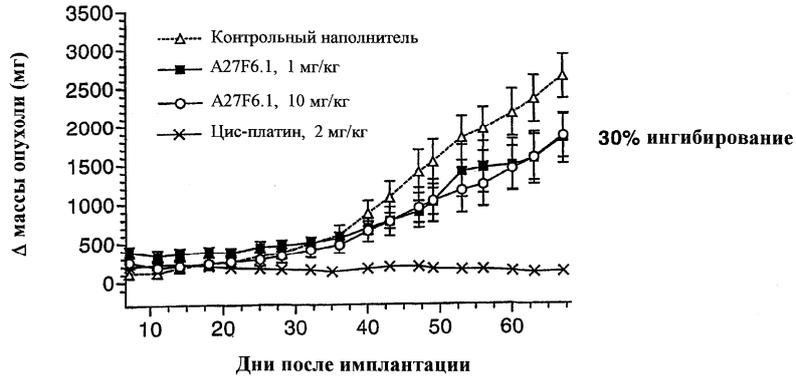
MDCRKMARFSYSVIWIMAI SKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS  
 IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS  
 FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCD  
 GLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLVGLICLSIQSY

Последовательность CR-3 из 188 аминокислот представляет собой следующую последовательность  
 [SEQ ID NO: 2]:

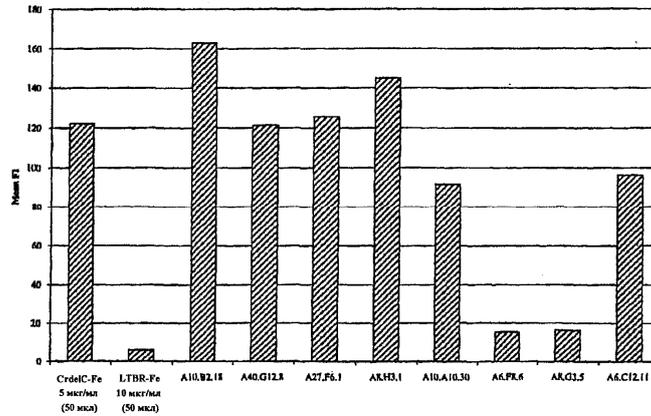
MDCRKMVRFSYSVIWIMAI SKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS  
 IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLESFCACPPSF  
 YGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGL  
 VMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLAGICLSIQSY



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

