

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6574257号
(P6574257)

(45) 発行日 令和1年9月11日(2019.9.11)

(24) 登録日 令和1年8月23日(2019.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	ZNA
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	
A61P 35/02 (2006.01)	A61P 35/02	
A61P 35/04 (2006.01)	A61P 35/04	
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	T
請求項の数 20 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-538915 (P2017-538915)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月7日 (2015.10.7)
 (65) 公表番号 特表2017-538439 (P2017-538439A)
 (43) 公表日 平成29年12月28日 (2017.12.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/054515
 (87) 国際公開番号 W02016/057683
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016.4.14)
 審査請求日 平成30年9月28日 (2018.9.28)
 (31) 優先権主張番号 62/060,974
 (32) 優先日 平成26年10月7日 (2014.10.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 511315253
 アン アンド ロバート エイチ. ルー
 リー チルドレンズ ホスピタル オブ
 シカゴ
 アメリカ合衆国 イリノイ 60601,
 シカゴ, イー. シカゴ アベニュー
 225
 (73) 特許権者 517123553
 ルーヴォ, メノッティ
 イタリア国 イー-81020 カゼルタ
 , サン ニコラ ラ ストラード, ヴ
 イーア フェデリコ フェリーニ 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の抗Nodal抗体及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と
 (b) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2と
 (c) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H3と
 (d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と
 (e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と
 (f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3と
 を含む抗Nodal抗体。

【請求項2】

前記抗体が、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

さらに、ヒトVHアクセプター2フレームワーク及びヒトVLカッパ亜群Iコンセンサスフレームワークから選択される少なくとも1つのフレームワークを含む請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

前記抗体が、配列番号13におけるエピトープに結合する請求項1に記載の抗体。

【請求項5】

前記抗体が、抗体断片である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体断片が、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、または(Fab')₂の断片から選択される請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

Nodal 活性の阻害のための、請求項 1 に記載の抗体を含む組成物であって、Nodal を発現している細胞に曝露されることを特徴とする、組成物。

【請求項 9】

Nodal の高い発現または活性に関連する障害を有する対象におけるNodal 活性の阻害のための、請求項 1 に記載の抗体を含む組成物。

【請求項 10】

前記障害が癌である請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記癌が、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌または白血病から成る群から選択される請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

試料中の Nodal を検出する方法であって、前記試料を請求項 1 に記載の抗体と接触させることを含む方法。

【請求項 13】

前記試料が、生体試料である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記生体試料が、血液、血清、体液、生検細胞、腸剥離物、喀痰、肺浸出物、尿及び組織から成る群から選択される請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記生体試料が、癌細胞および/または腫瘍細胞を含む請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記癌が、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌または白血病から成る群から選択される請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試料中の Nodal のレベルを定量することを含む請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

Nodal が免疫アッセイによって検出される請求項 12 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体を固体支持体に付着させる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗体の Nodal への結合が、酵素標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識及び/または色素標識から選択される標識によって検出される請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる 2014 年 10 月 7 日に
出願された米国仮特許出願番号第 62 / 060 , 974 号に対する優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

10

20

30

40

50

本発明は、Nodalに関連する障害または疾患を診断する、予防する及び治療するための抗Nodal抗体及び抗Nodal抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

進行性の腫瘍細胞は多数の特徴を胚性前駆細胞と共有している。脊椎動物の発生の際に、多能性前駆細胞はシグナル伝達分子の自己分泌または傍分泌の送達を介して徐々に特定の運命に特殊化され、癌の進行の際に、悪性細胞は同様に、腫瘍の増殖と転移を促進する指示を放出し、受け取る。たとえば、黒色腫細胞のような進行性の腫瘍細胞は、脱分化した多能性の可塑性表現型（微細環境の因子に応答すると同様にエピジェネティックなメカニズムを介して細胞に影響を及ぼすことができる）を表す分子署名によって明らかにされるような幹細胞様の可塑性を示す（Bittnerら、2000、Nature、406：536-540；Hendrixら、2003、Nat. Rev. Cancer、3：411-421）。さらに、進行性の黒色腫細胞は血管擬態が可能であり、すなわち、それらは内皮細胞型に関連する遺伝子を同時に発現しながら血管様のネットワークを形成することができる（SefTORら、2002、Crit. Rev. Oncology Hematol. 44：17-27；Maniotisら、1999、Am. J. Pathol. 155：739-752；Kirschmannら、2012、Clin. Cancer Res. 18：2726-2732）。

10

【0004】

以前の研究は、腫瘍細胞の挙動を調節する胚性微細環境の能力を調べることによって癌細胞と幹細胞との間の類似性を十分に利用した（Pierceら、1982、Cancer Res. 42：1082-1087；Gerschensonら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83：7307-7310；Leeら、2005、Dev. Dyn. 233：1560-1570；Mintzら、1975、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72：3585-3589）。たとえば、Pierce及びその共同研究者らは、神経胚段階のマウス胚は神経芽細胞腫の細胞を調節し、胎児の皮膚が黒色腫の増殖を阻害することを報告した（Pierceら、1982、Cancer Res. 42：1082-1087；Gerschensonら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83：7307-7310）。研究は腫瘍細胞の調節における胚性シグナルの役割に焦点を当てているが、ほとん

20

30

【0005】

幹細胞の可塑性に寄与する主要な因子の1つがNodalである。Nodalは形質転換増殖因子ベータ（TGF β ）スーパーファミリーに属する高度に保存された形態形成因子である（Schierら、2003、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19：589-621）。原腸形成の前に組織化シグナルを生じることによって、Nodalは胚軸の形成を開始し、以前の研究は、Nodalの異所性の発現が異所性の位置にて中内胚葉の運命を誘導することを明らかにした（Whitman、2001、Dev. Cell、1：605-617；Schier、2003、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19：589-621；Iannacconeら、1992、Dev. Dyn. 194：198-208；Smith、1995、Curr. Opin. Cell Biol. 7：856-861；Zhouら、1993、Nature、361：543-547；Rebagliatiら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95：9932-9937；Toyamaら、1995、Development、121：383-391）。

40

【0006】

Nodalの活性化には、共受容体であるCripto-1への結合とそれに続くI型及びII型のアクチビン様キナーゼ受容体（ALK）のリン酸化が含まれる。次にSMAD2及びSMAD3が活性化される（Leeら、2006、Nature Medicine

50

ne, 12: 882 - 884)。さらに、ヒトの胚性幹細胞はNodalを発現し、たとえば、Lefty A/BのようなNodalの内在性の阻害剤を分泌する(Besser, D., 2004, J. Biol. Chem. 279: 45076 - 45084)。それぞれマウスのLefty 1及びLefty 2に対するヒトのホモログであるLefty B及びLefty Aは染色体q42上でおおよそ50 kb離れて、互いに96%同一である(Kosakira, 1999, Am. J. Hum. Genet. 64: 712 - 21)。Lefty A及びLefty BはTGFスーパーファミリーのメンバーであり、とりわけNodalの最も強力な阻害剤であると見なされている。

Nodalは進行性の癌の多数の異なる形態にて再活性化され、異常に上方調節されるが、Leftyは発現停止されており - Nodalが無秩序にシグナルを送るのを許している(Postovitza, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 4329 - 4334)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Bittnerら, 2000, Nature, 406: 536 - 540

【非特許文献2】Hendrixら, 2003, Nat. Rev. Cancer, 3: 411 - 421

【非特許文献3】SefTORら, 2002, Crit. Rev. Oncology Hematol. 44: 17 - 27

20

【非特許文献4】Maniotisら, 1999, Am. J. Pathol. 155: 739 - 752

【非特許文献5】Kirschmannら, 2012, Clin. Cancer Res. 18: 2726 - 2732

【非特許文献6】Pierceら, 1982, Cancer Res. 42: 1082 - 1087

【非特許文献7】Gerschensonら, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 7307 - 7310

【非特許文献8】Leeら, 2005, Dev. Dyn. 233: 1560 - 1570

【非特許文献9】Mintzら, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3585 - 3589

30

【非特許文献10】Schierら, 2003, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19: 589 - 621

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は抗Nodal抗体及びその使用方法に関する(たとえば、Nodalに関連する障害または疾患を診断する、予防する及び治療するための抗Nodal抗体の使用)。

【0009】

従って、一実施形態では、本発明はNodalに結合する抗体を提供する。好まれる実施形態では、抗Nodal抗体はモノクローナル抗体である。別の実施形態では、抗体またはその断片はプレヘリックスループ領域におけるヒトNodalのエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、抗体はNodalの活性及び/またはシグナル伝達を阻害する。別の実施形態では、抗体はヒトのNodal(hNodal)に結合する。別の実施形態では、抗体は<10 nMの K_D でNodalに結合する。別の実施形態では、抗体は<5 nMの K_D でNodalに結合する。別の実施形態では、抗体は完全長のNodalに結合する。別の実施形態では、抗体はCripto-1へのNodalの結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はCripto-1共受容体複合体へのNodalの結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はAlk4/7/ActRIIB受容体複合体へのNodalの結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はNodal及び/またはNod

40

50

a1/Cripto-1複合体の下流のシグナル伝達を阻害する。別の実施形態では、抗体はNodalの発現を下方調節する。別の実施形態では、抗体は増殖のマーカ-を下方調節する。

【0010】

さらなる実施形態では、Nodalに結合するモノクローナル抗体が提供され、その際、該抗体は、(a)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(d)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(e)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、及び/または(f)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。一実施形態では、抗体はさらに少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む。一実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVHアクセプター2フレームワークを含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVLカ-パ亜群Iのコンセンサスフレームワークを含む。

10

【0011】

別の実施形態では、Nodalに結合するモノクローナル抗体が提供され、その際、該抗体は、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、モノクローナル抗体は、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを有する。一実施形態では、モノクローナル抗体は配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号1のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを有する。一実施形態では、抗体はさらに少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む。一実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVHアクセプター2フレームワークを含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVLカ-パ亜群Iのコンセンサスフレームワークを含む。

20

【0012】

さらなる実施形態では、Nodalに結合するモノクローナル抗体が提供され、その際、抗体は、(a)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、(b)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、(c)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(d)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(e)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、及び(f)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。一実施形態では、抗体はさらに少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む。一実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVHアクセプター2フレームワークを含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVLカ-パ亜群Iのコンセンサスフレームワークを含む。

30

【0013】

別の実施形態では、Nodalに結合するモノクローナル抗体が提供され、その際、該抗体は、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、モノクローナル抗体は、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、抗体はさらに少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む。一実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVHアクセプター2フレームワークを含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVLカ-パ亜群Iのコンセンサスフレームワークを含む。

40

【0014】

別の実施形態では、Nodalに結合するモノクローナル抗体が提供され、その際、該抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号4のアミノ酸配列

50

を含むHVR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。一実施形態では、抗体はさらに少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む。一実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVHアクセプター2フレームワークを含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVLカップ亜群Iのコンセンサスフレームワークを含む。

【0015】

別の実施形態では、Noda1に結合するモノクローナル抗体が提供され、その際、該抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。一実施形態では、抗体はさらに少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む。一実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVHアクセプター2フレームワークを含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク領域はヒトVLカップ亜群Iのコンセンサスフレームワークを含む。

10

【0016】

本発明はまた配列番号13におけるエピトープに結合する単離された抗体も提供する。別の実施形態では、Noda1のプレヘリックスループ領域に結合する単離された抗体が提供される。

【0017】

一実施形態では、抗Noda1抗体は、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、または(Fab')₂の断片から選択される抗体断片である。一実施形態では、抗体は抗原を結合する抗体断片である。別の実施形態では、抗体は単鎖Fvである。別の実施形態では、抗体はヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。

20

【0018】

追加の実施形態では、本発明はまた、上記実施形態のいずれか1つが個々に使用される(たとえば、組成物または診断キットにて個々に存在する)ことも提供する。別の実施形態では、上記実施形態のいずれかは実施形態の他の1つとの組み合わせで使用される。

【0019】

本発明は本発明の抗Noda1抗体を用いてNoda1の活性を阻害する方法も提供する。一実施形態では、本発明は上記実施形態のいずれかに従って、Noda1を発現している細胞を抗体に曝露することを含む、Noda1の活性を阻害する方法を提供する。一実施形態では、本発明は、Noda1の高い発現または活性に関連する障害を治療する方法を提供し、該方法は有効量の本発明の抗Noda1抗体を対象(たとえば、それを必要とする対象)に投与することを含む。一実施形態では、障害は癌である。一実施形態では、抗体は少なくとも1以上の治療剤と共に併用でまたは順次投与される。本発明は特定の作用剤に限定されない。実際、本明細書に記載されている化学療法剤(単数)または化学療法剤(複数)を含むが、これらに限定されない種々の作用剤が本発明の抗体と共に投与されてもよい。一実施形態では、治療剤はLeftyタンパク質(たとえば、組換えLeftyタンパク質)である。一実施形態では、本発明の抗体及び治療剤(単数)または治療剤(複数)は対象に別々に投与される。別の実施形態では、本発明の抗体及び治療剤は同時投与される。

30

40

【0020】

本発明はまた腫瘍細胞の増殖を抑制する方法も提供し、該方法は有効量の本発明の抗Noda1抗体を対象(たとえば、それを必要とする対象(例えば癌を有する対象))に投与することを含む。別の実施形態では、本発明は癌の転移を抑制する方法を提供し、該方法はそれを必要とする対象に有効量の本発明の抗Noda1抗体を投与することを含む。本発明は特定の型の腫瘍または転移癌または他のNoda1が主導する疾患に限定されない。実際、本明細書に記載されているように、本明細書に記載されているものを含むが、これらに限定されない種々の癌、新生物、腫瘍、及びそれらの転移形態が治療されてもよい。一実施形態では、癌は乳癌である。別の実施形態では、癌は黒色腫である。別の実施形態では、癌は前立腺癌である。

50

【0021】

本発明はまた、Noda1を特異的に結合するモノクローナル抗体のVH鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸も提供する。一実施形態では、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つNoda1の活性を阻害する。別の実施形態では、VH鎖領域は配列番号10のCDR-H1と配列番号11のCDR-H2と配列番号12のCDR-H3とを含む。別の実施形態では、VH鎖領域は配列番号3を含む。別の実施形態では、本発明は上記実施形態のいずれか1つの核酸を含む単離された細胞を提供する。本発明はまた、ポリペプチドの産生に適する条件下で上記実施形態のいずれか1つの核酸を含む単離された細胞を培養することと、産生されたポリペプチドを単離することとを含む、Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体のVH鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドを産生させる方法も提供する。

10

【0022】

本発明はまた、Noda1を特異的に結合するモノクローナル抗体のVH鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸も提供する。一実施形態では、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つNoda1の活性を阻害する。別の実施形態では、VH鎖領域は配列番号7のCDR-H1と配列番号8のCDR-H2と配列番号9のCDR-H3とを含む。別の実施形態では、VH鎖領域は配列番号2を含む。別の実施形態では、本発明は上記実施形態のいずれか1つの核酸を含む単離された細胞を提供する。本発明はまた、ポリペプチドの産生に適する条件下で上記実施形態のいずれか1つの核酸を含む単離された細胞を培養することと、産生されたポリペプチドを単離することとを含む、Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体のVH鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドを産生させる方法も提供する。

20

【0023】

本発明はまた、Noda1を特異的に結合するモノクローナル抗体のVL鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸も提供する。一実施形態では、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つNoda1の活性を阻害する。別の実施形態では、VL鎖領域は配列番号4のCDR-L1と配列番号5のCDR-L2と配列番号6のCDR-L3とを含む。別の実施形態では、VL鎖領域は配列番号1を含む。別の実施形態では、本発明は上記実施形態のいずれか1つの核酸を含む単離された細胞を提供する。本発明はまた、ポリペプチドの産生に適する条件下で上記実施形態のいずれか1つの核酸を含む単離された細胞を培養することと、産生されたポリペプチドを単離することとを含む、Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体のVL鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドを産生させる方法も提供する。

30

【0024】

本発明はまた、Noda1を特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸も提供し、その際、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ抗体はNoda1の活性を阻害する。一実施形態では、抗体は、配列番号10のCDR-H1と配列番号11のCDR-H2と配列番号12のCDR-H3とを含むVH鎖領域と、配列番号4のCDR-L1と配列番号5のCDR-L2と配列番号6のCDR-L3とを含むVL鎖領域とを含む。一実施形態では、VH鎖領域は配列番号3を含み、且つVL鎖領域は配列番号1を含む。一実施形態では、抗体は配列番号3のVH鎖領域と配列番号1のVL鎖領域とを含むモノクローナル抗体のヒト化形態である。一実施形態では、抗体はCrypto-1へのNoda1の結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はAlk4/7/ActRIIB受容体複合体へのNoda1の結合を阻害する。

40

【0025】

本発明はまた、Noda1を特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸も提供し、その際、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ抗体はNoda1の活性を阻害する。一実施形態では、抗体は、配列番号7のCDR-H1と配列番号8のCDR-H2と配列番号9のCDR-H3とを含むVH鎖領域と、配列番号4のCDR-L1と配列番号5のCDR-L2と配列番号6のCDR-L3とを

50

含むV L鎖領域とを含む。一実施形態では、V H鎖領域は配列番号2を含み、且つV L鎖領域は配列番号1を含む。一実施形態では、抗体は配列番号2のV H鎖領域と配列番号1のV L鎖領域とを含むモノクローナル抗体のヒト化形態である。一実施形態では、抗体はC r i p t o - 1へのN o d a lの結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はA l k 4 / 7 / A c t R I I B受容体複合体へのN o d a lの結合を阻害する。

【0026】

本発明はまた、N o d a lを特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸も提供し、その際、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ抗体はN o d a lの活性を阻害する。一実施形態では、抗体は、配列番号4のC D R - L 1と配列番号5のC D R - L 2と配列番号6のC D R - L 3とを含むV L鎖領域を含む。一実施形態では、V L鎖領域は配列番号1を含む。一実施形態では、抗体は配列番号3のV H鎖領域と配列番号1のV L鎖領域とを含むモノクローナル抗体のヒト化形態である。一実施形態では、抗体はC r i p t o - 1へのN o d a lの結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はA l k 4 / 7 / A c t R I I B受容体複合体へのN o d a lの結合を阻害する。

10

【0027】

本発明はまた、N o d a lを特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸も提供し、その際、抗体は配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ抗体はN o d a lの活性を阻害する。一実施形態では、抗体は、配列番号4のC D R - L 1と配列番号5のC D R - L 2と配列番号6のC D R - L 3とを含むV L鎖領域を含む。一実施形態では、V L鎖領域は配列番号1を含む。一実施形態では、抗体は配列番号2のV H鎖領域と配列番号1のV L鎖領域とを含むモノクローナル抗体のヒト化形態である。一実施形態では、抗体はC r i p t o - 1へのN o d a lの結合を阻害する。別の実施形態では、抗体はA l k 4 / 7 / A c t R I I B受容体複合体へのN o d a lの結合を阻害する。

20

【0028】

本発明はまた、N o d a lのプレヘリックスループ領域に結合するモノクローナル抗体も提供する。一実施形態では、抗体はN o d a lの活性及び/またはシグナル伝達を阻害する。一実施形態では、抗体は転移細胞(たとえば、転移性黒色腫細胞)にてN o d a lの発現を低減する。一実施形態では、抗体はS m a d 2及び/またはM A P K(たとえば、黒色腫細胞における)のリン酸化を低減する。一実施形態では、抗体は転移細胞(たとえば、転移性黒色腫細胞)の肺でのコロニー形成を低減する。一実施形態では、抗体は試験管内での黒色腫細胞の生存率を減らし、黒色腫の細胞死を誘導する。一実施形態では、抗体は生体内で腫瘍(たとえば、乳癌腫瘍)の増殖を阻害する。一実施形態では、抗体は対照に比べて乳癌の腫瘍体積を低減する。

30

【0029】

本発明はまた、N o d a lを結合するのに十分な条件下でN o d a lに結合する本発明の抗体またはその断片と対象に由来する試料(たとえば、本明細書に記載されている生体試料)を接触させることを含む、対象にて癌を診断する方法も提供し、その際、正常な非癌対照に比べたN o d a lの上昇は癌を示す。本発明は検出される癌の型によって限定されない。実際、本明細書に記載されている任意の癌(膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌及び白血病を含むが、これらに限定されない)が検出されてもよい。好まれる実施形態では、癌はN o d a lタンパク質を発現する。本明細書に記載されている抗体またはその断片は本発明の診断法で使用されてもよい。組織、血液、糞便、血漿、体液、血清、唾液、肺浸出液、喀痰、尿及び腸剥離物を含むが、これらに限定されない、対象/患者に由来する任意の種類の実体試料がN o d a lの発現について調べられてもよい。一実施形態では、N o d a lへの抗体の結合は標識によって検出される。本発明は標識の種類によって限定されない。酵素標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識及び色素標識を含むが、これらに限定されない種々の標識が使用されてもよい。酵素結合免疫吸着アッセイまたは放射性免疫アッセイまたはそれらの変

40

50

形を含むが、これらに限定されない当該技術で既知の免疫アッセイ用いてNodalが検出されてもよい。抗体を用いてタンパク質を捕捉する標識を含まない技術を用いてもNodalが検出されてもよい。標識を含まない技術には、SPR、バイオレイヤーインターフェロメトリー(BLI)、長周期グレーティング(LPG)等が挙げられる。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

Nodalに結合し、且つNodal活性を阻害するモノクローナル抗体。

(項目2)

前記抗体がNodalのプレヘリックスループ領域を結合する項目1に記載の抗体。

(項目3)

前記抗体が完全長Nodalに結合する項目1に記載の抗体。

(項目4)

前記抗体がヒトNodal(hNodal)に結合する項目1に記載の抗体。

(項目5)

前記抗体が<5nMの K_D でNodalに結合する項目1に記載の抗体。

(項目6)

前記抗体が<10nMの K_D でNodalに結合する項目1に記載の抗体。

(項目7)

前記抗体がNodalのCripto-1への結合を阻害する項目1に記載の抗体。

(項目8)

前記抗体が

(a) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と

(b) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2と

(c) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H3と

(d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と

(e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と

(f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目1に記載の抗体。

(項目9)

前記抗体が、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む項目1に記載の抗体。

(項目10)

前記重鎖可変ドメインが配列番号3のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変ドメインが配列番号1のアミノ酸配列を含む項目9に記載の抗体。

(項目11)

前記抗体が

(a) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と

(b) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H2と

(c) 配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H3と

(d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と

(e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と

(f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目1に記載の抗体。

(項目12)

前記抗体が、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む項目1に記載の抗体。

(項目13)

前記抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目1に記載の抗体。

10

20

30

40

50

(項目14)

前記抗体が、配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目1に記載の抗体。

(項目15)

さらに、ヒトVHアクセプター2フレームワーク及びヒトVLカッパ亜群Iコンセンサスフレームワークから選択される少なくとも1つのフレームワークを含む項目9に記載の抗体。

(項目16)

前記抗体が、配列番号13におけるエピトープに結合する項目1に記載の抗体。

10

(項目17)

前記抗体が、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、または(Fab')₂の断片から選択される抗体断片である項目1に記載の抗体。

(項目18)

前記抗体が、抗原を結合する抗体断片である項目1に記載の抗体。

(項目19)

前記抗体が、単鎖Fvである項目1に記載の抗体。

(項目20)

ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である項目1に記載の抗体。

(項目21)

Nodal活性の阻害方法であって、前記方法がNodalを発現している細胞を項目1に記載の抗体に曝露することを含む、前記阻害方法。

20

(項目22)

Nodalの高い発現または活性に関連する障害の治療方法であって、前記方法がそれを必要とする対象に有効量の項目1に記載の抗体を投与することを含む、前記治療方法。

(項目23)

前記障害が癌である項目22に記載の方法。

(項目24)

前記抗体が、少なくとも1つの治療剤と共に投与される項目22に記載の方法。

(項目25)

前記治療剤がLeftyタンパク質である項目24に記載の方法。

30

(項目26)

前記治療剤が化学療法剤である項目24に記載の方法。

(項目27)

前記抗体及び前記治療剤が対象に別々に投与される項目24に記載の方法。

(項目28)

腫瘍細胞の増殖の阻害方法であって、前記方法がそれを必要とする対象に有効量の項目1に記載の抗体を投与することを含む、前記阻害方法。

(項目29)

癌の転移の阻害方法であって、前記方法がそれを必要とする対象に有効量の項目1に記載の抗体を投与することを含む、前記阻害方法。

40

(項目30)

前記癌が黒色腫である項目29に記載の方法。

(項目31)

前記癌が乳癌である項目29に記載の方法。

(項目32)

Nodalの高い発現または活性に関連する障害を治療するために薬物を製造するための項目1に記載の抗体の使用。

(項目33)

癌を治療するために薬物を製造するための項目1に記載の抗体の使用。

50

- (項目34)
乳癌を治療するために薬物を製造するための項目1に記載の抗体の使用。
- (項目35)
黒色腫を治療するために薬物を製造するための項目1に記載の抗体の使用。
- (項目36)
薬物として使用するための項目1～20のいずれかに記載の抗体。
- (項目37)
Noda1の高い発現または活性に関連する障害の治療における使用のための項目1～20のいずれかに記載の抗体。
- (項目38) 10
乳癌の治療における使用のための項目1～20のいずれかに記載の抗体。
- (項目39)
黒色腫の治療における使用のための項目1～20のいずれかに記載の抗体。
- (項目40)
Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記抗体が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合する、前記モノクローナル抗体。
- (項目41)
項目40に記載の抗体のヒト化形態であって、前記ヒト化形態が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合する、前記ヒト化形態。
- (項目42) 20
さらに標識を含む項目40に記載の抗体。
- (項目43)
Noda1を特異的に結合するモノクローナル抗体のVH鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸であって、前記抗体が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つNoda1活性を阻害する、前記単離された核酸。
- (項目44)
前記VH鎖領域が、配列番号10のCDR-H1と配列番号11のCDR-H2と配列番号12のCDR-H3とを含む項目43に記載の核酸。
- (項目45) 30
前記VH鎖領域が配列番号3を含む項目43に記載の核酸。
- (項目46)
項目43に記載の核酸を含む単離された細胞。
- (項目47)
Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体のVH鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドの産生方法であって、前記ポリペプチドの産生に適する条件下で項目46に記載の細胞を培養することと、そのように産生されたポリペプチドを単離することを含む、前記産生方法。
- (項目48) 40
Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体のVL鎖領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸であって、前記抗体が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つNoda1活性を阻害する、前記単離された核酸。
- (項目49)
前記VL鎖領域が、配列番号4のCDR-L1と配列番号5のCDR-L2と配列番号6のCDR-L3とを含む項目48に記載の核酸。
- (項目50)
前記VL鎖領域が配列番号1を含む項目49に記載の核酸。
- (項目51)
項目48に記載の核酸を含む単離された細胞。
- (項目52) 50
Noda1に特異的に結合するモノクローナル抗体のVL鎖領域のアミノ酸配列を含む

ポリペプチドの産生方法であって、前記ポリペプチドの産生に適する条件下で項目51に記載の細胞を培養することと、そのように産生されたポリペプチドを単離することを含む、前記産生方法。

(項目53)

Nodalに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗体が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ前記抗体がNodal活性を阻害する、前記単離された核酸。

(項目54)

前記抗体が、配列番号10のCDR-H1と配列番号11のCDR-H2と配列番号12のCDR-H3とを含むVH鎖領域、及び配列番号4のCDR-L1と配列番号5のCDR-L2と配列番号6のCDR-L3とを含むVL領域を含む項目53に記載の核酸。

(項目55)

前記VH鎖領域が配列番号3を含み、且つ前記VL鎖領域が配列番号1を含む項目54に記載の核酸。

(項目56)

前記抗体が、配列番号3の前記VH鎖領域と配列番号1の前記VL鎖領域とを含むモノクローナル抗体のヒト化形態である項目53に記載の核酸。

(項目57)

Nodalに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗体が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ前記抗体がNodalのCrip1への結合を阻害する、前記単離された核酸。

(項目58)

Nodalに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗体が配列番号13におけるエピトープに特異的に結合し、且つ前記抗体がNodalのAlk4/7/ActRIIB受容体複合体への結合を阻害する、前記単離された核酸。

(項目59)

前記抗体が、配列番号7のCDR-H1と配列番号8のCDR-H2と配列番号9のCDR-H3とを含むVH鎖領域、及び配列番号4のCDR-L1と配列番号5のCDR-L2と配列番号6のCDR-L3とを含むVL領域を含む項目53に記載の核酸。

(項目60)

前記VH鎖領域が配列番号2を含み、且つ前記VL鎖領域が配列番号1を含む項目53に記載の核酸。

(項目61)

Nodalのプレヘリックスループ領域に結合するモノクローナル抗体であって、前記抗体がNodalの活性及び/またはシグナル伝達を阻害し、且つ以下の活性：(i) 転移性黒色腫細胞におけるNodalの発現を低下させる；(ii) 黒色腫細胞におけるSmad2及び/またはMAPKのリン酸化を減らす；(iii) 転移性黒色腫細胞の肺でのコロニー形成を減らす；(iv) 試験管内での黒色腫細胞の増殖、生存率を減らし、及び/または黒色腫の細胞死を誘導する；または(iii) 生体内での黒色腫の腫瘍増殖を抑制する、の少なくとも1つを有する、前記モノクローナル抗体。

(項目62)

前記抗体が、生体内で乳癌の腫瘍増殖を抑制する項目61に記載の抗体。

(項目63)

前記抗体が、対照に比べて乳癌の腫瘍体積を減らす項目62に記載の抗体。

(項目64)

前記抗体が試験管内にて黒色腫の細胞死を誘導する項目61に記載の抗体。

(項目65)

前記抗体が、転移性黒色腫細胞の肺でのコロニー形成を低減する項目61に記載の抗体。

(項目66)

Noda1のプレヘリックスループ領域に結合するモノクローナル抗体であって、前記抗体が配列番号13のアミノ酸49~50を含むポリペプチドに結合する、前記モノクローナル抗体。

(項目67)

前記抗体がNoda1活性を阻害する項目66に記載の抗体。

(項目68)

Noda1のプレヘリックスループ領域に結合し、且つNoda1の活性及び/またはシグナル伝達を阻害するモノクローナル抗体であって、前記抗体が結合についてCrip1と競合する、前記モノクローナル抗体。

10

(項目69)

Noda1のプレヘリックスループ領域に結合し、且つNoda1の活性及び/またはシグナル伝達を阻害するモノクローナル抗体であって、前記抗体が配列番号1のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記モノクローナル抗体。

(項目70)

Noda1の活性及び/またはシグナル伝達の阻害方法であって、前記方法がNoda1を発現している細胞を項目61に記載の抗体に曝露することを含む、前記阻害方法。

(項目71)

Noda1の活性及び/またはシグナル伝達の阻害方法であって、前記方法がNoda1を発現している細胞を項目66に記載の抗体に曝露することを含む、前記阻害方法。

20

(項目72)

Noda1の高い発現または活性に関連する障害の治療方法であって、前記方法がそれを必要とする対象に有効量の項目61に記載の抗体を投与することを含む、前記治療方法。

(項目73)

Noda1の高い発現または活性に関連する障害の治療方法であって、前記方法がそれを必要とする対象に有効量の項目66に記載の抗体を投与することを含む、前記治療方法。

(項目74)

対象における癌の診断方法であって、Noda1を結合するのに十分な条件下でNoda1に結合する抗体またはその断片に前記対象に由来する試料を接触させることを含み、正常な非癌性対照に比べたときNoda1の上昇は癌を示す、前記診断方法。

30

(項目75)

前記抗体またはその断片が<10nMのK_DでNoda1に結合する項目74に記載の方法。

(項目76)

前記抗体またはその断片が<5nMのK_DでNoda1に結合する項目74に記載の方法。

(項目77)

前記抗体が

40

(a) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と

(b) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2と

(c) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H3と

(d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と

(e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と

(f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目74に記載の方法。

(項目78)

前記抗体が、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む項目74に記載の方法。

50

(項目79)

前記重鎖可変ドメインが配列番号3のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変ドメインが配列番号1のアミノ酸配列を含む項目78に記載の方法。

(項目80)

前記抗体が、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む項目74に記載の方法。

(項目81)

前記抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目74に記載の方法。

10

(項目82)

前記抗体が、配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む項目74に記載の方法。

(項目83)

前記癌が、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌または白血病である項目74に記載の方法。

(項目84)

前記試料が、血液、血清、体液、腸剥離物、喀痰、肺浸出物、尿及び組織から成る群から選択される項目74に記載の方法。

20

(項目85)

前記抗体のNodalへの結合が、酵素標識、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識及び/または色素標識から選択される標識によって検出される項目74に記載の方法。

(項目86)

Nodalが免疫アッセイによって検出される項目74に記載の方法。

(項目87)

前記免疫アッセイが酵素結合免疫吸着アッセイまたは放射性免疫アッセイである項目86に記載の方法。

(項目88)

前記抗体を固体支持体に付着させる項目74に記載の方法。

30

(項目89)

前記固体支持体がマイクロタイタープレート、ビーズまたはバイオセンサーまたは生体表面またはスライドである項目88に記載の方法。

(項目90)

前記アッセイが標識を含まない項目89に記載の方法。

(項目91)

前記VH鎖領域が、配列番号7のCDR-H1と配列番号8のCDR-H2と配列番号9のCDR-H3とを含む項目43に記載の核酸。

(項目92)

前記VH鎖領域が配列番号2を含む項目43に記載の核酸。

40

【図面の簡単な説明】**【0030】**

【図1】NodalとCripto-1との間での相互作用界面の分子モデルを示す図である。

【図2】アミノ酸43~69(配列番号15)のヒトNodalタンパク質のアミノ酸配列を示す図である。

【図3】NodalのE49E50残基を選択的に認識するモノクローナル抗体(mAb)を分泌するものを特定するためにELISAによって比較してスクリーニングしたハイブリドーマのクローンを示す図である。

50

【図4】完全長のNodalを結合するものを選択するためにmAbをスクリーニングした結果を示す図である。

【図5】(a)抗体3D1及び(b)抗体5F10のNodalへのSPR用量依存性結合アッセイを示す図である。

【図6】Nodalの抗体3D1へのSPR用量依存性結合アッセイを示す図である。

【図7】Cripto-1とNodalとの間での相互作用を特徴付けるために行った2つの別々の結合アッセイを示す図である。相互作用の強度は約4nMのKDを示した(測定した2つのKD、A及びBの平均; AではCriptoへのNodalの結合が報告され; BではNodalへのCriptoの結合が報告される)。

【図8】3D1は不動化されたNodalへの可溶性Cripto-1の結合を妨げること

10

を示す図である。
【図9-1】(A)3D1とNodalとの間の結合の根底にある残基のエピトープマッピングに利用したNodal合成ペプチドのセットを示す図である。(B)野生型Nodalと比べた3D1への結合百分率を示す図である。(C)不動化した免疫原及びNodalE49A/E50A二重変異した変異体への3D1の用量依存性結合を示す図である。

【図9-2】(A)3D1とNodalとの間の結合の根底にある残基のエピトープマッピングに利用したNodal合成ペプチドのセットを示す図である。(B)野生型Nodalと比べた3D1への結合百分率を示す図である。(C)不動化した免疫原及びNodalE49A/E50A二重変異した変異体への3D1の用量依存性結合を示す図である

20

【図9-3】(A)3D1とNodalとの間の結合の根底にある残基のエピトープマッピングに利用したNodal合成ペプチドのセットを示す図である。(B)野生型Nodalと比べた3D1への結合百分率を示す図である。(C)不動化した免疫原及びNodalE49A/E50A二重変異した変異体への3D1の用量依存性結合を示す図である。

【図10-1】3D1による免疫アッセイを示す図である。(a)ドットプロット:50~200ngの漸増濃度にてニトロセルロース膜上でスポットを作ったrhNodalタンパク質;(b)(a)で示したドットプロットの定量;(c)ウエスタンブロット解析:還元条件下でNodalタンパク質を15%SDS-PAGEに負荷した。GAM-HRP抗体及びECL基質を検出に使用した。

30

【図10-2】3D1による免疫アッセイを示す図である。(a)ドットプロット:50~200ngの漸増濃度にてニトロセルロース膜上でスポットを作ったrhNodalタンパク質;(b)(a)で示したドットプロットの定量;(c)ウエスタンブロット解析:還元条件下でNodalタンパク質を15%SDS-PAGEに負荷した。GAM-HRP抗体及びECL基質を検出に使用した。

【図11】セファロースS200カラムによる3D1のサイズ排除分析を示す図である。

【図12】Nodalのシグナル伝達経路及びNotch4との分子クロストークの模式図である。

【図13】Nodalの細胞の背景に特異的な活性を示す図である。

40

【図14】正常なヒト組織溶解物におけるNodalの発現を示す図である。

【図15】種々の健全な組織と同様に癌性組織におけるNodal発現の差異を示す図である。

【図16】種々の細胞におけるNodal、Lefty及びCripto-1の発現を示す図である。

【図17】Nodalのシグナル伝達を示す図である。

【図18】Nodalの発現を直接調節するNotch4のシグナル伝達を示す図であり、その際、C8161及びMV3黒色腫細胞におけるNotch4の発現のノックダウン(sRNAによる)はNodalの下方調節を生じる。

【図19】非進行性のヒト黒色腫細胞(UACC1273)は、Nodalの上方調節を

50

生じるN o t c h 4 I C D - F L A Gを受け取るまでN o d a l陰性であることを示す図である。

【図20】N o d a l遺伝子の10kb上流に位置するN o d a lエンハンサ要素(N D E)はN o t c hに対する2つの推定上のR B P J結合部位を含有することを明らかにする図である。C h I PはN o t c h 4 I C DがN D EにてR B P J - 1結合部位に直接結合することを裏付けている。

【図21】非進行性でN o d a l陰性のC 8 1 - 6 1黒色腫細胞はN o d a lのc D N Aで形質移入した後、腫瘍形成性であることを示す図である。

【図22】捕捉抗体としてモノクローナル抗体3 D 1を用いてN o d a lを検出する(検出限界50pg/ウェル)ために開発されたサンドイッチE L I S Aを示す図である。

【図23-1】3 D 1を用い、血漿/血清におけるN o d a lの検出のためのx M A P技術に基づいて本発明の一実施形態にて開発された特異的で感度の高いアッセイを示す図である。

【図23-2】3 D 1を用い、血漿/血清におけるN o d a lの検出のためのx M A P技術に基づいて本発明の一実施形態にて開発された特異的で感度の高いアッセイを示す図である。

【図24-1】3 D 1抗N o d a l抗体が転移性黒色腫細胞にてN o d a lの発現、クローン形成性及び血管擬態を低下させたことを示す図である。

【図24-2】3 D 1抗N o d a l抗体が転移性黒色腫細胞にてN o d a lの発現、クローン形成性及び血管擬態を低下させたことを示す図である。

【図24-3】3 D 1抗N o d a l抗体が転移性黒色腫細胞にてN o d a lの発現、クローン形成性及び血管擬態を低下させたことを示す図である。

【図25】3 D 1抗N o d a l抗体がS m a d 2及びM A P Kのリン酸化を減らしたことを示す図である。

【図26】3 D 1抗N o d a l抗体がマウスにて転移性黒色腫細胞の肺コロニー形成を減らしたことを示す図である。

【図27】h L e f t yは、転移性黒色腫細胞において10、50及び100ng/mlにてN o d a lタンパク質の発現を阻害するのに有効であることを示す図である。

【図28】3週間のクローン形成性アッセイ+/-h L e f t yは、h L e f t yが転移性黒色腫細胞のクローン形成性を阻害するのに有効であることを明らかにすることを示す図である。

【図29-1】従来のデカルバジン(D T I C)処理はN o d a lを発現し続ける残留黒色腫細胞の集団を残すことを示す図である。

【図29-2】従来のデカルバジン(D T I C)処理はN o d a lを発現し続ける残留黒色腫細胞の集団を残すことを示す図である。

【図30】D T I Cと抗N o d a l抗体を併用する処理は細胞死を誘導したことを示す図である。

【図31-1】D T I C治療の前と後でのヒト黒色腫患者の組織におけるN o d a lの発現(暗赤/茶色の染色)を示す図である。

【図31-2】D T I C治療の前と後でのヒト黒色腫患者の組織におけるN o d a lの発現(暗赤/茶色の染色)を示す図である。

【図32-1】N o d a lのノックダウンはヒト乳癌細胞株にて増殖及び進行性挙動を損傷することを示す図である。

【図32-2】N o d a lのノックダウンはヒト乳癌細胞株にて増殖及び進行性挙動を損傷することを示す図である。

【図32-3】N o d a lのノックダウンはヒト乳癌細胞株にて増殖及び進行性挙動を損傷することを示す図である。

【図33-1】N o d a lのノックダウンは乳癌の生体内増殖を損傷することを示す図である。

【図33-2】N o d a lのノックダウンは乳癌の生体内増殖を損傷することを示す図で

10

20

30

40

50

ある。

【図34】Nodalのノックダウン細胞はp27の発現の上昇に伴ってG1で静止することを示す図である。

【図35】Nodalのシグナル伝達がC-mycの発現を調節することを示す図である。

【図36-1】Nodalが乳癌細胞においてERKの活性化を介してp27及びc-mycのタンパク質レベル並びに翻訳後修飾を調節することを示す図である。

【図36-2】Nodalが乳癌細胞においてERKの活性化を介してp27及びc-mycのタンパク質レベル並びに翻訳後修飾を調節することを示す図である。

【図37】Nodalのような幹細胞マーカーを発現する腫瘍細胞の亜集団を分離するためのSMARTFLARESの使用を示す図である。

10

【図38】標的mRNAを検出することにおけるSMARTFLARESの作用のメカニズムを示す図である。

【図39】進行性の転移性黒色腫細胞C8161(A)、MV3(B)、SK-MEL28(C)におけるNodalのmRNAの発現及び非進行性黒色腫細胞UACC1273(D)におけるNodal mRNAの非発現を検出するためのSMARTFLARESの使用を示す図である。

【図40】高いNodalのmRNAの発現と低いNodalのmRNAの発現に基づいて黒色腫の亜集団を選別できることを示す図である。

【図41-1】高いNodalのmRNAを発現している黒色腫の亜集団は付随してCD133癌幹細胞マーカーを発現することを示す図である。

20

【図41-2】高いNodalのmRNAを発現している黒色腫の亜集団は付随してCD133癌幹細胞マーカーを発現することを示す図である。

【図42】Nodal単量体のアミノ酸配列及び二次構造を示す図である。モノクローナル抗体を生成するのに使用したNodal抗原を太字にして点線で囲む。3D1によって認識されるエピトープに下線を引く。Cripto-1-1への結合に關与する残基E49及びE50に番号を付ける。

【図43】ハイブリドーマ上清のELISAに基づくスクリーニングアッセイの結果を示す図である。hNodal(44~67)及びhNodal(44~67)E49A-E50Aを1.0µg/mL(330nM)で被覆した。ハイブリドーマ上清は5.0µg/mLの総タンパク質で調べた。

30

【図44】(a)抗Nodalモノクローナル抗体のスクリーニングを示す図である。CM5センサーチップに不動化したrhNodalとの3D1及び5F10mAbの間での相互作用を示すSPRセンサーグラムオーバーレイプロット。3D1(b)について6~100nMの間及び5F10(c)について100~750nMの間の範囲でのmAbの濃度にて相互作用をモニターし、用量依存性の結合曲線を得た。

【図45】ペプシンによる3D1mAbの消化に続いて得られた生成物の非還元条件下(-)及び還元条件下(+)での12%SDS-PAGE解析を示す図である。T0:3D1抗体; Dig:6時間後の3D1のタンパク質分解消化。

【図46】(a)プロテインGアフィニティ精製のクロマト図、(b)ペプシン消化によって得られた生成物のSDS-PAGE解析、(c)保持容量を伴ったSECプロファイル及び(d)ペプシン消化によって得られたF(ab')₂のSDS-PAGE解析を示す図である。

40

【図47】(a)F(ab')₂及びFab'に還元したF(ab')₂の非還元条件下での12%SDS-PAGE解析;(b)Fab'のSECクロマトグラフィのプロファイルを示す図である。

【図48】還元し、アルキル化した3D1-Fab'のLC-MS解析を示す図である:2つの分離した鎖のクロマトグラフィプロファイル(a):軽鎖(LC)は10.07分に溶出し、3D1-Fab'の重鎖(HC)は11.31分に溶出した。双方のピークについて得られた質量スペクトルの逆重畳積分も報告されている。LCは単一で均質な生成

50

物 (b) を示すのに対して H C はヒンジ領域のペプシンの非特異的な切断に由来する複数の生成物 (c) を示した。マウス I g G 1 重鎖における想定される切断部位の模式図 (d) 。

【図 4 9】 C M 5 センサーチップに不動化された r h N o d a l への 3 D 1 の F (a b ')₂ (a) 及び F a b ' (b) の結合を示す S P R センサーグラムのオーバーレイプロットを示す図である。 2 5 ~ 5 0 0 n M の間の範囲での F (a b ')₂ の濃度及び 2 5 ~ 2 0 0 n M の間の範囲での F a b ' の濃度で相互作用をモニターし、用量依存性の結合曲線を得た。

【図 5 0】 3 D 1 の結合特性の性状分析を示す図である。(a) 3 D 1 m A b のエピトープのマッピング; ペプチドは 1 . 0 μ g / m l で被覆した。(b) ヒト N o d a l の中心領域についての 3 D 1 の特異性を示す棒グラフ; ペプチドは 1 . 0 μ g / m l で被覆した。シグナルの 1 0 0 % と想定される (B₀) (4 4 ~ 6 7) ペプチドに対して各ペプチドの吸光度 (B) を基準化した。シグナルは 4 9 0 n m で測定された相対吸光度の % として表し、 B / B₀ × 1 0 0 として算出した。

10

【図 5 1】 C M 5 センサーチップに不動化された 3 D 1 m A b (a) 及びその F a b ' 断片 (b) 双方との h N o d a l (4 4 ~ 6 7) の結合を示す S P R センサーグラムのオーバーレイプロットを示す図である。 3 D 1 への h N o d a l (4 4 ~ 6 7) の結合については 0 . 5 ~ 1 0 μ M の範囲での及び F a b ' 断片への結合については 1 ~ 1 0 μ M の範囲でのペプチドの濃度にて相互作用をモニターした。

【図 5 2】 C M 5 センサーチップに不動化された 3 D 1 m A b (a) 及びその F a b ' 断片 (b) 双方との h N o d a l (4 4 ~ 5 6) の結合を示す S P R センサーグラムのオーバーレイプロットを示す図である。 3 D 1 については 0 . 5 ~ 2 0 μ M の範囲での及び F a b ' 断片への結合については 1 ~ 2 0 μ M の範囲でのペプチドの濃度にて相互作用をモニターし、用量依存性の結合曲線を得た。

20

【図 5 3】 ヒト胚性幹細胞溶解物における内在性の N o d a l と 3 D 1 のエピトープに相当する N o d a l ペプチドとの間での競合アッセイを示す図である。 3 D 1 は 4 μ g / m l で使用し、 h N o d a l (4 4 ~ 5 6) は 1 0 μ g / m l で使用した。

【図 5 4】 (a) 還元条件下にて 1 5 % S D S - P A G E によって分解された黒色腫細胞溶解物のウエスタンブロット解析を示す図である。陽性対照として H E K - 2 9 3 細胞及び 1 0 0 n g の r h N o d a l を負荷した。 3 D 1 抗体は 2 . 0 μ g / m l で使用した。 G A M - H R P 抗体と基質としての E C L を用いて検出を達成した。 3 D 1 を用いたヒト黒色腫細胞株 L C P (b) 、 A 3 7 5 (c) 及び W M 2 6 6 (d) における N o d a l の細胞蛍光測定染色を示す図である。細胞の固定及び透過化の後にデータを回収した。無関係な I g G 1 アイソタイプの抗体を陰性対照として使用した。

30

【図 5 5】 正常なヒト組織溶解物における N o d a l の発現を示す図である。 N o d a l の発現について市販のウエスタンブロット等級のヒト組織溶解物を分析した。 H 9 h E S C に由来する溶解物を最初のレーンにて N o d a l についての陽性対照として使用した。正常なヒトの脳、腎臓、肝臓、膵臓及び心臓に由来する溶解物では N o d a l は検出されなかった。正常な骨格筋試料 1 では低い発現が検出されたが、正常な骨格筋試料 2 では発現は検出されなかった。 N o d a l は C 8 1 6 1 ヒト転移性黒色腫細胞では高度に発現されている。

40

【図 5 6 - 1】 抗 N o d a l 3 D 1 m A b の特徴を示す図である。(A) 被覆された h N o d a l [4 4 - 6 7] 及び h N o d a l [4 4 - 6 7] E 4 9 A - E 5 0 A への 3 D 1 m A b の E L I S A に基づく結合アッセイ。ペプチドは 0 . 1 8 μ g / m l (6 0 n M) で被覆した。 m A b 3 D 1 は 1 . 0 ~ 6 7 n M の間の漸増濃度にて調べた。(B) 3 D 1 m A b と C M 5 センサーチップに不動化された r h N o d a l の間での相互作用を示す S P R センサーグラムのオーバーレイプロットを示す図である。相互作用は、 6 . 0 ~ 1 0 0 n M の間での範囲の m A b の濃度でモニターし、用量依存性の結合曲線を得た。 r h N o d a l を B i a c o r e の C M 5 センサーチップに不動化し、漸増濃度にて 3 D 1 m A b 溶液をチップに注入した。(C) S P R 濃度依存性の競合アッセイによる r h N o d a

50

l / r h C r i p t o - 1 複合体の阻害。増加する抗体濃度に対する%結合のプロットが報告されている。r h N o d a l は 5 . 0 n M の固定された濃度で用いたのに対して 3 D 1 は 1 : 0 . 5 、 1 : 1 及び 1 : 2 のモル比で用いた。

【図56-2】抗Nodal 3D1 mAbの特徴を示す図である。(A)被覆されたhNodal [44-67]及びhNodal [44-67] E49A-E50Aへの3D1 mAbのELISAに基づく結合アッセイ。ペプチドは0.18 µg/ml (60 nM)で被覆した。mAb 3D1は1.0~67 nMの間の漸増濃度にて調べた。(B)3D1 mAbとCM5センサーチップに不動化されたr h N o d a l の間での相互作用を示すSPRセンサーグラムのオーバーレイプロットを示す図である。相互作用は、6.0~100 nMの間での範囲のmAbの濃度でモニターし、用量依存性の結合曲線を得た。r h N o d a l を B i a c o r e の C M 5 センサーチップに不動化し、漸増濃度にて3D1 mAb溶液をチップに注入した。(C)SPR濃度依存性の競合アッセイによるr h N o d a l / r h C r i p t o - 1 複合体の阻害。増加する抗体濃度に対する%結合のプロットが報告されている。r h N o d a l は 5 . 0 n M の固定された濃度で用いたのに対して 3 D 1 は 1 : 0 . 5 、 1 : 1 及び 1 : 2 のモル比で用いた。

10

【図57】抗Nodal 3D1 mAbの試験管内の効果をj示す図である。足場非依存性増殖アッセイの結果(A)は対照細胞に比べて3D1 mAbで処理したC8161細胞の足場非依存性増殖における有意な低下を示す。(B)血管性ネットワーク形成アッセイの結果は対照細胞に比べて3D1 mAbで処理したC8161細胞の接合部及び細管を形成する能力の有意な低下を示す(*P < 0.05)。ヒストグラムは平均値 ± SEMを表す。

20

【図58】細胞のシグナル伝達及び細胞周期に関連する分子に対する抗Nodal 3D1抗体の効果を示す図である。(A)IgG処理した対照に比べてC8161ヒト黒色腫細胞では、P-Smad2及びP-ERK1/2のレベルは3D1 mAbの処理(4 µg/ml)の4時間以内に低下する。(B)3D1 mAb処理の72時間後、IgG処理した対照に比べてC8161細胞では、p27の付随した上昇に伴ってNodal、サイクリンB1及びP-H3の低下がある。

【図59】MDA-MB-231乳癌細胞に対する抗Nodal抗体3D1抗体の効果を示す図である。ウエスタンプロット解析の結果は、IgG対照処理した細胞に比べて3D1 (4 µg/ml)で72時間処理したMDA-MB-231乳癌細胞にてNodalの45%低下及び増殖/有糸分裂マーカーであるP-H3のレベルの49%低下を示す。

30

【図60】C8161ヒト黒色腫細胞に対する抗Nodal 3D1 mAbの生体内の効果を示す図である。(A)対照IgGに比べて3D1 mAbの直接腫瘍注入で処理したC8161のヌードマウスへの同所性異種移植にて腫瘍体積の低下が認められる。ヒストグラムは平均値 ± SDを表す。(B)における代表的なIHCは、対照IgGに比べて3D1 mAbで処理したC8161の同所性異種移植ヌードマウスにてSmad2の核発現(活性化)の低下を示す(元々の拡大の20×)。ヌードマウスにおけるC8161細胞(全身性導入の後)の肺コロニー形成(H&E染色によって顕微鏡で示される)の可能性(C)(元々の拡大の40×)は対照IgG(D)に比べて3D1 mAbのIP投与によって処理された動物で有意に低下する。ヒストグラムは平均値 ± SEMを表す。(E)における代表的なIHC染色は、対照IgGに比べて3D1 mAbで処理されたヌードマウス(元々の拡大の63×)のC8161肺コロニーにてP-Smad2の核発現(活性化)の低下を示す(*p < 0.05)。

40

【図61】ヌードマウス+/-3D1でのC8161肺コロニーにおけるサイクリンB1及びp27の発現を示す代表的なIHCの結果を示す図である。サイクリンB1の発現はIgG対照に比べて3D1で処理した腫瘍で低下する。対照的に、p27の発現は対照に比べて3D1で処理したヌードマウスにて上昇する(元々の拡大63×対物レンズ)。

【図62】A375SM細胞におけるBRAFi(ダブラフェニブ)または3D1の効果を示す図である。(A)72時間後、ERK1/2活性(P-ERK1/2)は、対照に比べて10 nMのBRAFi、ダブラフェニブで処理した場合、活性のあるBRAF変異を抱くA375SMヒト黒色腫細胞株にて低下する一方で、Nodalは最小限にしか影

50

響を受けない。対照的に、A375SMの72時間の3D1処理(B)は、対照に比べてNodalの発現でさらに劇的な低下を示した。

【図63】A375SMヒト黒色腫細胞に対する抗Nodal3D1mAbの生体内での効果を示す図である。(A)8日後、A375SMの同所性ヌードマウス異種移植の平均腫瘍体積は、IgG対照処理動物よりも3D1mAbで処理した動物にて有意に小さかった。ダブルフェニブ(BRAFi)で処理した動物における腫瘍体積も対照に比べて腫瘍体積が低下する傾向を示した。ヒストグラムは平均値±SDを表す。(B)対照IgG、3D1mAbまたはBRAFiで処理したヌードマウスにおけるA375SMの同所性異種移植にて核染色を示すP-Smad2の代表的なIHCを示す図である(*P<0.05)。

10

【図64】乳癌患者の血清にてNodalを検出するために開発されたサンドイッチELISAアッセイを示す図である。(A)組換えNodalを検出するために捕捉抗体として3D1mAbを用いた典型的な較正曲線を説明する一方で、(B)患者の血清で検出されたNodal及び非浸潤性の乳癌に比べて浸潤性の乳癌患者に由来する試料にて高いNodalレベルの傾向を持つNodalを示す(点線=中央値レベル)。

【図65】正常な骨格筋におけるNodalの発現を示す図である。免疫組織化学分析は、転移性黒色腫及び転移性乳癌の組織切片にてNodalの染色を示す(挿入図:無関係なアイソタイプIgGによる陰性対照)。対照的に骨格筋の組織切片ではNodalについて感知できるほどの染色は検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

20

【0031】

定義

本発明の理解を円滑にするために、多数の用語を以下で定義する。

【0032】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、キメラ抗体、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、及び可溶性形態または結合された形態で標識することができる抗体、と同様にたとえば、酵素切断または化学切断、ペプチド合成または組換え技法のような、しかし、これらに限定されない既知の技法によって提供されるその断片、領域または誘導体を含むことにする。本明細書に記載されているように、本発明の抗Nodal抗体はNodalを結合する(たとえば、及びNodal活性を阻害する)。従って、用語「抗体」は、モノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体及び多重特異性抗体(たとえば、1を超える標的に特異的な抗体)、と同様に抗体断片(たとえば、完全長抗体と同じ標的への結合を示す)を指す。本発明の抗体はどんな型(たとえば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA)、クラス(たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)またはサブクラスであってもよい。本明細書では「免疫グロブリン」と呼ばれるネイティブな抗体は、2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖で構成される約150,000ダルトン(Gクラスのもの)のヘテロ四量体糖タンパク質である。各重鎖は多数の定常ドメインが後に続く可変ドメイン(V_H)を有する。各軽鎖は可変ドメイン(V_L)と定常ドメインとを有する。

30

40

【0033】

本明細書で使用されるとき、「抗Nodal抗体」は、ヒトのNodalに特異的に結合する(たとえば、Nodal活性を阻害するような方法で結合する)抗体を指す。一実施形態では、「抗Nodal抗体」は、Nodalの発現及び/または活性に関連する疾患もしくは障害の検出、診断もしくは事前決定を可能にする、または本発明の治療用組成物にて使用される(たとえば、Nodal関連の障害または疾患を治療する及び/または予防するために)、ヒトのNodalに結合する抗体である。

【0034】

本明細書で使用されるとき、用語「中和可能なエピトープ」は、適切な抗体によるその結合が結果的にタンパク質の機能の阻害を生じるそのタンパク質の決定基部分を指す。た

50

例えば、「中和可能なNodalのエピトープ」は、Nodalタンパク質の決定基部分であり、抗体によるその結合はCrip1とのもしくはCrip1受容体複合体とのNodalの相互作用を阻害し、またはNodalもしくはCrip1とのその複合体からの下流のシグナル伝達を阻害する。本明細書の一部の実施形態では、中和可能なNodalのエピトープは配列番号13、15または17のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0035】

本明細書で使用されるとき、用語「中和抗体」は、タンパク質の中和可能なエピトープに特異的に結合することができ、且つタンパク質の生物学的な活性（たとえば、複合体形成、下流のシグナル伝達等）を実質的に阻害するまたは排除することができる抗体を指す。

10

【0036】

（たとえば、抗体の可変ドメインの文脈にて）「可変ドメイン」にあるような用語「可変」は、抗体すべての間での配列にて、及び抗体とその特異的な標的との間に特異性を提供する抗体の部分にて広範に異なる可変ドメイン自体の構造的な特徴を指す。可変ドメイン内でのこれらの構造的な特徴は超可変領域（HVR）または相補性決定領域（CDR）と呼ばれ、軽鎖及び重鎖双方の可変ドメインに存在する。3つの重鎖HVRまたはCDR（HVRH1またはCDRH1またはH1、HVRH2またはCDRH2またはH2、及びHVRH3またはCDRH3またはH3）がある。同様に3つの軽鎖CDR（HVRL1またはCDRL1またはL1、HVRL2またはCDRL2またはL2、及びHVRL3またはCDRL3またはL3）がある。

20

【0037】

本明細書で使用されるとき、用語「フレームワーク」は、本明細書で定義されるようなCDR残基以外の可変領域の残基を指す。FRは可変ドメインのさらに高度に保存された部分である。ネイティブの重鎖及び軽鎖の可変領域はそれぞれ、大部分シート構成を採用し、ループ連結を形成する、且つ場合によってはシート構成の一部を形成する3つのCDRによって接続される4つのFR領域を含む。各鎖におけるCDRはFR領域によってごく接近して、且つ他の鎖に由来するCDRと共にまとめられ、抗体の標的結合部位の形成に寄与する（Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987を参照のこと）。本明細書で使用されるとき、免疫グロブリンのアミノ酸残基の番号付けは、特に指示されない限り、Kabataの免疫グロブリンのアミノ酸残基の番号付け方式に従って実施される。これら6つのCDRを構成する残基は、以下のように、軽鎖可変領域における残基24~34（CDRL1）、50~56（CDRL2）及び89~97（CDRL3）ならびに重鎖可変領域における31~35（CDRH1）、50~65（CDRH2）及び95~102（CDRH3）；参照によって本明細書に組み入れられるKabata、（1991）、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5th Ed. Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD.；ならびに軽鎖可変領域における残基26~32（CDRL1）、50~52（CDRL2）及び91~96（CDRL3）ならびに重鎖可変領域における26~32（CDRH1）、53~55（CDRH2）及び96~101（CDRH3）；参照によって本明細書に組み入れられるChothia及びLesk（1987）、J. Mol. Biol. 196: 901~917によって特徴付けられている。

30

40

【0038】

本明細書で使用されるとき、用語「完全にヒトのフレームワーク」は、天然にヒトで見いだされるアミノ酸配列を持つフレームワークを意味する。完全にヒトのフレームワークの例には、KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及びPOMが挙げられるが、これらに限定されない（たとえば、双方とも参照によって本明細書に組み入れ

50

られる Kabatら, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA; 及び Wuら, (1970), J. Exp. Med. 132, 211-250を参照のこと)。特定の実施形態では、本発明のヒト化抗体は完全にヒトのフレームワークまたは1以上の変化したアミノ酸を伴ったフレームワーク(たとえば、本発明のCDRを受け入れるための)を有する。

【0039】

「ヒト化抗体」は、一般に組換え技法を用いて調製され、非ヒト種の免疫グロブリンに由来する抗原結合部位と、ヒト免疫グロブリンの構造及び/または配列に基づいた分子の残りの免疫グロブリン構造とを有するキメラ分子を指す。抗原結合部位は、定常ドメインに融合された完全な可変ドメインまたは可変ドメインの適当なフレームワーク領域に移植された相補性決定領域(CDR)のみのいずれかを含んでもよい。抗原結合部位は野生型であってもよく、または1以上のアミノ酸置換によって修飾されてもよい。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最少限の配列を含有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片(たとえば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の標的結合配列)であってもよい。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン鑄型配列のものである少なくとも1つ、通常2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むであろう。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部(Fc)、通常、選択されるヒト免疫グロブリン鑄型のそれも含んでもよい。一実施形態では、ヒト化抗体は、元々の抗体の1以上のCDR「に由来する」1以上のCDRとも呼ばれる、元々の抗体に関して変化している(たとえば、親和性成熟した)1以上のCDR(1、2、3、4、5、6)を有する。

【0040】

用語「抗体断片」は完全長抗体の一部、一般に標的結合領域または可変領域を指す。抗体断片の例には、F(ab)、F(ab')、F(ab')₂及びFvの断片が挙げられる。語句、抗体の「機能的な断片または類似体」は完全長抗体と共通する質的な生物活性を有する化合物である。たとえば、抗Nodal抗体の機能的な断片または類似体は、その受容体(たとえば、Cripto-1またはAlk4/7/ActRIIB受容体複合体)に結合する及び/またはシグナル伝達(たとえば、Alk4/7/ActRIIB受容体複合体を介した)を開始するNodalの能力を阻むまたは実質的に低下させるような方法でNodalに結合することができるものである。

【0041】

本明細書で使用されるとき、抗体に関して「機能的な断片」はFv、F(ab)、及びF(ab')₂断片を指す。「Fv」断片は、強い非共有結合の会合で重鎖可変ドメイン1つと軽鎖可変ドメイン1つの二量体(V_H-V_L二量体)から成る。それは、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H-V_L二量体の表面で標的結合部位を定義するこの構成の中にある。合わせて、6つのCDRが抗体に標的結合の特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(または標的に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全体の結合部位より親和性は低いが標的を認識し、結合する能力を有する。

【0042】

「単鎖Fv」または「sFv」抗体断片は抗体のV_H及びV_Lのドメインを含み、その際、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Fvポリペプチドはさらに、sFvが標的結合に対して所望の構造を形成するのを可能にするV_HドメインとV_Lドメインの間でのポリペプチドリンカーを含む。

【0043】

用語「二重特異性抗体」は2つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片

は同一ポリペプチド鎖にて軽鎖可変ドメイン (V_L) に接続された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。

【0044】

F(ab)断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) を含有する。F(ab')断片は、抗体のヒンジ領域に由来する1以上のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端での少数の残基の付加によってF(ab)とは異なる。F(ab')断片はF(ab')₂のペプシン消化生成物のヒンジのシステインでのジスルフィド結合の切断によって作出される。

【0045】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用されるとき、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、軽微な量で存在してもよい考えられる天然に存在する変異を除いて同一である。本明細書でのモノクローナル抗体は具体的に、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の種に由来する抗体または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における相当する配列と同一でありまたは相同であり、鎖の残りが別の種に由来する抗体または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における相当する配列と同一でありまたは相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、と同様にそれらが所望の生物活性を示す限り、そのような抗体の断片を含む。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の標的部位に向けられる。さらに、通常、様々な決定基(エピトープ)に向けられた様々な抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体の調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は標的上の単一の決定基に向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の免疫グロブリンが混入しないハイブリドーマの培養によって合成されてもよい点で有利である。修飾語「モノクローナル」は抗体の実質的に均質な集団から得られる抗体の特徴を指し示し、特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されべきではない。たとえば、本発明と共に使用するためのモノクローナル抗体は周知の技法を用いてファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。本発明に従って使用される親モノクローナル抗体はKohlerら, Nature, 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作られてもよいし、または組換え法によって作られてもよい。

【0046】

ポリクローナル抗体は抗原で免疫された動物の血清に由来する抗体分子の不均質な集団である。モノクローナル抗体は抗原に特異的な抗体の実質的に均質な集団を含有し、その集団は実質的に類似するエピトープ結合部位を含有する。mAbは当業者に既知の方法によって得られてもよい。たとえば、その内容が参照によって全体として本明細書に組み入れられるKohler及びMilstein, Nature, 256:495-497, (1975); 米国特許第4,376,110号; Ausubelら編, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); ならびにHarlow及びLane, ANTIBODIES. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colliganら編, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)を参照のこと。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgAを含むどんな免疫グロブリンのクラス及びそのどんなサブクラスであってよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、試験管内、原位置、または生体内で培養されてもよい。

【0047】

キメラ抗体は、主として適用における免疫原性を減らし、産生における収率を高めるのに使用される、たとえば、マウスmAbに由来する可変領域とヒトの免疫グロブリン定常領域とを有するもののような異なる動物種に由来する分子-その異なる部分であり、たとえば、マウスのmAbはハイブリドーマからの高い収率を有するが、ヒトにおける高い免

10

20

30

40

50

疫原性を有するので、ヒト/マウスのキメラmAbが使用される。キメラ抗体及びその産生の方法は、当該技術(Cabilllyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273-3277(1984); Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984); Boulianneら, Nature, 312:643-646(1984); Cabilllyら, 欧州特許出願125023(1984年11月14日公開); Neubergerら, Nature, 314:268-270(1985); Taniguchiら, 欧州特許出願171496(1985年2月19日に公開); Morrisonら, 欧州特許出願173494(1986年3月5日公開); Neubergerら, PCT出願WO 86/01533, (1986年3月13日に公開); Kudoら, 欧州特許出願184187(1986年6月11日公開); Morrisonら, 欧州特許出願173494(1986年3月5日公開); Sahaganら, J. Immunol. 137:1066-1074(1986); Robinsonら, 国際特許公開#PCT/US86/02269(1987年5月7日公開); Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3439-3443(1987); Sunら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218(1987); Betterら, Science, 240:1041-1043(1988); ならびにHarlow及びLane Antibodies: a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(1988)にて既知である。これらの参考文献は参照によって全面的に本明細書に組み入れられる。

10

20

【0048】

本明細書で使用されるとき、用語「二重特異性の抗体」は、異なる抗体配列によって定義される2つの異なる抗原結合領域を有する免疫反応剤を指す。異なる標的は、別々の標的種におけるエピトープ(たとえば、1つの標的種におけるNodal及びCripto-1または異なるエピトープ(たとえば、Nodal))であってもよい。

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体/薬剤結合体」は、任意で治療剤または細胞傷害剤であってもよい1以上の化学剤に化学的に連結される、たとえば、抗体またはその抗原結合断片のような免疫反応剤を指す。抗体/薬剤結合体は、抗体(または断片)と、細胞傷害剤または治療剤と、薬剤の抗体への連結または結合を可能にするリンカーとを含んでもよい。抗体/薬剤結合体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれらの間での好適な範囲の薬剤負荷した種を含む、抗体に結合された1~10の薬剤を含んでもよい。抗体/薬剤結合体に含まれてもよい薬剤の非限定例には、有糸分裂阻害剤、抗腫瘍抗生剤、免疫調節剤、遺伝子治療のベクター、アルキル化剤、抗血管形成剤、代謝拮抗剤、ホウ素含有剤、化学保護剤、ホルモン、抗ホルモン剤、コルチコステロイド、光活性治療剤、オリゴヌクレオチド、放射性核種作用剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、及び放射性増感剤である。

30

【0050】

本明細書で使用されるとき、用語「患者」は好ましくは、治療(たとえば、癌または前癌性の状態もしくは病変を治療すること)を必要とするヒトを指す。しかしながら、用語「患者」はまた、とりわけ治療の必要がある、非ヒト動物、好ましくは、たとえば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ及び非ヒト霊長類のような哺乳類も指すことができる。

40

【0051】

用語「群」は患者の亜群と同様に患者の群を指す。

【0052】

本明細書で使用されるとき、用語「精製された」または「精製する」は試料からの混入物の除去を指す。たとえば、抗Nodal抗体は混入している非免疫グロブリンタンパク質の除去によって精製されてもよく;それらはまた、同一抗原に結合しない免疫グロブリンの除去によっても精製される。非免疫グロブリンタンパク質の除去及び/または特定の

50

抗原に結合しない免疫グロブリンの除去は、結果的に試料にて抗原特異的な免疫グロブリンの比率の上昇を生じる。別の例では、組換えの抗原特異的なポリペプチドが細菌の宿主細胞で発現され、宿主細胞タンパク質の除去によって該ポリペプチドを精製し、それによって組換えの抗原特異的なポリペプチドの比率が試料にて高められる。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用されるとき、「単離された」抗体または抗体断片は、その天然環境の成分から特定され、分離され、及び/または回収されているものである。その天然環境の混入成分は、抗体または抗体断片の診断用途または治療用途を妨害することになる物質であり、それらには、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様のまたは非タンパク質様の溶質が挙げられてもよい。特定の実施形態では、単離された抗体は、(1) Lowry法によって測定したときポリペプチドの95重量%を超えるまで、好ましくは99重量%を超えるまで、(2) スピнкаップシークエネータの使用によってN末端もしくは内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、(3) クマシーブルー染色もしくは銀染色を用いた還元もしくは非還元の条件下でのSDS-PAGEによる均質性まで、または(4) クロマトグラフィを用いて精製される。単離された抗体には、ポリペプチドの天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、組換え細胞内の原位置での抗体が含まれる。しかしながら、普通、単離された抗体は、少なくとも1回の精製工程によって調製されるであろう。

10

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用されるとき、用語「治療」は治療上の処置及び予防上または防止上の対策の双方を指す。治療を必要とするものには、すでに障害を持っているものと同様に障害が予防されるべきであるもの(たとえば、特定の疾患または障害を有すると疑われるものまたはそのリスクがあるもの)が含まれる。

20

【 0 0 5 5 】

抗イディオタイプ(抗Id)抗体は、抗体の抗原結合部位と一般に関連する独特の決定基を認識する抗体である。抗Id抗体は、mAbの供給源と同じ種及び遺伝子型の動物を抗Idが調製されるmAbで免疫することによって調製することができる。免疫された動物は、これらイディオタイプ決定基に対する抗体(抗Id抗体)を産生することによって免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識し、それに応答するであろう。

【 0 0 5 6 】

抗Id抗体も「免疫原」として用いてさらに別の動物で免疫応答を誘導してもよく、いわゆる抗抗Id抗体を産生させてもよい。抗抗Idは抗Idを誘導した元々のmAbとエピトープ上は同一であってもよい。従って、mAbのイディオタイプ決定基に対する抗体を用いて同一の特異性の抗体を発現している他のクローンを特定することが可能である。

30

【 0 0 5 7 】

抗体鎖のポリペプチド配列に関して、用語「実質的に同一の」は、参照ポリペプチド配列に対する少なくとも70%または80%または90%または95%の配列同一性を示す抗体鎖として解釈されてもよい。核酸配列に関するその用語は、参照核酸配列に対する少なくとも85%または90%または95%または97%の配列同一性を示すヌクレオチドの配列として解釈されてもよい。

40

【 0 0 5 8 】

用語「同一性」または「相同性」は、配列を並べ、ギャップを導入し、必要に応じて配列全体について最大のパーセント同一性を達成した後、配列同一性の一部として保存された置換を考慮せずに、それが比較される相当する配列の残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基の比率を意味するように解釈されるべきである。N末端またはC末端の伸長も挿入も同一性または相同性を減らすと解釈されるべきではない。配列比較のための方法及びコンピュータプログラムは当該技術で周知である。配列同一性は配列解析ソフトウェアを用いて測定されてもよい。

【 0 0 5 9 】

細胞生物、細胞または細胞株のDNAによる「形質転換」は、染色体外の要素として、

50

または染色体への組み込みによってDNAが複製可能であるように標的細胞にDNAを導入することを意味する。DNAによる細胞または生物への「形質移入」は、任意のコーディング配列が実際発現されるか否かの、細胞または生物によるDNA、たとえば、発現ベクターの取り込みを指す。用語「形質移入された宿主細胞」及び「形質転換された」はDNAが導入された細胞を指す。細胞は「宿主細胞」と呼ばれ、それは原核細胞または真核細胞のいずれであってもよい。典型的な原核生物の宿主細胞にはE. coliの種々の株が挙げられる。典型的な真核生物の宿主細胞は、たとえば、チャイニーズハムスターの卵巣またはヒト起源の細胞のような哺乳類細胞である。導入されるDNA配列は、宿主細胞と同一の種もしくは宿主細胞とは異なる種に由来してもよく、または一部の外来DNAと一部の相同DNAとを含有するハイブリッドDNA配列であってもよい。

10

【0060】

用語「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」には子孫が含まれる。故意のまたは不測の突然変異のせいで子孫はすべてDNA含量が正確に同一であるわけではなくてもよいことも理解される。元々形質転換された細胞にてスクリーニングされるような、同一の機能または生物特性を有する変異体子孫が含まれる。本発明で使用される「宿主細胞」は一般に原核宿主または真核宿主である。

【0061】

用語「ベクター」は、好適な宿主にてDNAの発現を達成することができる好適な制御配列に操作可能に連結されるDNA配列を含有するDNA構築物を意味する。そのような制御配列には、転写を達成するプロモータ、そのような転写を制御する任意のオペレータ配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、及び転写と翻訳の終結を制御する配列が挙げられる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、または単純に可能性のあるゲノム挿入物であってもよい。好適な宿主でいったん形質転換されると、ベクターは、宿主ゲノムとは無関係に複製し、機能してもよく、場合によってはゲノム自体に統合してもよい。本明細書では、「プラスミド」及び「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般に使用される形態なので、相互交換可能に使用されることがある。しかしながら、本発明は、当該技術と同等の、且つ当該技術で既知であるまたは当該技術で既知になる機能を果たすベクターのそのような他の形態を含むように意図される。

20

【0062】

単語「標識」は本明細書で使用されるとき、分子またはタンパク質、たとえば、抗体に直接または間接的に結合することができる検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体検出可能であってもよく（たとえば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合、検出可能である基質化合物または基質組成物の化学変化を触媒してもよい。

30

【0063】

本明細書で使用されるとき、「固相」は本発明の抗体が付着することができる非水性マトリクスを意味する。固相の例には、ガラス（たとえば、制御された細孔ガラス）多糖類（たとえば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで部分的にまたは全体的に形成されたものが挙げられる。特定の実施形態では、文脈に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを含むことができ；他では、それは精製カラム（たとえば、アフィニティクロマトグラフィカラム）である。

40

【0064】

本明細書で使用されるとき、用語「固形腫瘍」には、たとえば、肉腫、黒色腫、癌腫、前立腺癌、肺癌、結腸癌、または他の固形腫瘍癌が含まれる。

【0065】

用語「癌」、「癌性の」または「悪性の」は、通常、無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳類における生理的な状態を指し、またはそれを記載する。癌の例には、たとえば、白血病、リンパ腫、芽腫、癌腫及び肉腫が挙げられる。そのような癌のさらに詳しい例には、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病（Ph+ALL）、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞癌、神経膠腫、消化器

50

癌、腎臓癌、卵巣癌、肝臓癌、直腸結腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽腫、膵臓癌、多形性膠芽腫、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、頭頸部の癌、胃癌、胚細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）及び本明細書に記載されている他の癌が挙げられる。

【0066】

「白血病」は、血液形成臓器の進行性で悪性の疾患であり、一般に血液及び骨髄における白血球及びその前駆細胞の歪んだ増殖及び発生を特徴とする。白血病は一般に臨床的に（1）疾患の持続時間及び特徴 - 急性または慢性、（2）関与する細胞の型；骨髄系（骨髄性）、リンパ系（リンパ性）または単球性、及び（3）血液における異常細胞の数の増加または非増加 - 白血性または非白血性（亜白血性）に基づいて分類される。白血病には、たとえば、急性非リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球性白血病、好塩基球性白血病、芽細胞性白血病、ウシ白血病、慢性骨髄球性白血病、皮膚白血病、胚性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリー細胞白血病、血芽性白血病、血球芽細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞白血病、急性単核球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ向性白血病、リンパ様白血病、リンパ肉腫細胞白血病、肥満細胞白血病、巨核球性白血病、微小骨髄球性白血病、単核球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄顆粒球性白血病、骨髄性単球性白血病、ナエゲリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞白血病、シリング白血病、幹細胞白血病、亜白血病性白血病、および未分化細胞白血病が挙げられる。特定の態様では、本発明は、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、及び/またはフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病（Ph+ALL）のための治療を提供する。

【0067】

用語「Nodalタンパク質の過剰発現」及び「Nodalタンパク質の異常発現」は、特定の組織または臓器の正常細胞における発現のレベルに比べて患者のその組織または臓器の中での細胞（たとえば、癌または腫瘍またはNodalが上昇している他の疾患過程の中での）における胚性Nodalのシグナル伝達経路の再活性化またはNodalタンパク質の発現の異常なレベルを示すように意図される。たとえば、Nodalの過剰発現または異常発現を特徴とする癌を有する患者は、当該技術で既知の標準的なアッセイによって決定することができる。免疫組織化学（IHC）の検出を用いて凍結組織切片またはパラフィン包埋組織切片の固定された細胞にて過剰発現または異常発現を測定することができる。組織学的な染色と合わせると、標的とされるタンパク質の局在を決定することができる。その発現（たとえば、腫瘍内で）の程度を質的に及び半定量的にの双方で測定することができる。

【0068】

用語「Nodal陽性の癌」は、Nodalの過剰発現または異常発現を特徴とする乳癌、黒色腫または本明細書に記載されている他の種類の癌のような癌疾患を指す。

【0069】

用語「再発癌」は、前の治療に当初応答したが、治療応答が維持されなかった腫瘍患者における異常細胞の制御されない増殖を指す。用語「再発したNodal陽性癌」は、抗Nodal抗体による前の治療に当初応答したが、抗Nodal抗体による治療の間に治療応答が維持されなかった腫瘍患者におけるNodalタンパク質の過剰発現または異常発現を特徴とする異常細胞の制御されない増殖を指す。

【0070】

治療応答（RE）は、患者の治療を評価するための当該技術で一般に既知の臨床データ及び検査データの結果によって確かめられる内科医の医学判断に基づいて立証することができる。そのようなデータは、例として、臨床検査、細胞学及び組織学の技法、内視鏡検査及び腹腔鏡検査、超音波、CT及びMRI走査、胸部X線及びマンモグラフィ、及びN

10

20

30

40

50

o d a lのような腫瘍マーカーを測定することによって得られてもよい。好ましくは、R E C I S T基準を使用して腫瘍の応答 (R E) を判定してもよい (T h e r a s s e ã , J . N a t . C a n c e r I n s t i t u t e . 9 2 , (2 0 0 0) , 2 0 5 - 2 1 6) 。

【 0 0 7 1 】

これらの R E C I S T 基準によれば、固形腫瘍についての腫瘍の応答 (T h e r a s s e ã , J . N a t . C a n c e r I n s t i t u t e . 9 2 , (2 0 0 0) , 2 0 5 - 2 1 6) は腫瘍の容積の進行または退行に応じて (たとえば、CTによって測定される) 4つのレベル: 完全奏効 (C R)、不完全奏効 (P R)、安定 (S D) 及び進行 (P D) に分類される。さらに、欧州癌研究治療機構 (E O R T C) は、2 - [1 8 F] - フルオロ - 2 - デオキシグルコースポジトロン放出断層撮影法 (F D G - P E T) (Y o u n g , H . ã , , E u r . J . C a n c . 3 5 (1 9 9 9) , 1 7 7 3 - 1 7 8 2 及び K e l l o f , G . J . ã , C l i n . C a n c . R e s . 1 1 (2 0 0 5) , 2 7 8 5 - 2 8 0 8) によって測定された腫瘍の代謝に応じた4つのレベル: 完全代謝応答 (C M R) または部分代謝応答 (P M R)、安定な代謝疾患 (S M D) 及び進行性の代謝疾患 (P M D) へのカテゴリー化を提案した。

10

【 0 0 7 2 】

「応答 (R E)」及び「非応答 (N R)」は、双方とも上記で記載されている R E C I S T 及び R D G - P E T の基準を用いたコンピュータ断層撮影法 (C T) 及び 2 - [1 8 F] - フルオロ - 2 - デオキシグルコースポジトロン放出断層撮影法 (F D G - P E T) (K e l l o f , G . J . ã , C l i n . C a n c . R e s . 1 1 , (2 0 0 5) , 2 7 8 5 - 2 8 0 8 及び Y o u n g , H . ã , E u r . J . C a n c . 3 5 , (1 9 9 9) , 1 7 7 3 - 8 2) の組み合わせによって取得されるデータに基づいて立証されてもよい。

20

【 0 0 7 3 】

用語「薬物の製造方法」は本明細書で指定されるような適応における使用のための、特に腫瘍、腫瘍転移または一般に癌の治療で使用するための薬物の製造を指す。

【 0 0 7 4 】

用語「治療すること」は本明細書で使用されるとき、特に指示されない限り、患者にて腫瘍の増殖、腫瘍の転移、または他の癌が原因のもしくは腫瘍性の細胞を部分的にまたは完全に反転する、緩和する、その進行を抑制する、または防ぐことを意味する。用語「治療」は本明細書で使用されるとき、特に指示されない限り、治療の行動を指す。

30

【 0 0 7 5 】

語句「治療方法」またはその同等物は、たとえば、癌に適用される場合、患者において癌細胞の数を減らすもしくは排除する、または癌の症状を緩和するように設計される行為の手順または経過を指す。癌または別の増殖性疾病を「治療する方法」は、癌細胞もしくは疾病が実際に排除される、細胞の数もしくは疾病が実際に軽減される、または癌もしくは他の疾病の症状が実際に緩和されることを必ずしも意味しない。癌を治療する方法は成功の確率が低くても実施されるが、それは、患者の既往歴及び生存能力を考えると、それでもやはり、全体的に有益な行動過程であると見なされることが多い。

40

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用されるとき、用語「転移」は患者における原発腫瘍からの1以上のどこかの部位への癌性細胞の伝搬を指す。癌が転移しているかどうかを判定する手段は当該技術で既知であり、それには、骨走査、胸部X線、C A T 走査、M R I 走査及び腫瘍マーカー検査が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

用語「転移を防ぐ薬物」または「転移を減らす薬物」は本明細書で使用されるとき、患者(たとえば、癌の(たとえば、患者における原発腫瘍からの1以上のどこかの部位への癌性細胞のさらなる伝搬を抑制する又は低減するために)における転移に対する予防剤としての薬物の使用を指す。従って、一実施形態では、原発の腫瘍または癌、転移性の腫瘍または癌の転移が予防され、遅延させられ、または抑制される。

50

【0078】

詳細な説明

本発明は、抗Nodal抗体及びNodalに関連する障害または疾患を診断する、予防する及び治療するための抗Nodal抗体の使用に関連する。

【0079】

抗Nodal抗体の治療上の使用

本発明の抗体は単独で、または治療剤として使用するための1以上の他の作用剤との併用で投与されてもよい。一部の実施形態では、本発明は、Nodalが関連する及び/またはNodalが介在する疾患、障害または状態の治療のために患者（たとえば、好ましくはヒト患者）に本発明の抗体を投与することが関与する抗体に基づく治療法を指向する。一実施形態では、本発明の治療剤（たとえば、抗Nodal抗体を含む）を患者に投与して患者における腫瘍の増殖、腫瘍の転移、または他の癌が原因の細胞または腫瘍性の細胞を（たとえば、部分的にまたは完全に）反転する、緩和する、その進行を抑制する。それらを予防する。

10

【0080】

抗Nodal抗体の投与の量及び投与のタイミングは治療される患者の種類（たとえば、種、性別、年齢、体重等）及び状態ならびに治療される疾患または状態の重症度に左右されるであろう。普通、典型的な投与量の抗Nodal抗体が使用される。たとえば、本発明に係る抗体の投与のための投与量は、1以上の別々の投与によってまたは連続点滴によって約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 50 \text{mg} / \text{kg}$ （たとえば、 $0.1 \sim 20 \text{mg} / \text{kg}$ ）の抗体であることができる。典型的な毎日の投与量は約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲であってもよい。好まれる態様では、抗体は、約 $1 \text{mg} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲での用量にて2～3週間ごとに投与される。例となる用量は、連続点滴として投与される $4 \text{mg} / \text{kg}$ の負荷用量と、疾患の進行が検出されるまで連続点滴として投与される $2 \text{mg} / \text{kg} \sim 6 \text{mg} / \text{kg}$ 、好ましくは $2 \text{mg} / \text{kg}$ のそれに続く3週間の点滴である。別の例となる用量は、IV点滴としての14日に1回の $5 \text{mg} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ 、好ましくは $5 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 、さらに好まれる $5 \text{mg} / \text{kg}$ である。

20

【0081】

好まれる実施形態では、本発明の治療用組成物は癌の対象を治療する方法にて使用される。たとえば、一実施形態では、本発明は、癌を患っている患者にて転移を防ぎまたは軽減し、そのような患者の生存期間を延ばし、そのような患者の無増悪生存を延ばし、及び応答の持続時間を延ばし、結果として生存期間、無増悪生存、応答率または応答の持続時間によって測定されるような治療された患者の統計的に有意な且つ臨床上意味のある改善を生じる方法を提供する。好まれる実施形態では、薬物は患者の群にて応答率を高めるのに有用である。

30

【0082】

本発明の治療用組成物を受け取っている対象は特定の治療を必要とする哺乳類であってもよく、たとえば、哺乳類は特定の疾病、たとえば、Nodalに関連するものであると診断されている。治療上許容できる用量の本発明の抗Nodal抗体（単数）または抗体（複数）、または本抗体のカクテルを、または種々の供給源の他の抗体との併用で、単独で、または1以上の本明細書に記載されている1以上の他の治療剤（たとえば、Lefty）との併用で投与する方法を用いて、治療される哺乳類（たとえば、ヒト）にて本疾患の症状を改善または予防してもよい。

40

【0083】

本発明の抗体を用いて哺乳類を治療してもよい。前臨床データを得る目的で抗体を非ヒト哺乳類に投与してもよい。治療される例となる非ヒト哺乳類には、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯類、及び前臨床試験が実施される他の哺乳類が挙げられる。そのような哺乳類は、抗体で治療される疾患について確立された動物モデルであってもよいし、または対象とする抗体の毒性を試験するのに使用されてもよい。これらの実施形態のそれぞれでは、哺乳類にて用量漸増試験が実施されてもよい。

50

【 0 0 8 4 】

本発明の治療用化合物には、本発明の抗体（本明細書に記載されているようなその断片、類似体及び誘導体を含む）及び本明細書に記載されているような本発明の抗体をコードする核酸（本明細書に記載されているようなその断片、類似体及び誘導体及び抗イデオタイプ抗体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体を用いて、本明細書に記載されている疾患、障害または状態のいずれか1以上を含むが、これらに限定されないNodalの異常な発現及び/または活性に関連する疾患、障害または状態を治療する、抑制するまたは予防することができる。Nodalの過剰発現、または異常な発現及び/または活性に関連する疾患、障害または状態の治療及び/または予防には、疾患、障害または状態に関連する少なくとも1つの症状を緩和することが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は当該技術で知られるようなまたは本明細書に記載されているような薬学上許容できる組成物で提供されてもよい。

10

【 0 0 8 5 】

本発明の抗Nodal抗体は種々の疾患にて治療上使用されてもよい。一実施形態では、本発明は、哺乳類にてNodalが介在する疾患を予防するまたは治療する方法を提供する。該方法は、疾患を予防するまたは治療する量の抗Nodal抗体を哺乳類に投与することを含む。一実施形態では、抗Nodal抗体はNodalに結合し、その機能を阻害する。別の実施形態では、抗Nodal抗体を用いて癌の転移を阻害する。一実施形態では、抗Nodal抗体を含む組成物は、患者にて原発腫瘍からの1以上のどこかの部位への癌性細胞の伝搬を抑制するまたは低減することを介して癌を患っている患者を予防上及び/または治療上治療する方法にて使用される（たとえば、本発明の方法及び組成物を用いて、原発の腫瘍または癌、転移性の腫瘍または癌の転移が防がれる、遅延されるまたは抑制される）。

20

【 0 0 8 6 】

本発明は治療される癌の型によって限定されない。実際、以下：膀胱（進行性及び転移性の膀胱癌を含む）、乳腺、結腸（結腸直腸癌を含む）、腎臓、肝臓、肺（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、及び肺腺腫を含む）、卵巣、前立腺、精巣、尿生殖器、リンパ系、直腸、咽頭、膵臓（外分泌膵臓癌を含む）、食道、胃、胆嚢、子宮頸部、甲状腺、及び皮膚（有棘細胞癌を含む）の癌腫含む癌腫；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B-細胞リンパ腫、T-細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ヘアリー細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫、及びパーキットリンパ腫を含むリンパ系系列の造血系腫瘍；急性及び慢性の骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、及び前骨髄球性白血病を含む骨髄性系列の造血系腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、及び神経鞘腫を含む中枢神経系及び末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫及び骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞癌、及び奇形癌を含む他の腫瘍；黒色腫、切除不能なステージIIIまたはIVの悪性黒色腫、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、消化器癌、腎癌、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、多形性膠芽腫、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、及び頭頸部癌、胃癌、生殖細胞腫瘍、骨癌、骨腫瘍、骨の成人悪性線維性組織球腫；骨の小児悪性線維性組織球腫、肉腫、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、新生物、形質細胞新生物；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；精巣生殖細胞腫瘍、眼内黒色腫、骨髄異形成症候群；骨髄異形成/骨髄増殖性疾患、滑膜肉腫、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病（Ph+ALL）、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、肥満細胞症及び肥満細胞症に関連する任意の症状、及びそれらの転移を含むが、これらに限定されない種々の癌が治療されてもよい。加えて、障害には他の癌に加えて、色素性蕁麻疹、びまん性皮膚肥満細胞症のような肥満細胞症、ヒトにおける単独型肥満細胞腫、と同様にイヌ肥満細胞腫及び水疱性、紅皮性及び血管拡張性の肥満細胞症のような若干稀な亜型、関連する血液障害を伴った肥満細胞症、たとえば、骨髄増殖性または骨髄異形成性の症候群、または急性白血病、肥満細胞症の関連した骨髄増殖性障

30

40

50

害、肥満細胞白血病が挙げられる。以下：膀胱、尿路上皮癌、乳腺、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胃、子宮頸部、甲状腺、精巣、特に精巣精上皮腫、及び皮膚の癌腫を含むが、これらに限定されない癌腫；扁平上皮癌を含む癌腫；消化管間質腫瘍（“GIST”）；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B-細胞リンパ腫、T-細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ヘアリー細胞リンパ腫及びパーキットリンパ腫を含むリンパ系列の造血系腫瘍；急性及び慢性の骨髄性白血病及び前骨髄球性白血病を含む骨髄系列の造血系腫瘍；線維肉腫及び横紋筋肉腫を含む間葉起源の腫瘍；黒色腫、精上皮腫、奇形癌、神経芽細胞腫及び神経膠腫を含む他の腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、及び神経鞘腫を含む中枢神経系及び末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋肉腫、及び骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；及び他の腫瘍、黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞癌、奇形癌、化学療法難治性非精上皮腫生殖細胞腫瘍、及びカボジ肉腫、及びそれらの転移を含むが、これらに限定されない他の癌も障害の範囲内に含まれる。

10

【0087】

本発明は、本発明の抗体組成物と共に同時投与される組成物または作用剤の種類によって限定されない。たとえば、本発明の文脈で、そのような作用剤の効果を高める1以上の細胞傷害性、化学療法性及び/または抗癌性の作用剤または化合物は、本発明の抗Nodal抗体と共に使用されてもよく、及び/または投与されてもよい。例となる作用剤には、アルキル化剤またはアルキル化作用を持つ作用剤、たとえば、サイクロホスファミド（CTX；たとえば、CYTOXAN）、クロラムブシル（CHL；たとえば、LEUKERAN）、シスプラチン（CisP；たとえば、PLATINOL）、ブスルファン（たとえば、MYLERAN）、メルファラン、カルムスチン（BCNU）、ストレプトゾシン、トリエチレンメラミン（TEM）、マイトマイシンC、等；代謝拮抗剤、たとえば、メソトレキセート（MTX）、エトポシド（VP16；たとえば、VEPESID）、6-メルカプトプリン（6MP）、6-チオグアニン（6TG）、シタラビン（Ara-C）、5-フルオロウラシル（5-FU）、カペシタビン（たとえば、XELODA）、デカルバジン（DTIC）、等；抗生剤、たとえば、アクチノマイシンD、ドキシソルピシン（DXR；たとえば、ADRIAMYCIN）、ダウノルピシン（ダウノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン等；アルカロイド、たとえば、ピンカアルカロイド、たとえば、ピンクリスチン（VCR）、ピンブラスチン、等；及び他の抗腫瘍剤、たとえば、パクリタキセル（たとえば、TAXOL）及びパクリタキセル誘導体、細胞増殖抑制剤、グルココルチコイド、たとえば、デキサメタゾン（DEX；たとえば、DECADRON）及びコルチコステロイド、たとえば、プレドニゾン、ヌクレオシド酵素阻害剤、たとえば、ヒドロキシ尿素、アミノ酸枯渇酵素、たとえば、アスパラギン、リユーコボリン及び他の葉酸誘導体、及び類似の多様な抗腫瘍剤が挙げられるが、これらに限定されない。以下の作用剤：アミフォスチン（たとえば、ETHYOL）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、サイクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、ドキシソルピシンリポ（たとえば、DOXIL）、ゲムシタビン（たとえば、GEMZAR）、ダウノルピシンリポ（たとえば、DAUNOXOME）、プロカルバジン、マイトマイシン、ドセタキセル（たとえば、TAXOTERE）、アルデスロイキン、カルボプラチン、オキサリプラチン、クラドリピン、カンプトテシン、CPT11（イリノテカン）、10-ヒドロキシ7-エチル-カンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、イフォスファミド、イダルピシン、メスナ、インターフェロンベータ、インターフェロンアルファ、ミトキサントロン、トポテカン、リユープロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパルガーゼ、ペントスタチン、ピポプロマン、プリカマイシン、タモキシフェン、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ピノルピリン、クロラムブシルも追加の作用剤として使用されてもよい。

20

30

40

【0088】

一実施形態では、抗ホルモン剤が本発明の抗Nodal抗体と共に使用され、または同

50

時投与される。

【0089】

化学療法投薬計画における本明細書に記載されている細胞傷害剤及び他の抗癌剤の使用は一般に癌治療技術においてよく特徴付けられており、本明細書におけるその使用は、忍容性及び有効性をモニタリングすることについてならびに投与の経路及び投与量を制御することについて同じ検討事項に該当する。有効な細胞傷害剤の典型的な投与量は製造元によって推奨される範囲内にあることができ、試験管内の応答または動物モデルにおける応答によって示される場合、約一桁の濃度または量まで減らすことができる。従って、実際の投与量は、内科医の判断、患者の状態、及び初代培養された悪性細胞または組織培養された組織試料の試験管内の応答性または適当な動物モデルで認められた応答に基づく治療方法の有効性に左右されるであろう。

10

【0090】

別の実施形態では、有効量の電離放射線が実行されてもよく、及び/または放射性医薬品が使用されてもよい。放射線の線源は治療される患者の外側にあっても内側にあってもよい。線源が患者の外側にある場合、治療法は、外照射療法（EBRT）として知られる。放射線の線源が患者の内側にある場合、治療は近接照射療法（BT）と呼ばれる。本発明の文脈で使用するための放射性原子は、ラジウム、セシウム - 137、イリジウム - 192、アメリシウム - 241、金 - 198、コバルト - 57、銅 - 67、テクネチウム - 99、ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、及びインジウム - 111を含むが、これらに限定されない群から選択することができる。一実施形態では、抗Nodal抗体はそのような放射性同位元素によって標識されてもよい。

20

【0091】

放射線療法は、切除不能なまたは手術できない腫瘍及び/または腫瘍の転移を制御する標準の治療である。放射線療法を化学療法と併用すると改善された成績が見られている。放射線療法は、標的領域に送達される高線量の放射線が腫瘍組織及び正常組織の双方における複製細胞の死を生じるという原理に基づく。放射線投与計画は一般に放射線の吸収線量（Gy）、時間及び分割という点で定義され、腫瘍学者によって慎重に定義されなければならない。患者が受ける放射線の量は種々の検討事項に左右されるが、2つの最も重要なことは、身体の他の重大な構造または臓器に関連した腫瘍の位置及び腫瘍が広がっている程度である。放射線療法を受ける患者にとっての治療の典型的な治療単位は、週に5日、約1.8~2.0Gyの単回1日分割で患者に投与される10~80Gyの総線量にて1~6週間にわたる治療計画であろう。本発明の好まれる実施形態では、ヒト患者における腫瘍が本発明の治療と放射線との併用で治療されると相乗性がある。言い換えると、本発明の併用または単一療法を含む作用剤による腫瘍増殖の阻害は、放射線と、任意で追加の化学療法剤または抗癌剤と併用すると高められる。

30

【0092】

Nodalの異常な発現及び/または活性に関連する疾患または障害の治療、抑制及び予防に有効であるであろう抗体の量は標準の臨床的な技法によって決定することができる。投与量は、治療される疾患の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的で投与されるのか、または治療目的で投与されるのか、以前の治療、患者の既往歴及び抗体への応答、ならびに主治医の裁量に左右されるであろう。抗体は、疾患に一致する治療計画で、たとえば、1日~数日にわたって単回用量または数回用量で投与されて病状を改善ことができ、または長い時間定期的な用量で投与されて疾患の進行を抑制し、疾患の再発を防ぐことができる。加えて、試験管内アッセイを任意で採用して最適な投与量範囲を特定するのに役立ててもよい。製剤で採用される正確な用量は、投与の経路及び疾患または障害の深刻さにも左右されるであろうし、内科医の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。有効な用量は試験管内のまたは動物モデルの試験系に由来する用量反応曲線から外挿されてもよい。

40

【0093】

患者に投与される本発明の抗Nodal抗体の投与量についての追加の例となる実施形

50

態は通常、患者の体重の $0.1 \text{ mg/kg} \sim 150 \text{ mg/kg}$ である。好ましくは、患者に投与される投与量は、患者の体重の $0.1 \text{ mg/kg} \sim 20 \text{ mg/kg}$ の間、さらに好ましくは 1 mg/kg / 患者の体重の $\text{kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ の間である。一般に、外来ポリペプチドに対する免疫応答のせいで、ヒト抗体は、他の種に由来する抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、少ない投与量のヒト抗体及び少ない回数での投与が可能であることが多い。さらに、本発明の抗体の投与量及び投与の回数は、たとえば、脂質化またはペグ化のような修飾によって抗体の安定性、取り込み及び組織への浸透を高めることにより減らされてもよい。状態に応じた数日以上にわたる反復投与については、治療は疾患の症状の所望の抑制が生じるまで持続される。しかしながら、他の投与計画が有用であってもよい。この治療の進行は従来の技法及びアッセイによって容易にモニターされる。

10

【0094】

良質の医療のための原則に矛盾しない方法で抗体組成物が製剤化され、服用され、投与されてもよい。この文脈で考慮するための因子には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、作用剤の送達の部位、投与の方法、投与のスケジュール、及び医療関係者に既知の他の因子が挙げられる。

【0095】

本発明の抗 Nodal 抗体は単独で、または他の種類の治療との併用で投与されてもよい。好まれる実施形態では、抗体は実質的に精製される（たとえば、その効果を限定するまたは望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。

【0096】

注射、たとえば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの被包、化合物を発現することができる組換え細胞（遺伝子操作した）、受容体が介在するエンドサイトーシス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築、等を含む種々の送達系が知られ、本発明の抗体を投与するのに使用することができる。

20

【0097】

抗 Nodal 抗体を許容できる方法で哺乳類に投与することができる。導入の方法には、非経口、皮下、腹腔内、肺内、鼻内、硬膜外、吸入及び経口の経路、及び免疫抑制治療について所望であれば、病変内投与が挙げられるが、これらに限定されない。非経口注入には、筋肉内、皮内、静脈内、動脈内、または腹腔内の投与が挙げられる。抗 Nodal 抗体またはそれを含む組成物は、従来の経路、たとえば、点滴またはボラス注射によって、上皮または皮膚粘膜の内層（たとえば、口腔粘膜、直腸及び腸の粘膜等）を介した吸収によって投与されてもよく、他の生物学的に活性のある作用剤（たとえば、本明細書に記載されているもの）と一緒に投与されてもよい。投与は全身性または局所性であることができる。加えて、脳室内投与及び髄腔内投与を含む好適な経路によって本発明の治療用の抗体又は組成物を中枢神経系に導入することが望ましくてもよい。加えて、抗体は、パルス注入によって、特に漸減用量の抗体と共に好適に投与される。好ましくは、投与が手短かまたは慢性的かに応じて、投薬は注射、さらに好ましくは静脈内または皮下の注射によって与えられる。

30

【0098】

一実施形態では、たとえば、吸入器またはネブライザの使用及び噴霧剤を伴った製剤によって肺投与が採用される。抗体はまた乾燥粉末組成物の形態で患者の肺に投与されてもよい。

40

【0099】

特定の実施形態では、治療を必要とする領域に本発明の治療用の抗体または組成物を投与することが望ましくてもよく；これは、たとえば、局所注入、局所塗布によって、注射によって、カテーテルによって、坐薬によってまたはインプラントによって達成されてもよく、前記インプラントは、膜または繊維を含む多孔性、非多孔性またはゼラチン様の物質である。別の実施形態では、抗体は制御放出系で送達される。

【0100】

50

本発明は医薬組成物も提供する。そのような組成物は治療上有効な量の抗Nodal抗体と生理学的に許容できるキャリアとを含む。特定の実施形態では、用語「生理学的に許容できる」は、哺乳類、且つさらに詳しくはヒトでの使用について連邦政府もしくは州政府の規制当局によって認可されている、または米国薬局方もしくは一般に認識されている他の薬局方にてリストにされていることを意味する。従って、薬学上許容できるキャリアは対象への作用剤の送達について当該技術で既知である任意のキャリアである。用語「キャリア」は治療剤と一緒に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤またはビヒクルを指す。そのような生理的なキャリアは、たとえば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油等のような石油、動物、植物または合成の起源のものを含む、たとえば、水及び油類のような無菌の液体であることができる。医薬組成物が静脈内に投与される場合、水が好まれるキャリアである。生理食塩水溶液及び水性のデキストロース及びグリセロールの溶液も特に注射溶液用の液体キャリアとして採用することができる。好適な医薬賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。組成物は所望であれば、軽微な量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸薬、カプセル、粉剤、持続放出製剤等の形態を取ることができる。組成物は、たとえば、トリグリセリドのような従来の結合剤及びキャリアと共に坐薬として製剤化することができる。経口製剤は、たとえば、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等のような標準のキャリアを含むことができる。好適なキャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」にて記載されている。そのような組成物は、患者への適正な投与のための形態を提供するように好適な量のキャリアと一緒に有効量の抗体を好ましくは精製された形態で含有するであろう。一実施形態では、治療上有効な量の抗Nodal抗体と生理学的に許容できるキャリアとを含む組成物が投与の特定の方式のために具体的に製剤化される。

【0101】

たとえば、一実施形態では、組成物は、ヒトへの静脈内投与に適する医薬組成物として日常の手順に従って製剤化される。通常、静脈内投与用の組成物は無菌等張の水性緩衝液における溶液である。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤及びリグノカインのような局所麻酔剤を含んで注射の部位での痛みを和らげてよい。一般に、成分は、たとえば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェのような密閉された容器における乾燥させた凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、別々に供給され、または単位剤形にて一緒に混合される。組成物が注入によって投与されるべきである場合、無菌で医薬等級の水または生理食塩水を含有する注入ピンにそれを分配することができる。組成物が注射で投与される場合、成分が投与に先立って混合されてもよいように注射用水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の1以上で満たされた1以上の容器を含む医薬パックまたは医薬キットも提供する。そのような容器に任意で関連するものは、医薬品または生物製剤の製造、使用または販売を規制する政府の当局によって指示された形態の通知であることができ、その通知はヒト投与のための製造、使用または販売の当局による認可を反映する。一実施形態では、容器には添付文書が含まれる。本明細書で使用されるとき、「添付文書」は治療用製品の市販包装に通例含まれる指示書を指し、それは、そのような治療用製品の使用に関する適応、用途、投与量、投与、禁忌及び/または警告についての情報を含んでもよい。

【0102】

本発明はまた、所望の程度の純度を有する抗Nodal抗体を、通常当該技術で採用される任意の「薬学上許容できる」キャリア、賦形剤または安定剤（そのすべてが「賦形剤」と呼ばれる）、すなわち、緩衝剤、安定剤、保存剤、等張化剤、非イオン性界面活性剤、抗酸化剤、及びその他の添加剤と混合することによって凍結乾燥製剤または水性溶液と

10

20

30

40

50

して保存するために調製される治療用製剤も提供する。RemingtonのPharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, Ed. (1980)を参照のこと。そのような添加剤は採用される投与量及び濃度にてレシピエントに対して非毒性でなければならない。

【0103】

例となる緩衝剤には、たとえば、クエン酸緩衝液（たとえば、クエン酸一ナトリウム - クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸一ナトリウム混合物、等）、コハク酸緩衝液（たとえば、コハク酸 - コハク酸一ナトリウム混合物、コハク酸 - 水酸化ナトリウム混合物、コハク酸 - コハク酸二ナトリウム混合物、等）、酒石酸緩衝液（たとえば、酒石酸 - 酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸 - 酒石酸カリウム混合物、酒石酸 - 水酸化ナトリウム混合物、等）、フマル酸緩衝液（たとえば、フマル酸 - フマル酸一ナトリウム混合物、等）、フマル酸緩衝液（たとえば、フマル酸 - フマル酸一ナトリウム混合物、フマル酸 - フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸一ナトリウム - フマル酸二ナトリウム混合物、等）、グルコン酸緩衝液（たとえば、グルコン酸 - グルコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸 - 水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸 - グルコン酸カリウム混合物、等）、シュウ酸緩衝液（たとえば、シュウ酸 - シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸 - 水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸 - シュウ酸カリウム混合物、等）、乳酸緩衝液（たとえば、乳酸 - 乳酸ナトリウム混合物、乳酸 - 水酸化ナトリウム混合物、乳酸 - 乳酸カリウム混合物、等）及び酢酸緩衝液（たとえば、酢酸 - 酢酸ナトリウム混合物、酢酸 - 水酸化ナトリウム混合物、等）のような有機酸及び無機酸の双方及びそれらの塩が挙げられる。さらに、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、及びトリスのようなトリメチルアミン塩が使用されてもよい。一実施形態では、緩衝液を利用して生理的状态を近似する範囲でpHを維持する。緩衝液は、約2mM～約50mMの範囲の濃度で存在してもよい。

【0104】

保存剤を加えて微生物の増殖を妨害してもよく、0.2%から1%(w/v)に及ぶ量で加えてもよい。例となる保存剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタ - クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、ベンザルコニウムハロゲン化合物（たとえば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、塩化ヘキサメトニウム、及びメチルまたはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン、カテコール、レゾシノール、シクロヘキサノール、及び3 - ペンタノールが挙げられる。

【0105】

同様に、多価糖アルコール、好ましくは三価またはそれ以上の糖アルコール、たとえば、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールのような種々の安定剤が使用されてもよい。安定剤は、治療剤を安定化し、または変性もしくは容器壁への付着を防ぐのに役立つ結合剤から添加剤までの機能に幅があり得る広いカテゴリーの賦形剤を指す。典型的な安定剤は、多価糖アルコール（上記で列挙された）；アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L - ロイシン、2 - フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン等のようなアミノ酸、有機糖または糖アルコール、たとえば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニトール、ガラクトール、グリセロール等、イノシトールのようなシクリトールを含む；ポリエチレングリコール；アミノ酸ポリマー；イオウ含有還元剤、たとえば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、アルファ - モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウム；低分子量ポリペプチド（すなわち、<10残基）；ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；親水性ポリマー、たとえば、ポリビニルピロリドン、単糖類、たとえば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース；ラクトース、マルトース、スクロースのような二糖類及びラフィノースのような三糖類；及びデキストランのような多糖類であることができる。安定剤は、活性タンパク質の重量部当たり0.1～10,000重

量部の範囲で存在してもよい。

【0106】

たとえば、ポリソルベート(20、40、60、80、等)、ポロキサマー(184、188等)、PLURONIC、ポリオール等のような非イオン性の界面活性剤またはデタージェントが使用されてもよい。非イオン性界面活性剤は、それより少し(たとえば、0.05mg/mlを下回る)またはそれより多く(たとえば、1.0mg/ml)使用されてもよいけれども、約0.05mg/ml~約1.0mg/mlの範囲で存在してもよい。

【0107】

追加の様々な賦形剤には、増量剤(たとえば、デンプン)、キレート剤(たとえば、EDTA)、抗酸化剤(たとえば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE)及び共溶媒が挙げられる。本明細書の製剤はまた、治療される特定の適応のために必要に応じて1を超える活性化化合物も、好ましくは、互いに有害に影響しない相補性の活性を持つものも含有してもよい。たとえば、免疫抑制剤をさらに提供することが望ましくてもよい。そのような分子は、意図される目的に効果的である量にて併用で好適に存在する。有効成分は、コアセルベーション法によって、または界面重合によって、たとえば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンのマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルによって、コロイド状薬剤送達系(たとえば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)において、またはマクロエマルジョンにおいて調製されるマイクロカプセルに被包されてもよい。そのような技法はRemingtonのPharmaceutical Sciences, 第16版, Osal, Ed.(1980)にて開示されている。

【0108】

持続放出製剤が使用されてもよい。持続放出製剤の好適な例には、抗体変異体を含有する固形疎水性のポリマーの半透過性のマトリクスが挙げられ、そのマトリクスは造形品、たとえば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(たとえば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクチド、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、たとえば、LUPRON DEPOT(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドで構成される注射用マイクロスフェア)及びポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0109】

Nodal免疫原

実施例に記載されているように、本発明はNodal免疫原及びそれを用いて抗体を生成する方法を提供する。Nodal免疫原は組換えで製作されてもよく、または合成法を用いて作製されてもよい。Nodal免疫原は天然の供給源(たとえば、内在性の細胞性Nodalタンパク質)から単離され、及び/または精製されてもよい。抗体を調製するのに有用なNodal免疫原の複数の形態は当業者に容易に明らかであろう。

【0110】

たとえば、Nodalタンパク質(たとえば、完全長のヒトNodalまたはその一部)を免疫原として使用してもよい。他の実施形態では、Nodalを発現している細胞を免疫原として使用する。そのような細胞は天然の供給源(たとえば、癌細胞株)に由来することができ、または組換え法によってNodalを過剰発現するように形質転換されている細胞であってもよい。一実施形態では、ヒトNodalをコードする遺伝子またはcDNAをプラスミドまたは他の発現ベクターにクローニングし、当業者に周知の方法に従って多数の発現系のいずれかにて発現させる。遺伝子コードの既知の縮重に基づいてNodalタンパク質またはNodalポリペプチドをコードする種々のヌクレオチド配列が使用されてもよい。たとえば、天然に存在するNodalをコードするヌクレオチド配列に適用されるような標準のトリプレット遺伝子コードに従って異なるコドン選択に基づい

10

20

30

40

50

て組み合わせを選択することによってヌクレオチド配列が異なってもよい(たとえば、それによって所望の変化したNod a l配列を作製するのを可能にする)。これらのポリペプチドのいずれか1つを動物の免疫に用いてNod a lを結合する抗体を生成してもよい。本明細書に記載されているように、本発明は、野生型と同様に変異体のNod a lタンパク質(たとえば、断片)、及び完全長、野生型Nod a lに特異的に結合する抗体を特定するためのそれを用いた抗体の生成を提供する。

【0111】

非ヒトNod a lタンパク質(たとえば、組換え及び/または内在性の)を免疫原として使用してもよい。Nod a lタンパク質を他のタンパク質/断片及び/または免疫原性物質(たとえば、スカシガイのヘモシアニン(KLH))に融合させてもよいし、及び/または結合させてもよい。結合体及び/または融合体を用いて、たとえば、融合タンパク質がアフィニティークロマトグラフィにより単離され、精製されるのを可能にすることによってタンパク質の精製を支援してもよいが、それを用いて免疫原性を高めることもできる。融合タンパク質は、タンパク質のカルボキシル末端及び/またはアミノ末端のいずれかに連結された融合セグメントを含むタンパク質をコードする融合核酸配列で形質転換された組換え細胞を培養することによって製作することができる。融合セグメントには、免疫グロブリンFc領域、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、二価の金属イオンを結合することができるポリヒスチジンセグメント、及びマルトース結合タンパク質が挙げられてもよいが、これらに限定されない。

【0112】

実施例で示されるように、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために野生型及び変異体双方のNod a lタンパク質を用いてマウスを免疫した。さらに記載されているように、特異性を持って野生型のヒトNod a lに結合するが、変異体ヒトNod a lに結合しないモノクローナル抗体を特定する方法が提供される。一実施形態では、本発明は、配列番号13、15、17のすべてまたは一部を含む例となるポリペプチドまたはその変異体を提供する。

【0113】

好まれる実施形態では、本発明の抗Nod a l抗体は完全長のヒトNod a lタンパク質に結合する。さらに好まれる実施形態では、本発明の抗Nod a l抗体は野生型Nod a lタンパク質に結合するが、変異体Nod a lタンパク質(たとえば、プレヘリックスループ領域で変異させた(たとえば、hNod a l E49A、E50A変異体タンパク質))には結合しない。従って、別の好まれる実施形態では、本発明の抗Nod a l抗体は特異性を持って、プレヘリックスループ領域にて完全長のヒトNod a lタンパク質に結合する。従って、一実施形態では、本発明の抗Nod a l抗体は、患者(たとえば、Nod a l関連の疾患または障害を伴う)に投与されると、患者にて予防上の及び/または治療上の利益を提供する。

【0114】

抗Nod a l抗体の生成

本発明のNod a l特異抗体は当該技術で既知の好適な方法によって生成されてもよい。本発明の抗体はポリクローナル抗体を含んでもよい。ポリクローナル抗体を調製する方法は技量のある熟練者に既知である(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるHarlowら, Antibodies; a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版(1988))。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一価抗体、二重特異性抗体、ヘテロ結合抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリによって製作される断片、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(たとえば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、及び上記のいずれかのエピトープ結合断片が含まれるが、これらに限定されない。本発明は、本明細書で開示されているような抗体または抗体変異体をコードする単離された核酸配列と、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含むベクター構築物と、そのようなベクターを含む宿主細胞と、抗体の産生のための組換え法とを提供する。

【0115】

Nodal免疫原を含む免疫原性組成物を用いて、たとえば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サルまたはヒトのような哺乳類を免疫し、ポリクローナル抗体を作出することができる。所望であれば、Nodal免疫原をキャリアタンパク質、たとえば、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン、スカシガイのヘモシアニン、または本明細書に記載されている他のキャリアに結合することができる。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることができる。そのようなアジュバントには、フロイントのアジュバント、鉍物ゲル（たとえば、水酸化アルミニウム）及び表面活性物質（たとえば、リソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、本明細書に記載されているナノエマルジョン、スカシガイのヘモシアニン、及びジニトロフェノール）が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトで使用されるアジュバントのうちで、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium parvum*）が特に有用である。

10

【0116】

Nodal免疫原に特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養における連続細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の技法を用いて調製することができる。これらの技法には、ハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法、及びEBVハイブリドーマ法が挙げられるが、これらに限定されない（たとえば、Kohlerら、*Nature*, 256, 495-497, 1985; Kozborら、*J. Immunol. Methods*, 81, 3142, 1985; Coteら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Coleら、*Mol. Cell. Biol.* 62, 109-120, 1984を参照のこと）。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む任意の免疫グロブリンのクラス及びそれらのサブクラスであってもよい。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは試験管内または生体内で培養されてもよい。従って、一実施形態では、本発明はまた、本発明の抗Nodal抗体を産生する種々の細胞株（たとえば、不死化されたB細胞株）も提供する。

20

【0117】

加えて、「キメラ抗体」の製作のために開発された技法である、適当な抗原特異性と生物活性を持つ分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを使用することができる（たとえば、Morrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neubergerら、*Nature*, 312, 604-608, 1984; Takedaら、*Nature*, 314, 452-454, 1985を参照のこと）。モノクローナル抗体及び他の抗体を「ヒト化して」、それが治療上使用される際、患者が抗体に対する免疫応答を開始するのを防ぐこともできる。そのような抗体は、治療で直接使用されるヒト抗体に配列が十分類似してもよいし、またはわずかな重要な残基の変化を必要としてもよい。齧歯類の抗体とヒトの抗体との間での配列の差異は、個々の残基の部位特異的変異誘発によって、または相補性決定領域全体の移植によってヒト配列におけるものとは異なる残基を置き換えることにより最少化

30

40

【0118】

或いは、ヒト化抗体は組換え法を用いて産生させることができる。特定の抗原に特異的に結合する抗体は、米国特許第5,565,332号にて開示されたように部分的にまたは完全にヒト化されている抗原結合部位を含有することができる。別の実施形態では、ヒト患者の治療上の処置には完全にヒト抗体を用い、それが特に望ましい。ヒト抗体は、ヒトの免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリを用いたファージディスプレイ法を含む当該技術で既知の種々の方法によって作製することができる。

【0119】

或いは、単鎖抗体の製作のために記載されている技法は、特定の抗原に特異的に結合す

50

る単鎖抗体を製作する当該技術で既知の方法を用いて適応させることができる。関連する特異性を持つが、異なるイディオタイプ組成の抗体は、無作為コンビナトリアル免疫グロブリンライブラリからの鎖移動によって生成することができる（たとえば、Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991を参照のこと）。

【0120】

たとえば、鋳型としてハイブリドーマcDNAを用いたPCRのようなDNA増幅法を用いて単鎖抗体を構築することもできる（たとえば、Thirionら, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11を参照のこと）。単鎖抗体は単一特異性または二重特異性であることができ、二価または四価であることができる。四価で二重特異性の単鎖抗体は、たとえば、Coloma及びMorrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63にて教示されている。二価で二重特異性の単鎖抗体は、たとえば、Mallender及びVoss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206にて教示されている。

10

【0121】

単鎖抗体をコードするヌクレオチド配列は、以下で記載されているように、手動または自動のヌクレオチド合成を用いて構築し、標準の組換えDNA法を用いて発現構築物にクローニングし、細胞に導入してコーディング配列を発現させることができる。或いは、単鎖抗体は、たとえば、糸状ファージ法を直接用いて製作することができる（たとえば、Verhaarら, 1995, Int. J. Cancer, 61, 497-501; Nichollsら, 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91を参照のこと）。

20

【0122】

特定の抗原に特異的に結合する抗体は、リンパ球集団にて生体内での産生を誘導することによって、または免疫グロブリンのライブラリまたは文献にて開示されたような高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって製作することもできる（たとえば、Orlandiら, Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winterら, Nature, 349, 293-299, 1991を参照のこと）。

【0123】

キメラ抗体はWO93/03151にて開示されたように構築することができる。たとえば、WO94/13804にて記載された「二重特異性抗体」のような免疫グロブリンに由来し、且つ多価及び多重特異性である結合タンパク質も調製することができる。抗体は当該技術で周知の方法によって精製することができる。たとえば、抗体は、関連抗原が結合されているカラムを通すことによって親和性精製することができる。次いで高塩濃度の緩衝液を用いて、結合した抗体を溶出することができる。

30

【0124】

別の実施形態では、本発明は、既知の技法によって生成された特異的なエピトープ（たとえば、ヒトNodal（たとえば、プレヘリックスループ領域））を認識する抗体断片を提供する。従来、抗体断片はインタクトな抗体のタンパク分解消化を介して導き出された（たとえば、Morimotoら, J. Biochem. Biophys. Methods, 24:107(1992); Brennanら, Science, 229:81(1985)を参照のこと）。たとえば、本発明のFab及びF(ab')₂断片は、たとえば、パイン（Fab断片を生じる）またはペプシン（F(ab')₂断片を生じる）のような酵素を用いた免疫グロブリン分子のタンパク分解切断によって製作されてもよい。F(ab')₂断片は可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖のCH1ドメインを含有する。しかしながら、これらの断片は今や組換え宿主細胞によって直接作出することができる。たとえば、抗体断片は抗体ファージライブラリから単離することができる。或いは、F(ab')₂-SH断片を大腸菌から直接回収し、化学的にカップリングさせてF(ab')₂断片を形成することができる（Carterら, Bio/Technology, 1

40

50

0 : 1 6 3 (1 9 9 2))。別のアプローチに従って、F (a b ')₂断片を組換え宿主細胞の培養物から直接単離することができる。抗体断片の作出の他の技法は技量のある実行者に明らかであろう。

【 0 1 2 5 】

別の実施形態では、ヘテロ結合抗体を本発明で利用することができる。ヘテロ結合抗体は2つの共有結合した抗体で構成される。そのような抗体は、たとえば、望ましくない細胞に対して免疫系細胞を向けるように提案されている(米国特許第4,676,980号)。

【 0 1 2 6 】

抗Nodal抗体

本明細書に記載されているように、本発明はNodalを結合し、且つNodalの活性を阻害する(たとえば、Cripto-1及び/またはAlk4/7ActRIIB受容体複合体へのNodalの結合を阻害する、Nodalまたはその複合体の下流のシグナル伝達を阻害する、Nodalの発現を下方調節する、等)モノクローナル抗体を提供する。本発明はまた、Nodalを結合し、且つNodalが介在する細胞性のシグナル伝達を阻害するモノクローナル抗体も提供する。本発明の抗体には1B4、9B9、2D12、10B12、3D1及び5F10と名付けられた抗体が含まれる。特に好まれる実施形態では、3D1と名付けられた抗体が使用される。本発明にはまた、3D1と同じエピトープに結合する抗体も含まれる。抗Nodal抗体は実施例にて記載されているように定義され、性状分析された。本発明の抗体は、それらが認識し、または特異的に結合するNodalのエピトープまたは一部という点で記載されてもよいし、指定されてもよい。エピトープまたはポリペプチドの部分は、本明細書に記載されているように、たとえば、N末端及びC末端の位置によって、隣接するアミノ酸残基のサイズによって指定されてもよく、または表及び図にてリストにされてもよい。

【 0 1 2 7 】

本発明の抗体はその交差反応という点でも記載され、または指定されてもよい。Nodalポリペプチドを結合し、Nodalポリペプチドに対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、及び少なくとも50%の同一性(当該技術で既知であり、且つ本明細書に記載されている方法を用いて算出したとき)を有する抗体も本発明に含まれる。本明細書に記載されているように、抗Nodal抗体はまた約 10^{-7} M未満、約 10^{-6} M未満または約 10^{-5} M未満の K_D で他のタンパク質も結合してもよい。

【 0 1 2 8 】

本発明はまた、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下でNodalタンパク質をコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを結合する抗Nodal抗体も提供する。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドの結合親和性という点で記載され、または指定されてもよい。好まれる結合親和性には、 10^{-8} M~ 10^{-15} M、 10^{-8} M~ 10^{-12} M、 10^{-8} M~ 10^{-10} Mまたは 10^{-10} M~ 10^{-12} Mの平衡解離定数または K_D を持つものが挙げられる。本発明はまた、競合結合を測定するための当該技術で既知の方法、たとえば、本明細書に記載されている免疫アッセイによって測定されるような本発明のエピトープへの抗体の結合を競合して阻害する抗体も提供する。好まれる実施形態では、抗体は、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、及び少なくとも50%エピトープへの抗体の結合を競合して阻害する。

【 0 1 2 9 】

一実施形態では、本発明は、本明細書で開示されるような抗体または抗体変異体をコードする単離された核酸配列と、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列を含むベクター構築物と、そのようなベクターを含む宿主細胞と、抗体の産生のための組換え技法とを

10

20

30

40

50

提供する。

【0130】

抗体の組換え産生については、それをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング（DNAの増幅）または発現のために複製可能なベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは、従来の手順（たとえば、抗体変異体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）を用いて容易に単離され、配列決定される。本発明の抗体を発現している細胞株の調製にはクローニング及び形質変換の標準的な技法が使用されてもよい。

【0131】

本発明はまた、本発明の抗体及びその断片をコードするヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドまたは核酸、たとえば、DNAも提供する。例となるポリヌクレオチドには、本明細書に記載されているアミノ酸配列の1以上を含む抗体鎖をコードするものが挙げられる。本発明はまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下でまたは低いストリンジェントの条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチドも包含する。当該技術で既知の任意の方法によってポリヌクレオチドが得られてもよいし、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定されてもよい。

【0132】

本明細書に記載されているように、本発明の抗体は、抗体の合成についての当該技術で既知の任意の方法によって、特に化学合成によって、または好ましくは組換え発現法によって作出することができる。たとえば、本発明の抗体、またはその断片、誘導体または類似体（たとえば、本発明の抗体の重鎖または軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、抗体または抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。抗体分子をコードするポリヌクレオチドがいったん得られると、抗体の産生用のベクターは組換えDNA技術によって作出されてもよい。抗体のコーディング配列と適当な転写及び翻訳の制御シグナルとを含有する発現ベクターが構築される。これらの方法には、たとえば、試験管内組換え法、合成法及び生体内遺伝子組換えが挙げられる。発現ベクターは従来の技法によって宿主細胞に移され、次いで形質移入された細胞は従来の技法によって培養されて本発明の抗体を産生する。本発明の態様の1つでは、重鎖及び軽鎖の双方をコードするベクターが免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞で同時発現されてもよい。

【0133】

種々の宿主/発現ベクター系を利用して本発明の抗体分子を発現させてもよい。そのような宿主/発現系は、対象とするコーディング配列が生成され、続いて精製されてもよい媒体を表すが、適当なヌクレオチドコーディング配列で形質転換または形質移入されると原位置で本発明の抗体分子を発現してもよい細胞も表す。大腸菌のような細菌細胞及び真核細胞は、組換え抗体分子の発現に、特に組換え抗体分子全体の発現に一般に使用される。たとえば、CHOのような哺乳類細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモータ要素のようなベクターと併せて抗体のための有効な発現系である（F o e c k i n g r ā , G e n e , 4 5 : 1 0 1 , (1 9 8 6) ; C o c k e t t r ā , B i o / T e c h n o l o g y , 8 : 2 , (1 9 9 0) ）。

【0134】

好適な宿主細胞の特定及び使用は当該技術で周知である。たとえば、挿入された配列の発現を調節する、または所望の特定の方法で遺伝子産物を修飾し、処理する宿主細胞株が選択されてもよい。タンパク質産物のそのような修飾（たとえば、グリコシル化）及び処理（たとえば、切断）はタンパク質の機能にとって重要であつてもよい。様々な宿主細胞がタンパク質及び遺伝子産物の翻訳後の処理及び修飾に特徴的で特異的なメカニズムを有する。適当な細胞株または宿主系を選択して発現される外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確保することができる。この目的で、一次転写物の適正な処理、遺伝子産物のグリコシル化及びリン酸化のための細胞機構を持つ真核宿主細胞が使用されてもよい。そのような哺乳類の宿主細胞には、CHO、COS、HEK293、NIH3T3または骨髓腫

10

20

30

40

50

細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0135】

本発明の抗体（たとえば、動物によって産生された、化学的に合成された、または組換えで発現された）は、免疫グロブリン分子の精製のための当該技術で既知の方法、たとえば、クロマトグラフィ（たとえば、イオン交換、アフィニティ、特にプロテインAの後の特異抗原のための親和性による、サイズ排除クロマトグラフィ）、遠心分離、差次的溶解性によって、またはタンパク質の精製のための他の標準的な技法によって精製されてもよい。加えて、本発明の抗体またはその断片は、本明細書に記載されているまたはさもなくば当該技術で既知の異種のポリペプチド配列に融合されて精製を円滑にすることができる。

10

【0136】

本発明は、ポリペプチドに組換えで融合されたまたは化学的に結合された（共有結合及び非共有結合の双方を含む）抗体を包含する。本発明の融合されたまたは結合された抗体は精製の容易さに使用されてもよい。加えて、本発明の抗体またはその断片を、たとえば、ペプチドのようなマーカー配列に融合させて精製を円滑にすることができる。一実施形態では、マーカーのアミノ酸配列はヘキサヒスチジンペプチド、HAタグ（たとえば、インフルエンザ血球凝集タンパク質に由来する）またはFLAGタグである。

【0137】

本明細書の実施形態は、1以上の追加の機能的な作用剤との抗体または抗体断片の結合体を包含する。たとえば、一部の実施形態では、抗体/薬剤結合体または断片/薬剤結合体が提供される（たとえば、その際、機能的な作用剤は薬剤である）。一部の実施形態では、抗体の標的エピトープへの結合は機能的な作用剤（たとえば、薬剤）を標的細胞に局在化させ、それによって機能的な作用剤の有効性を高める。一部の実施形態では、機能的な作用剤と抗体の有効性は相加性である。他の実施形態では、機能的な作用剤の作用の様式と抗体の間での相乗効果は個々の成分の結合体の有効性における相加的上昇よりも大きな上昇を生じる。一部の実施形態では、任意の目的（たとえば、同時投与）のための本明細書に記載されている好適な薬剤または薬剤のクラスは、抗体/薬剤結合体または断片/薬剤結合体の調製及び使用にて使用されてもよい。特定の実施形態では、癌の治療に有用な他の作用剤の化学療法剤を本発明の範囲で抗体または抗体断片に結合する（たとえば、直接または好適なリンカーを介して）。

20

30

【0138】

当該技術は本発明の抗体の精製にて有用である種々の材料及び方法を周知である。組換え法を使用する場合、抗体変異体は細胞内で、細胞周辺腔で産生され得るし、または培地に直接分泌され得る。抗体変異体が細胞内で産生されるならば、最初の段階として粒子状の残渣、宿主細胞または溶解された断片は、たとえば、遠心分離または限外濾過によって取り除かれてもよい。Carterら、Bio/Technology, 10:163 (1992)は、E. coliの細胞周辺腔に分泌される抗体を単離する手順を記載している。抗体変異体が培地に分泌される場合、市販のタンパク質濃縮フィルター、たとえば、AMICONまたはMILIPOREの限外濾過ユニットを用いてそのような発現系からの上清を一般に先ず濃縮する。細胞から生成された及び/または単離された抗体は、たとえば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィを用いて精製することができる。親和性リガンドとしてのプロテインAの好適性は抗体変異体に存在する免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに左右される。プロテインAを用いて、ヒトのIgG1、IgG2またはIgG4の重鎖に基づく抗体を精製することができる(Lindmarkら、J Immunol. Meth. 62:1 (1983))。プロテインGはマウスのアイソタイプすべてとヒトのIgG3について推奨される(Gussら、EMBO J. 5:1567 (1986))。親和性リガンドが結合するマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他のマトリクスも利用できる。制御された細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンのような機械的に安定したマトリクスはアガロースで達成できるものより速い流速及び短い処理時間

40

50

を可能にする。たとえば、イオン交換カラムにおける分画化、エタノール沈殿、逆相 HPLC、シリカでのクロマトグラフィ、ヘパリンセファロースにおけるクロマトグラフィ、アニオンまたはカチオン交換樹脂におけるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸沈殿のようなタンパク質精製のための他の技法は当該技術で周知であり、抗体の特定の種類に基づいて選択することができる。任意の精製工程に続いて、溶出緩衝液（たとえば、約 2.5 ~ 4.5 の間の pH にて、好ましくは低塩濃度（たとえば、約 0 ~ 0.25 M の塩）で実施される）を用いて、抗体及び混入物を含む混合物をさらに、低 pH 疎水性相互作用クロマトグラフィに供してもよい。

【0139】

抗 Nodal 抗体の診断上の使用

本発明の抗体を用いて試験管内及び生体内双方の診断法にて Nodal を検出してもよい。たとえば、本発明の抗体は、生体試料における Nodal のレベルを定性的に及び定量的に測定するための免疫アッセイ（たとえば、ELISA（サンドイッチ ELISA、直接 ELISA、間接 ELISA、競合 ELISA 等）、ウエスタンブロット、免疫組織化学法、タンパク質アレイ、免疫 PCR 等）にて使用されてもよい（たとえば、Harlowら, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版(1988)を参照のこと）。本発明は生体試料の特定の種類のみに限定されない。実際、Nodal タンパク質が見いだされる任意の試料を含むが、これらに限定されない種々の試料が本発明の診断法を用いて特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、試料は組織、体液、血液、血清、尿、唾液、喀痰、または肺浸出物である。一部の実施形態では、試料は、Nodal、Cripto-1 または Nodal と Cripto-1 の双方を発現しているまたは発現することが疑われる細胞を含む。一部の実施形態では、試料は、Nodal を発現しないが、傍分泌シグナル伝達のために Nodal について陽性である細胞を含む。本発明の抗体は検出アッセイで標識として有用な分子に組換えで融合されてもよいし、または結合されてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されている（たとえば、治療用途のために）好適な抗体、抗体断片、二重特異性抗体、結合抗体、等も診断応用で使用されてもよい。一部の実施形態では、試料における Nodal の検出は臨床家に診断情報及び/または予後情報を提供する。一部の実施形態では、試料における Nodal の検出は癌の進行性の形態を示すまたはその診断である。一部の実施形態では、本明細書に記載されている Nodal の診断は、対象が患っている癌の種類を判定する、及び/または対象のための一連の治療行動を決定する（たとえば、抗 Nodal 抗体による治療、他の癌治療等）1 以上の追加の診断アッセイと共に実施される。

【0140】

本発明の抗体は修飾されてもよい（たとえば、抗体へのある部分の共有結合を介して）。好まれる実施形態では、本発明の抗体は、それへの部分の結合が Nodal への抗体の結合を妨害しないような方法で修飾される。本発明の抗体は、ビオチン化、酵素への結合、または抗体の検出を可能にする他の種類の部分の結合を介して修飾されてもよい。

【0141】

たとえば、一実施形態では、抗体またはその断片は診断剤に結合される。抗体を診断上用いて、特定の細胞、組織、血漿、血液もしくは血清にて対象とする標的の発現を検出することができ；または臨床検査法の一部として免疫応答の発生または進行をモニターし、たとえば、所与の治療計画の有効性を判定することもできる。抗体を検出可能な物質にカップリングすることによって検出を円滑にすることができる。検出可能な物質の例は当該技術で既知であり、それには、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々のポジトロン放出断層撮影を用いたポジトロンを放出する金属、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な物質を直接抗体（またはその断片）に、または当該技術で既知の技法を用いて中間体（たとえば、当該技術で既知のリンカー）を介して間接的に抗体（またはその断片）にカップリングしてもよいし、または結合してもよい。一部の実施形態では、標識は間接的に抗体に結

10

20

30

40

50

合される（たとえば、ビオチン/アビジン結合）。一実施形態では、検出には免疫アッセイ（たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイまたは放射性免疫アッセイ）が使用される。本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイを含むが、これらに限定されない当該技術で既知の検出アッセイにて使用されてもよい。一実施形態では、Nod a lの検出は、SPR、バイオ-レイヤー干渉分光法（BLI）、長期グレーティング（LPG）で使用されるもののような好適なバイオチップの表面または生体表面に不動化された本発明の抗Nod a l抗体を採用する標識を含まない技法を用いても達成することができる。

【0142】

別の実施形態では、抗Nod a l抗体の検出は抗Nod a l抗体を検出する抗体（たとえば、二次抗体）の使用を介する。たとえば、Nod a lに特異的に結合する抗体及びその誘導体及び類似体を診断目的で用いて、Nod a lの異常な発現、過剰発現及び/または活性に関連する疾患、障害及び/または状態を検出し、診断し、またはモニターすることができる。一実施形態では、本発明は、本発明の1以上のNod a l特異的な抗体を用いて対象または患者（たとえば、癌を有するまたは癌を有することが疑われる対象または患者）に由来する生体試料におけるNod a lの発現及び/または活性を特徴付けることと、発現のレベルを標準（たとえば、癌ではない対照）の発現レベルと比較することを含むNod a lの検出（たとえば、Nod a lの過剰発現または異常発現）を提供し、それによって標準の発現レベルに比べたNod a lの発現及び/または活性の増加または低下が異常な発現及び/または活性を示す。

【0143】

抗Nod a l抗体を用いて試料におけるNod a lを検出することができる。検出することは、試料を抗Nod a l抗体と接触させることと、試料に結合する抗体の量を測定することとを含んでもよい。免疫組織化学法については、試料は新鮮であってもよいし、もしくは凍結されてもよく、またはパラフィンに包埋されてもよく、たとえば、ホルマリンのような保存剤で固定されてもよい。酵素標識、放射性同位元素、発光標識、蛍光標識、ローダミン及びビオチンを含むが、これらに限定されない当該技術で既知の種々の標識が本明細書に記載されている検出方法で使用されてもよい。標識を含まないNod a lの検出については、検出は、バイオセンサーまたは生体表面を本発明の不動化された抗Nod a l抗体と接触させることと、特定のバイオセンサーまたは生体表面に好適な装置を用いて遊離のタンパク質の量を測定することとを含んでもよい。

【0144】

別の実施形態では、本発明は、1以上の本発明の抗体を用いて対象/患者の生体試料におけるNod a lの発現を特徴付けることと、Nod a l発現のレベルを標準のタンパク質発現のレベルと比較することとを含む、疾患または障害を診断するための診断アッセイを提供し、それによって標準の発現レベルに比べたアッセイされた発現レベルの増加または低下が特定の疾患または障害を示す。別の実施形態では、生体試料または調製された生体試料にてNod a lを検出する方法は、本発明の抗体を試料に接触させることと、試料にてNod a lに結合した抗Nod a l抗体を観察することまたは試料にてNod a lに結合した抗Nod a l抗体の量を測定することとを含む。本発明はまた、対象に本発明の抗体を投与することと、対象にてNod a lに結合した抗Nod a l抗体の量及び/または位置を観察すること及び/または決定することとを含む、対象にてNod a lを検出する方法も提供する。従って、本発明は、Nod a lに関連する疾患または障害（たとえば、対象におけるNod a lの異常発現及び/または過剰発現に関連する疾患または障害）のための検出及び/または診断の組成物及び方法を提供する。

【0145】

たとえば、一実施形態では、Nod a lを結合するのに有効な量の抗Nod a l抗体を対象/患者（たとえば、癌を有するまたは癌を有することが疑われる対象）に投与することと、Nod a lを発現している対象の中での部位を抗Nod a l抗体が結合するのに十分な特定の時間（たとえば、分、時間、日）の後、投与に続いて対象をモニターするこ

10

20

30

40

50

とを含む、対象を特徴付けるまたは診断する方法が提供される。一実施形態では、時間は未結合のNodalが対象から一掃されるのを可能にする(たとえば、バックグランドのシグナルを減らす及び/または排除するように)。別の実施形態では、抗Nodal抗体は標識される。さらなる実施形態では、バックグランドの抗Nodal抗体のレベルが決定される。好まれる実施形態では、対象にておけるバックグランドのレベルを上回る標識された抗Nodal抗体を検出することがNodal関連の障害または疾患を持つ対象/患者を示す。当該技術はバックグランドのレベルを決定する種々の方法を周知している。さらなる実施形態では、本明細書に記載されている方法を用いたNodalの検出は、後の日付で検出されたNodalのレベルが前の日付で検出されたNodalのレベルと比較できるように(たとえば、疾患/障害の進行及び/または治療への応答に関する情報を提供するように)時間間隔(たとえば、1、2、3、6、9、12ヵ月)ごとに繰り返される。

10

【0146】

一実施形態では、本発明の抗体はキット(たとえば、Nodalの検出のための(たとえば、生体内または試験管内の診断用途のための)で提供される。本明細書に記載されている情報に加えて、当該技術は、キットが試料におけるNodalの検出に有用な種々の他の試薬を含んでもよいことを周知している。

【実施例】

【0147】

本発明の特定の好まれる実施形態及び態様を明らかにし、さらに説明するために以下の実施例が提供されるが、それらは本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

20

【0148】

実施例1

Cripto-1が介在するNodalのシグナル伝達を阻害する及び/または中和することができるNodal特異的な抗体の生成について相互作用を標的とすることができるかどうかを判定するためにNodalとCripto-1との間の相互作用の接点を検討した。Cripto-1及びNodalの種々の領域、ならびにその間での相互作用を図1にて示す。図1から分かるように、Nodalのプレヘリックスループ及びヘリックス3の領域はCripto-1のNodal認識に含まれる。アミノ酸E49及びE50はCripto-1のEGF様ドメインへの結合に重要な残基である(たとえば、Calvanese, L.ら, Biopolymers, 2010)。

30

【0149】

抗Nodal抗体を生成する試みで種々のNodal免疫原を利用した。特に、Nodalペプチド免疫原が生成され、それを使ってマウスを免疫する戦略を開発した。次いで生成された抗体をスクリーニングして、免疫原として使用したペプチド及び完全長の野生型Nodalに特異性を持って結合するが、変異体のNodalタンパク質断片には特異性をもって結合しない抗体を特定した。

【0150】

NodalのCripto-1のEGF様ドメインとの相互作用に關与する残基を含有するヒトNodalペプチド(43~69)を作り出した(図2を参照)。以下の合成免疫原を使用して、抗Nodal抗体を生成するためにマウスを免疫した。

40

a) hNODAL(44-69)野生型

Ac-PNPVGEEFHPTNHAYIQSLLKRYQPH-NH₂(配列番号13)

【0151】

アセチル化及びアミド化双方の誘導体またはアミド化のみの誘導体としてNodalペプチド(44~69)及び変異させた変異体Nodal(44~69)E49A~E50Aを合成した。N末端を介してアミド化のみの誘導体をKLHに結合することによって免疫原を調製し、それを用いてBalb/cマウスを免疫した。以下で報告されるペプチド[a]及び[b]

50

【0152】

中和抗体を特定し、性状分析するために、ELISAに基づくスクリーニングアッセイに

a) hNODAL (44 - 69) 野生型

Ac - PNPVGEEFHPTNHAYIQSLLKRYQPH - NH₂ (配列番号13)

b) hNODAL (44 - 69) E49A ~ E50A

Ac - PNPVGAAAFHPTNHAYIQSLLKRYQPH - NH₂ (配列番号14)

を使用し、以下に記載されているように実施した。

10

【0153】

免疫の後、複数のクローンの上清を回収し、野生型及び変異させたペプチド [a] 及び [b] の双方を不働化することによるELISAによってスクリーニングした。図3は、Nodalのプレヘリックスループ領域のE49E50残基を選択的に認識するモノクローナル抗体 (mAb) を分泌するものを特定するELISAによって比較してスクリーニングしたハイブリドーマのクローンを示す。さらなる検討のために野生型ペプチドを選択的に認識するモノクローナル抗体 (mAb) を選択した。

【0154】

完全長のNodalを結合するmAbを特定するために野生型のヒトNodal (E49E50) を選択的に認識する抗体 (mAb) をさらにスクリーニングした。表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサー直接結合アッセイを用いた。組換えヒトNodalタンパク質 (rhNodal , E . coli に由来するN末端Metを伴うHis238Leu347 , 受入 # Q96S42 , カタログ番号3218ND , R & D System) をCM5センサーチップ上に不働化した。生成された種々の抗体すべてのうちで、抗体クローンのたった2つ : 3D1及び5F10だけが完全長タンパク質を結合することができた (図4を参照) 。完全長のヒトNodalを結合することができる抗体のうちで、クローン3D1だけが野生型Nodalペプチドに対する選択性を示した (図3を参照) 。

20

【0155】

図5は抗体3D1及び抗体5F10についてNodalに対するSPR用量依存性の結合アッセイを示す。

30

【0156】

CM5センサーチップ上にhNodalを不働化し、示した濃度で3D1を注入してデータが生成された。3D1は高親和性でhNodalに結合する。KDは約1.3nMだった。

【0157】

CM5センサーチップ上にhNodalを不働化し、示した濃度で5F10を注入してデータが生成されている。5F10は3D1よりも弱くhNodalに結合する。KDは約64nMだった。

【0158】

CM5センサーチップ上に不働化された3D1抗体へのヒト組換えNodalの用量依存性の結合を特徴付けた。推定KDは6.6nMだった (図6を参照) 。

40

【0159】

次に、NodalとCripto-1との間の結合を阻害する3D1抗体の能力を評価するためにSPR実験を介して実験を行った。実験は不働化したCripto-1を伴ったCM5センサーチップ上で実施した。図7にて示すように、NodalとCripto-1との間の相互作用を評価し、約4nM (測定された2つのKDの平均) のKDを有すると判定された。

【0160】

図8にて示すように、3D1は不働化されたNodalへの可溶性Cripto-1の結合を妨げる。漸増量の3D1を5nMのNodalと共にインキュベートし、Cripto

50

t o - 1で誘導体化したチップ上に注入し、それは結果的にC r i p t o - 1とN o d a lの間の結合の低下を生じた。1 : 1のモル比での抗体はh N o d a lのh C r i p t o - 1への結合を70%阻んだ。従って、本発明は、一実施形態にて3 D 1を用いてC r i p t o - 1とN o d a lの間の結合を阻むことができることを提供する(たとえば、本明細書に記載されている治療上の用途のために(たとえば、C r i p t o - 1が介在するN o d a lのシグナル伝達を阻害する及び/または中和するために)。

【0161】

N o d a l合成ペプチドのセットを用いたエピトープマッピングによって3 D 1とN o d a lの結合に内在する残基を調べた(図9を参照)。図9Aは3 D 1の認識に關与する残基をマッピングするために使用された合成ペプチドのセットを示す。図9Bは図9Aで報告したペプチドの3 D 1への結合を示す。ペプチドを1 μ g / m Lで不働化し、5 μ g / m Lの3 D 1で探索した。データは、ペプチドh N o d a l (4 4 ~ 6 9)野生型(W T)の結合に対して基準化した。図9Cは不働化したh N o d a l (4 4 ~ 6 9)WT及びE 4 9 A - E 5 0 A二重変異させた変異体への3 D 1の用量依存性結合を示す。データは3 D 1が4 3 ~ 5 6の領域を包含する残基と相互作用することを示している。ほとんどの相互作用はC 4 3、P 4 6、V 4 7、E 4 9、E 5 0によって立証された。Y 5 8の効果はペプチドの立体構造上にあり得る。

【0162】

3 D 1を用いて種々の免疫アッセイを行った。図10は以下を示す。

(a)ドットプロット: 5 0 ~ 2 0 0 n gの間での漸増濃度にてニトロセルロース膜上でスポットを作ったh N o d a lタンパク質。

(b) (a)で示したドットプロットの定量。

(c)ウエスタンプロット解析: 還元条件下でのN o d a lタンパク質を15% S D S - P A G Eに負荷している。G A M - H R P抗体及びE C L基質を検出に用いた。

【0163】

セファロースS 2 0 0カラムによる3 D 1のサイズ排除解析を図11に示す。I g Gについて予想される溶出容積にて1本の単一ピークが観察される。凝集体の存在は観察されなかった。

【0164】

3 D 1の重鎖と軽鎖の核酸配列を決定した。相補性決定領域(C D RまたはA B R、抗原結合領域)を含有する双方の鎖の可変領域を増幅するプライマーを用いて重鎖と軽鎖の3 D 1配列を配列決定した。

【0165】

抗体軽鎖について1本の確かな配列が得られたのに対して、異なるプライマーにより重鎖C D Rを増幅することによって2つの独立した重鎖が得られた。プライマーn ° 1 0によって得られた重鎖は、C D R 3 m R N Aの3'末端に位置する余分な塩基のために非機能的なタンパク質をコードしている可能性がある。組換え過程の間に生じているこの余分な塩基はR N Aの読み取りフレームを変更し、多分下流の未成熟停止コドンを生じる。実際、この配列では、C D R 1とC D R 2と、C D R 3のN末端とを検出することが可能だったが、C D R 3のC末端及びF R A M E 4のN末端を検出することは可能ではなかった。

【0166】

3 D 1の配列は以下のとおりである。

> L i g h t __ C h a i n __ A __ 3 D 1 __ C H A I N __ S E Q U E N C E (軽鎖) D I K M T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G N I H N Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y N A K T L A D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G S Y Y C Q H F W S T P H V R C W D Q A G T E T E A W (配列番号 1)

A B R 1 (C D R L 1) : G N I H N Y L A (2 7 ~ 3 4) (配列番号 4)

A B R 2 (C D R L 2) : L L V Y N A K T L A D (4 6 ~ 5 6) (配列番号 5)

A B R 3 (C D R L 3) : Q H F W S T P H V R C W D Q A (8 9 ~ 1 0 3) (配列番号 6)

> H e a v y _ _ C h a i n _ _ B _ _ 3 D 1 _ _ C H A I N _ _ S E Q U E N C E (重鎖) V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q T P E K R L E W V A S I S S G G C T Y Y P D S V K G R F T I S R D N A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A R G S M I T A D G N S L L L C Y G L L G S R N L X H R (配列番号 2)

A B R 1 (C D R H 1) : F T F S S Y A M S (2 6 ~ 3 4) (配列番号 7)

A B R 2 (C D R H 2) : W V A S I S S G G C T Y Y (4 6 ~ 5 8) (配列番号 8)

A B R 3 (C D R H 3) : A R G S M I T A D G N (9 5 ~ 1 0 5) (配列番号 9)

> H e a v y _ _ C h a i n _ _ C _ _ 3 D 1 _ _ C H A I N _ _ S E Q U E N C E (重鎖) V K L V E S G G G L V Q P G G S M K L S C V A S G F T F R N Y W M S W V R Q S P E K G L E W V A E I R L K S D N Y A A R Y A E S V K G K F T I S R D D S K S R L Y L Q M N S L R A E D T G I Y Y C T G I R R F A Y W G Q G T L (配列番号 : 3)

A B R 1 (C D R H 1) : F T F R N Y W M S (2 6 ~ 3 4) (配列番号 1 0)

A B R 2 (C D R H 2) : W V A E I R L K S D N Y A A R Y (4 6 ~ 6 1) (配列番号 1 1)

A B R 3 (C D R H 3) : G I R R F A Y (9 9 ~ 1 0 5) (配列番号 1 2)

【 0 1 6 7 】

幹細胞特性を持つ腫瘍細胞にてN o d a lのシグナル伝達を標的として進行性の癌を抑制すること。

【 0 1 6 8 】

N o d a lのシグナル伝達経路(図12を参照)は、癌幹細胞の表現型;上方調節された腫瘍の増殖及び転移;薬剤耐性の獲得;及びN o t c h 4幹細胞シグナル伝達との分子クロストークを含む異常な細胞増殖の複数の態様の根底にある。従来、N o d a lは分泌されるタンパク質であり、N o d a lを発現している腫瘍細胞を単離し、定量することは難題であるとされているので、N o d a lを研究するのは困難であった。

【 0 1 6 9 】

正常な成人組織は一般にN o d a l及びN o t c h 4を発現しない。N o d a lは初期発生にて重要な胚性形態形成因子であり、進行性の腫瘍細胞にて再発現される。N o d a lは、T G F - ベータスーパーファミリーに属する胚性増殖因子である。N o d a lはC r i p t o - 1 / A l k 4 / 7 / A c t R I I B受容体複合体への結合を介してシグナル伝達する。N o d a lはh E S Cの多能性を維持し、軸形成及びL - Rのパターン形成に参与する。これもT G F - ベータスーパーファミリーのメンバーであるL e f t yはN o d a lの天然の阻害剤である。N o d a lはそれ自体の発現を誘導することができる。ヒトでは、N o d a lの発現は胚性組織に大きく制約され、正常な成人組織では失われる。N o d a lは進行性の腫瘍細胞で再活性化される一方で、L e f t yは発現停止される。発生において見られるように、N o t c hの発現は腫瘍細胞にてN o d a lを上方調節することができる。

【 0 1 7 0 】

正常なヒト組織溶解物にてN o d a lの発現を調べた(図14を参照;図56も参照)。A B C A Mから購入したW B等級の正常ヒト組織溶解物と共にS a n t a C r u z (H - 1 1 0 ; 1 : 1 0 0 0)のポリクローナル抗N o d a l抗体を用いた。3 0 μ gの総タンパク質を各試料について負荷した。膜をウサギ抗N o d a lと共に室温で1時間インキュベートした。W e s t P i c o試薬によってバンドを検出した。最初のレーンにおける陽性対照としてH 9 h E S Cの溶解物を使用した。

【 0 1 7 1 】

図15で示すように、N o d a lは貴重な予後生体マーカーである:患者組織における免疫組織化学分析(赤/茶染色)。N o d a lはまた形成異常母斑、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、膵臓癌、白血病、卵巣癌、膀胱癌、及び結腸癌でも検出される。N o d a lタン

10

20

30

40

50

パク質はhESC及び転移性腫瘍細胞によって高度に発現されるのが観察されており；Lefty (Nodalの阻害剤)は腫瘍細胞によって発現されない(図16を参照)。Mel-2：ヒト胚性幹細胞株；H1：ヒト胚性幹細胞株；H9：ヒト胚性幹細胞株；C8161：進行性ヒト黒色腫細胞株；メラニン細胞：正常ヒト色素性細胞株；MDA-MB-231：進行性ヒト乳癌細胞株；Hs578 Bst：正常ヒト乳腺細胞株；HMEpC：正常ヒト乳腺上皮細胞株。

【0172】

hESCと対比してC8161のNodal遺伝子には点突然変異は見いだされていない。

【0173】

C8161細胞ではLeftyはメチル化され、発現停止される。

【0174】

Nodalのシグナル伝達は腫瘍細胞では上方調節される(PNAS、2008)(図17を参照)。

【0175】

図18はNodalの発現を直接調節するNotch4のシグナル伝達を示す。C8161及びMV3の黒色腫細胞におけるNotch発現のノックダウン(silRNAによる)はNodalの下方調節を生じる。Nodal陰性で非進行性のUACC1273黒色腫細胞におけるNotch4の実験的上方調節はNodalの上方調節を生じる(図19を参照)。

【0176】

Nodalエンハンサ要素(NDE)はNodal遺伝子の10kb上流に位置し、Notchについての2つの推定上のRBPJ結合部位を含有する。ChIPはNDEにおいてRBPJ-1結合部位に直接結合するNotch4ICDを確認している(図20を参照)。

【0177】

図21は、非進行性でNodal陰性のC81-61黒色腫細胞がNodalのcDNAで形質移入された後、腫瘍形成性であることを示す。

【0178】

Nodalを検出するために開発されたサンドイッチELISA(検出限界50pg/ウェル)を用いて典型的な較正曲線を得た(図22を参照)。アッセイは、様々な濃度のrNodal(組換えNodal)を伴った溶液からrNodalを捕捉するためにELISAディッシュに被覆するための抗Nodal抗体(3D1と名付けられた)と、捕捉されたrNodalを検出するための二次ウサギモノクローナル抗Nodal抗体とを使用した。次いで、西洋ワサビのペルオキシダーゼに結合した抗ウサギ抗体とQuantareid増強化学蛍光西洋ワサビペルオキシダーゼの基質とによって、得られた捕捉されたrNodal/抗体複合体を検出した。

【0179】

血漿/血清試料にてNodalの検出のために、本発明の3D1抗体を利用する特異的で感度の高いアッセイをxMAP技術に基づいて開発したが、それを図23にて示す。

【0180】

Nodal活性を阻害する3D1抗体の能力を評価し、特徴付けるために実験を実施した。3D1は転移性黒色腫細胞にてNodalの発現、クローン形成性及び血管擬態を低下させた(図24を参照)。C8161黒色腫細胞をIgG対照(陰性対照)または4µg/mLのSantaCruz(SC)(陽性対照として用いた)または3D1機能阻害抗Nodal抗体で72時間処理した。ウエスタンブロット解析はNodalタンパク質の発現の54%(SC)及び50%(3D1)の阻害を明らかにしている。

【0181】

未処理の細胞、またはIgG対照または3D1抗Nodal抗体のいずれかで72時間処理した細胞を軟寒天にて3週間培養した(軟寒天クローン形成アッセイ)。未処理の細

10

20

30

40

50

胞及び I g G 対照抗体で処理した細胞に比べて 3 D 1 で処理した細胞は非付着性の球状クラスターを形成する能力で低下を示した（クローン形成性の低下）。C 8 1 6 1 細胞を 4 μ g / m L の S a n t a C r u z (S C) または 3 D 1 機能阻止抗 N o d a l 抗体、または I g G 対照で処理し、三次元培養にて 2 4 時間培養して血管擬態 (V M) に関わるその能力を測定した。S C または 3 D 1 抗体のいずれかで処理した細胞は対照細胞で見られる V M に特徴的であるネットワーク (*) の形成を完成しなかった。

【 0 1 8 2 】

3 D 1 抗体が S m a d 2 または M A P K のリン酸化を変えることができるかどうかを判定するために追加の試験を行った。3 D 1 抗 N o d a l 抗体は S m a d 2 及び M A P K のリン酸化を低減した。未処理対照に対比して、3 D 1 (4 μ g / m L) で 1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、または 7 2 時間処理した C 8 1 6 1 黒色腫細胞のウエスタンブロット解析 (図 2 5 を参照) 。

10

【 0 1 8 3 】

3 D 1 抗 N o d a l 抗体はマウスにおける転移性黒色腫細胞の肺でのコロニー形成も低減した。肺の腫瘍組織量は、個々のマウス当たり少なくとも 5 枚の異なる肺切片から算出した C 8 1 6 1 黒色腫細胞のコロニーが占める肺の平均比率として決定した (図 2 6 を参照) 。実験プロトコール：2 5 0 , 0 0 0 個の C 8 1 6 1 黒色腫細胞をヌードマウスに i . v . で注射し、肺のコロニー形成を樹立した。コロニー形成に続いて、次の 1 0 日間にわたって 2 日に 1 回 (合計 5 回の注射) 、動物は 3 D 1 モノクローナル抗 N o d a l 抗体 (1 0 0 μ g / 注射) または対照 I g G を i . p . 送達で受け取った。

20

【 0 1 8 4 】

ヒト由来の L e f t y (h L e f t y) による処理を介した黒色腫腫瘍細胞における N o d a l の阻害がアポトーシスを誘導し、クローン形成性を低下させることは以前示されている。黒色腫腫瘍を持つ動物への 5 0 n g / m l の h L e f t y (N o d a l の天然の阻害剤) の腫瘍内送達はアポトーシスを誘導し (赤色の蛍光腫瘍細胞を示す T U N E L アッセイ) 、ハンクス基礎塩溶液 (H B S S 、対照 ; S t r i z z i ら、2 0 0 9) を受け取っている腫瘍に対比して N o d a l 陽性腫瘍細胞における細胞増殖 (K i - 6 7 茶色に染色するマーカー) を低下させる。生体内での黒色腫腫瘍への h L e f t y (5 0 n g / m l) の直接送達は N o d a l 陽性腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する一方で ; 1 0 、 5 0 及び 1 0 0 n g / m l での h L e f t y による試験管内での転移性黒色腫細胞の処理は軟寒天における N o d a l の発現を下方調節し、クローン形成性を低下させる。図 2 7 は、h L e f t y が 1 0 、 5 0 及び 1 0 0 n g / m l にて転移性黒色腫細胞における N o d a l タンパク質の発現を阻害することで有効であることを示す。図 2 8 は、3 週間のクローン形成アッセイ + / - h L e f t y は、h L e f t y が転移性黒色腫細胞におけるクローン形成性を阻害することにおいて有効であることを実証することを示す。

30

【 0 1 8 5 】

組み合わせ方法によって転移性黒色腫を標的とすることは単独療法よりも効果的である。デカルバジン (D T I C) は 1 9 7 0 年代に転移性黒色腫について F D A が認可したものである。ほとんどの患者 (8 0 + %) で役に立たないにもかかわらず、それは今日未だに第一選択療法である。本発明の実施形態の開発の間に発生した作業仮説は、この作用剤は腫瘍細胞の N o d a l を発現している亜集団を標的としないので D T I C 療法は無効であるということであった。従って、D T I C によって治療すること及び N o d a l を発現している細胞を標的とすることが D T I C 単独を超えて高い殺傷効果を有することになるのかどうかを調べた。

40

【 0 1 8 6 】

D T I C 治療が N o d a l を発現し続ける残留細胞集団を残すことが観察された (図 2 9 A 及び 2 9 B を参照) 。しかしながら、D T I C と抗 N o d a l 抗体による治療を組み合わせることが細胞死を誘導した (図 3 0 を参照) 。C 8 1 6 1 転移性黒色腫細胞を処理せず、または 5 μ g / m L の D T I C で 7 2 時間処理し、7 2 時間回復させ、次いで 3 μ g / m L のウサギ I g G と共にさらに 7 2 時間インキュベートした、または未処理のまま

50

にした。対照に対比したパーセント細胞死における終点の変化（図30）をフローサイトメトリーによって評価した（ $p < 0.05$ ）。

【0187】

IgG対照に対比したDTIC処理の前とDTIC処理の後の患者の黒色腫組織におけるNodalの局在確認の免疫組織化学を分析した（図31を参照）。Nodal陽性の亜集団はDTIC処理の前及び後に存在する。

【0188】

図332に示すように、Nodalのノックダウンはヒト乳癌細胞株にて増殖と進行性の挙動を損傷する。

【0189】

図33に示すように、Nodalのノックダウンは生体内での乳癌の増殖を損傷する。

【0190】

図34は、Nodalノックダウンの細胞がp27の発現の上昇を伴ってG1で停止させられることを示す。

【0191】

図35は、Nodalのシグナル伝達がC-mycの発現を調節することを示す。

【0192】

図36は、Nodalが乳癌細胞にてERKの活性化を介してp27及びc-mycのタンパク質レベル及び翻訳後修飾を調節することを示す。

【0193】

Nodalのような幹細胞マーカーを発現している腫瘍細胞の亜集団を分離するためのSMARTFLARESの使用を図37にて示す。標的に結合しない場合、細胞は暗い。プローブは二本鎖オリゴに結合された金ナノ粒子を含有するが、その1つは金のコアへの近接によって消光される蛍光色素分子を含有する。標的(mRNA)はNodalであり、スクランブルオリゴの使用は対照として役立つ。標的が結合すると、フレアが出て、細胞は蛍光を発する。ナノ粒子がその標的に接触すると、それらはナノ粒子上の捕捉鎖に結合し、レポーター鎖を置き換える。今やレポーター鎖は消光されず、蛍光を発し、蛍光検出機構を用いて検出することができる。この方法はFACSを用いた生細胞の選別に使用することができ；選別された腫瘍細胞を遺伝子発現についてRT-PCRによって、タンパク質発現についてウエスタンブロットによって、軟寒天におけるクローン形成能について、及び生体内での腫瘍形成能について分析することができる。別の幹細胞マーカーであるCD133と一緒にNodalのmRNAを画像解析するのに共焦点顕微鏡法を実施することができる。

【0194】

従って、単回のインキュベートと単一の試薬によって検出が一晩で現れ得る。細胞自体の機構を用いてSMARTFLAREが細胞に侵入し、対象とするmRNAを検出し、細胞を出てさらなる実験を可能にする（図38を参照）。

【0195】

SMARTFLAREを利用して転移性黒色腫細胞と同様に非進行性黒色腫細胞双方にてNodalの発現を測定した。

【0196】

図39に示すように、進行性の転移性黒色腫細胞C8161(A)、MV3(B)、SK-MEL28(C)及び非進行性の黒色腫細胞UACC1273(D)を、NodalのmRNAを検出するように調製された100pMのCy3-標識したSMARTFLARESによって培養にて16時間処理し、次いで生細胞の画像解析用のLSM700XL S1インキュベートシステムを備えたZeissLSM700共焦点顕微鏡を用いて生細胞の画像解析を行った。Cy3蛍光緑色シグナルとしてのNodal mRNAの検出は進行性黒色腫細胞(A、B、C)で見られる一方で非進行性のUACC1273細胞(D)ではシグナルは見られない。陰性対照を表すCy3標識したスクランブル配列SMARTFLARESはC8161細胞(E)にて緑色シグナルを示さない一方で、SMA

10

20

30

40

50

RTFLARESがC8161細胞(Cy5標識した、赤色蛍光)によって取り込まれることを示す陽性取り込み対照は、これら同じ細胞における赤色蛍光シグナル(F)によって及び赤色蛍光と微分干渉コントラスト(DIC)画像解析(G)によって示される(倍率はすべて=40x)。

【0197】

低いNodalの発現に対比した高いNodalの発現に基づいて黒色腫亜集団を選別することができる(図40を参照)。C8161細胞をNodalのmRNAであるSMARTFLARESによって16時間処理し、次いでBD Bioscience FACSAria IIセルソーターを用いてNodal発現(高いNodal)亜集団及びNodal欠乏(低いNodal)亜集団を表す高いまたは低い蛍光シグナルに基づいて亜集団に選別した。2つの亜集団におけるNodal mRNAの相対的な発現をリアルタイムポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)アッセイによって決定し(A)、Nodalタンパク質(プロ-Nodalとして39キロダルトンで検出される)の相対的な発現をウエスタンブロット解析(Epitomicsウサギモノクローナル抗Nodal抗体)によって決定した(B)。高いNodalと低いNodalで選別された細胞におけるプロ-Nodalタンパク質の差異は、対照として-アクチンタンパク質を用いて各レーンで負荷されたタンパク質について補正を行った後、未選別の細胞に比べて密度計で測定した。

10

【0198】

Nodalを高く発現している黒色腫の亜集団は同時にCD133癌幹細胞マーカーを発現する(図41を参照)。NodalのmRNAであるSMARTFLARESを用いて選別したC8161細胞のNodalが高い集団をガラスのカバーグラス上に置き、メタノールで固定し、透過化した。次いで細胞をNodalに対するウサギ一次抗体(Santa Cruz; H-110)及びCD133に対するマウス一次抗体(Millipore; 17A6.1)で処理し、その後、ウサギ抗体に対するアレクサ色素488を結合した二次抗体(緑色; Nodal)及びマウス抗体に対するアレクサ色素594を結合した二次抗体(赤色; CD133)で処理した。CD133の発現は高いNodalで選別した亜集団で濃縮されたと思われ(A)、未選別の集団と対比したNodalが高い亜集団のCD133タンパク質の発現に関するウエスタンブロット解析は未選別の亜集団に比べて高いNodalで選抜された亜集団でグリコシル化されたCD133(130キロダルトン)の量の増加を示す(B; -アクチンタンパク質を対照として用いてレーン当たりに負荷されたタンパク質の量を補正した)。

20

30

【0199】

実施例2

以前のドッキング試験及び結合試験に基づいて、H3-リストヘリックス及びプレヘリックスループを含むヒトNodalの領域(Uniprot Q96S42)をhNodal抗原として選択した(図42)。内在性タンパク質(238~347 a.a.)の成熟形態を番号付けし、それに相当する1~110残基を参照したhNodal(44~67)ペプチドは共受容体Crip1への結合に関与し、相互作用を安定化する2つのグルタミン酸残基E49及びE50を含有する。これら2つのホットスポット残基を認識することができる抗Nodal抗体を選択するために、免疫及びハイブリドーマの生成の後、E49及びE50が2つのアラニンで置換されたhNodal(44~67)E49A-E50Aと名付けられた変異ペプチドを並行して用いて細胞上清をスクリーニングするスクリーニングの戦略を使用した。

40

【0200】

N末端に遊離のアミノ基を持つ(KLH及び免疫原調製物との結合用)、またはアセチル化及びアミド化されてタンパク質構造内でのペプチドをさらに良好に模倣するhNodal(44~67)及び変異させた変異体を合成した。

【0201】

エピトープを定義し、抗体による認識への特定の残基の寄与を調べるように、以下の表

50

1を参照されたいhNodal(44~67)の一連の変異させた変異体を設計した。N末端での二重変異残基を持つhNodal(44~67)の変異体に含まれる1~6(表1)のペプチド;さらに短いペプチド(表1、4から6までの項目)を用いてN末端領域におけるエピトープを確認した。表1の項目7~9、Nodal(1~38)、Nodal(39~75)及びNodal(76~110)で報告されたペプチドを調製し、それらを用いてNodalの内部断片についての抗体の特異性を確認した。

【0202】

Nodalの密接な構造ホモログである増殖分化因子(GDFファミリー)に属するヒトGDF5(Uniprot、P43026)の領域433~445、ヒトGDF6(Uniprot、Q6KF10)の領域386~398及びヒトGDF7(Uniprot、Q7Z4P5)の領域382~394を再現する表1におけるペプチド10及び11を調べてTGF-ファミリーリガンドの間での抗体の選択性を検証した。BLASTサーバーを用いて実施したTGF-リガンドすべてに対比したhNodal(44~67)の複数の配列比較に基づいて配列を選択した。

【表 1】

表 1

配列番号	ペプチド #	hNodal ペプチド	配列	MW 理論値*	MW 実験値**
				(amu)	(amu)
17	1	(44-67)	PNPVGEEFHPTNHAYIQSLLKRYQ	2878.44	2879.3
19	2	(44-67)	PNPVGAAFHPTNHAYIQSLLKRYQ	2762.43	2763.5
		E49A-E50A			
20	3	(44-67)	PNAAGEEFHPTNHAYIQSLLKRYQ	2824.39	2825.5
		P46A-V47A			
25	4	(44-56)	PNPVGEEFHPTNH	1617.68	1617.8
23	5	(52-60)	HPTNHAYIQ	1120.53	1121.2
26	6	(56-67)	AYIQSLLKRYQ	1422.78	1423.5
27	7	(1-38)	HHLPDRSQLCRKVKFQVDFNLIGWGS WIIYPKQYNAYR	4716.43	4718.4
28	8	(39-75)	CEGECNPVGEFHPTNHAYIQSLLK RYQPHRVPSTC	4276.98	4278.7
29	9	(76-100)	CAPVKTKPLSMLYVDNGRVLLDHHKD MIVEECGCL	3966.95	3968.6
30	10	hGDF 5 ***	CEFPLRSHLEPTNH	1719.8	1719.8
31	11	hGDF 6/7	CDFPLRSHLEPTNH	1705.78	1705.7

【0203】

hNodal (44~67) の BSA を結合したペプチドを被覆している ELISA によってハイブリドーマ上清のスクリーニングを行った。9つのクローンが陽性だった。並行して hNodal (44~67) とその変異させた変異体 hNodal (44~67) E49A-E50A とを用いて、予備選択したハイブリドーマ上清をスクリーニングした。結合していないペプチドを 330 nM で被覆し、5.0 μg/mL (33 nM) の総タ

10

20

30

40

50

ンパク質濃度でハイブリドーマ上清を調べてアッセイを行った。9B9、3D1、10B12、5F10、1B4、及び2D12として示される6つのクローンに由来する上清は、程度は異なるものの不動化された抗原を認識した(図43)。クローン9F10、1C8及び8E3は非常に弱いシグナルを示したのでさらに検討しなかった。3D1が変異させた変異体よりもはるかに良好に野生型hNoda1(44~67)ペプチドを認識したということは、共受容体であるCrip1-1とのNoda1の結合に決定的である2つのグルタミン酸残基を包含する領域の近傍で結合が起きることを示している。

【0204】

選択の後、精製したモノクローナル抗体の完全長組換えヒトNoda1を結合する能力を評価した。SPR直接結合によってスクリーニングを行った。MAbは当初100nMで調べ、この濃度では2つの抗体3D1及び5F10しか完全長のrhNoda1タンパク質を結合することができなかった(図44)。親和性定数を推定するために、用量依存性の結合実験を行った。解析は、各試行の会合速度定数及び解離速度定数を決定する抗体の漸増用量を注入して実施した。3D1は1.42nMのKD値で結合したのに対して5F10はさらに弱い親和性(83nM;表2)を特徴とした。3D1は速い会合速度定数(平均 $k_a = 6.95 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)及び遅い解離速度定数(平均 $k_d = 6.55 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)を示し、タンパク質に対する高い結合親和性を生じた。5F10は遅い会合速度定数(平均 $k_a = 1.91 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)及び速い解離速度定数(平均 $k_d = 1.08 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)の結果のように低い親和性を示した。2つのmAbの結合曲線は図44b、cにて報告されている。動態パラメータは表3a、bにて報告されている。

【表2A】

表2. センサーチップ上で官能化されたrhNoda1への結合についてスクリーニングした抗Noda1mAb及び決定されたKD値。NB: 結合なし

mAb	rhNoda1への結合
3D1	$K_D = 1.4 \text{ nM}$
5F10	$K_D = 84 \text{ nM}$
1B4	NB
9B9	NB
10B12	NB
2D12	NB

10

20

30

【表 2 B】

表 2. 会合及び解離の速度定数。(a) センサーチップ上で官能化された r h N o d a l への 3 D 1 m A b の結合について決定された K_D 値 ; (b) センサーチップ上で官能化された r h N o d a l への 5 F 1 0 m A b の結合について決定された K_D 値 ; (c) センサーチップ上で官能化された r h N o d a l への 3 D 1 F (a b ')₂ の結合について決定された K_D 値 ; (d) センサーチップ上で官能化された r h N o d a l への 3 D 1 F a b ' の結合について決定された K_D 値 ;

(a)				
3D1 mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	SD *
6 nM	1.28×10^6	6.29×10^{-4}	4.91×10^{-10}	0.0129
12 nM	9.79×10^5	6.83×10^{-4}	6.98×10^{-10}	0.0504
25 nM	6.42×10^5	6.22×10^{-4}	9.68×10^{-10}	0.1650
50 nM	3.61×10^5	6.97×10^{-4}	1.93×10^{-9}	0.3310
100 nM	2.12×10^5	6.44×10^{-4}	3.03×10^{-9}	1.0700
平均	6.95×10^5	6.55×10^{-4}	1.42×10^{-9}	0.3260

(b)				
5F10 mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	SD *
100 nM	2.60×10^4	8.16×10^{-4}	3.14×10^{-8}	0.0246
250 nM	1.81×10^4	1.08×10^{-3}	5.97×10^{-8}	0.0818
500 nM	1.31×10^4	1.33×10^{-3}	1.02×10^{-7}	0.1480
750 nM	9.40×10^3	1.30×10^{-3}	1.38×10^{-7}	0.0286
平均	1.91×10^4	1.08×10^{-3}	8.28×10^{-8}	0.0708

(c)				
F(ab') ₂	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	SD *
25 nM	4.40×10^5	1.13×10^{-3}	2.57×10^{-9}	0.0214
50 nM	2.77×10^5	1.35×10^{-3}	4.87×10^{-9}	0.0578
100 nM	1.87×10^5	1.63×10^{-3}	8.71×10^{-9}	0.323
250 nM	8.21×10^4	1.67×10^{-3}	2.03×10^{-8}	0.446
500 nM	4.58×10^4	1.84×10^{-3}	4.02×10^{-8}	1.63
平均	2.06×10^5	1.52×10^{-3}	1.53×10^{-8}	0.496

(d)				
Fab'	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	SD *
25 nM	3.42×10^5	2.02×10^{-3}	5.91×10^{-9}	0.0347
50 nM	1.59×10^5	2.62×10^{-3}	1.65×10^{-8}	0.0245
75 nM	1.50×10^5	1.92×10^{-3}	1.28×10^{-8}	0.0949
100 nM	1.18×10^5	1.56×10^{-3}	1.32×10^{-8}	0.0909
200 nM	7.59×10^4	2.31×10^{-3}	3.04×10^{-8}	0.145
平均	1.69×10^5	2.09×10^{-3}	1.58×10^{-8}	0.0780

* SD: 標準偏差

【 0 2 0 5 】

結晶化試験に有用な、または N o d a l 検出のための追加の試薬としてさらに小さい抗体断片を作出する試みにて、酵素消化によって 3 D 1 に由来する F a b 断片を生じる実験を行った。3 D 1 を P N G アーゼ F によって脱グリコシル化し、2つの重鎖の各 C H 2 ドメイン上の A s n²⁹⁷における単一の N 結合グリカンを取り除いた。脱グリコシル化の後、抗体全体をペプシンで消化した。4時間のインキュベーションの後、消化は完了した。ペプシンは他の断片を形成することなく、3 D 1 を約 1 1 0 k D a の MW を持つ F (a b ')₂ に変換した (図 4 5)。次に、プロテイン G アフィニティクロマトグラフィとサイズ排除クロマトグラフィとを含む 2 工程精製手順によって F (a b ')₂ 断片を消化混合物から単離した (図 4 6 a)。S E C クロマトグラフィのプロファイルは、凝集体の非存在及び高度に均質な生成物の存在を示し ; さらにその溶出容量は予想分子量 (約 1 1 0 k D a 、 図 4 6 c) に一致した。生成物の完全性及び純度は各工程の後、還元及び非還元の条件下での S D S - P A G E 解析によって確認した (図 4 6 b 、 d)。F a b ' 断片は、メルカプトエチルアミンを用いた F (a b ')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合の選択的な還元によって得られた。非還元条件下の S D S - P A G E 解析によって示されるように還元は 3 時間後上手く達成された (図 4 7 a)。さらなる解析を行うために、F a b ' を I A M によってアルキル化し、次いでそれをサイズ排除クロマトグラフィによって精製し、その独自性を確認し、潜在的な凝集体の存在を評価した。1 3 . 6 5 m L で溶出された単一ピークによって示されるように (図 4 7 b)、凝集体は検出されなかった。軽鎖と重鎖を接続するジスルフィド架橋の選択的な還元の後、L C - E S I - T O F M S によっても 3 D 1 の F a b ' を特徴付けた。分離した鎖で行った L C - M S 解析は (図 4 8 a ~ c)、軽鎖についての単一の質量ピークと、不完全な I A M の誘導体化を説明する重鎖についての 4 つの優勢なピーク (5 7 D a の質量差) と、ヒンジ領域のレベルでの二重分割を示す。2 つの主要ピーク間で見られる 1 8 6 D a の質量差及びヒンジ領域内のマウス I g G 1 の高度に保存された配列 (図 4 8 d) は、ペプシンが矢印で示すように S¹¹⁶V¹¹⁷ 残基の前と後だけの 2 つの切断を操作する (U n i P r o t K B , P 0 1 8 6 8) ことを示している。

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

50

3D1F(ab')₂/Fab'断片のSPR競合結合解析

SPRにより実施される競合結合アッセイによってrhNodalタンパク質に結合するF(ab')₂及びFab'断片の能力を評価した。3D1のF(ab')₂及びFab'断片は類似の会合速度定数及び解離速度定数で、従って同じ親和性でも(K_D = 15 nM、図49a, b)不動化されたrhNodalを結合した。このK_D値は、抗体全体によって示されるもの(K_D = 1.4 nM)に比べて10倍高く、それによって親和性は10倍低い(表3c-d)。

【0207】

エピトープマッピング

3D1抗体によって認識されるエピトープを細かく説明するために、ELISA及びSPRの解析によって元々の抗原のマッピングを行った。この目的で、3D1及び機能的断片への結合についてELISA及びSPRによってペプチド抗原及びその変異させた変異体(表1)を調べた。同じ濃度で異なるペプチドを被覆することによって行ったELISAは、最強のシグナルが短い(44~56)ペプチドで検出される(図50a)のに対して弱いシグナルは変異させたE49及びE50を持つ変異体で得られることを示した。加えて、P46及びV47をアラニンに変異させた変異体と同様に他のN末端で切り詰めた短いペプチドでは結合は認められなかった。これらのデータは、N末端残基、特にP46、V47、E49及びE50に対する3D1の高い特異性を実証している。

【0208】

ペプチド(44~67)及び(44~56)でSPR用量反応結合アッセイを行ってK_D値を推定した(図51a, b、図52a, b、及び表4)。データは、領域(44~56)が3D1mAbによって認識されるエピトープを含有し、46~50の残基が結合に重要であることを裏付けている。特に、その領域はプレヘリックスループの中に入り、NodalのCrip1-1への結合に決定的な2つのグルタミン酸残基を包含する。データは、3D1が立体構造エピトープを認識するのではなく、むしろ線状エピトープを認識することを示している。

【表3】

表4. エピトープマッピング試験でスクリーニングしたhNodalペプチドの命名及びアミノ酸配列ならびに3D1mAb/Fab'で官能化したセンサーチップへの陽性ペプチドの結合について決定されたKD値。フィッティングなしは、結合会合曲線のフィッティングがどんな値にも収束しなかったことを意味する。

hNodalペプチド 0.5-20 μM	配列	3D1mAb に対するK _D	3D1Fab' に対するK _D
(44-67)	PNPVGEEFHPTNHAYIQSLLKRYQ (配列番号17)	613 nM	590 nM
(44-67)E49A-E50A	PNPVGAAFHPTNHAYIQSLLKRYQ (配列番号19)	結合なし	結合なし
(44-67)P46A-V47A	PNAAGEEFHPTNHAYIQSLLKRYQ (配列番号20)	結合なし	結合なし
(44-56)	PNPVGEEFHPTNH (配列番号25)	413 nM	371 nM
(52-60)	HPTNHAYIQ (配列番号23)	結合なし	結合なし
(56-67)	AYIQSLLKRYQ (配列番号26)	結合なし	結合なし

【0209】

特異性アッセイ

共受容体Crip1-1との結合に關与するNodal(44~56)の領域に

ついでに3D1mAbの特異性をさらに評価するためにELISAアッセイを行った。従って、新しいNodalペプチドを3D1への結合についてスクリーニングした。これらのペプチドは、ヒトNodalの成熟形態のタンパク質N末端部分を模倣するhNodal(1~38)(配列番号27);中央領域を模倣するhNodal(39~75)(配列番号28);及びC末端部分を模倣するhNodal(76~110)(配列番号29)であった。TGF-リガンドGDFの領域を模倣する及びNodalの44~67領域に一致する他のペプチド(GDF5及びGDF6/7、表1)もこの目的で使用した。抗体を生成するのに使用した領域44~67を含有するNodalのNodal(39~75)だけが類似の効率で結合したのに対して他のペプチドは本質的に不活性だった(図50b)。

10

【0210】

その抗原及び完全長のタンパク質への3D1の結合の特異性をさらに裏付けるために、hNodal(44~56)(配列番号25)を用いてヒト胚性幹細胞にて発現される内在性のNodalの染色を阻止した。実験は、3D1単独で及びペプチドとの予備インキュベーションの後、プロットを探索することによって実施した。内在性のNodalの双方の形態は、mAbをペプチドと予備インキュベーションした場合、もはや検出されなかった(図53)ということは、3D1がネイティブのタンパク質上でも同じエピトープを認識することを示している。

【0211】

内在性のNodalタンパク質の検出

20

ウエスタンプロット解析を行ってヒト黒色腫細胞におけるNodalタンパク質の内在性の形態を認識するmAbの能力を調べた。ヒト黒色腫細胞株のパネル及び陽性対照として使用した非黒色腫細胞であるHEK-293細胞において3D1は未成熟形態プロNodal(およそ37kDa)を染色することができた(図54a)。およそ13kDaのNodalのさらに小さな成熟形態はほとんど検出されなかったということは、それが多分高度に不安定であるか、またはこの形態はほとんど分泌されていることを示している。黒色腫細胞株における内在性Nodalを認識する3D1の能力はサイトメトリー解析によっても裏付けられた。FACS解析(図54b~d)は、3D1が、非常に低い濃度(0.1µg/mL)で、且つ抗体濃度の上昇に伴うシグナル強度の上昇によって明らかにされたように用量依存性にインタクトな細胞でもネイティブのNodalタンパク質を結合することを示した。成熟Nodal及びプロNodalは双方ともウエスタンプロット解析にて3D1によって検出される(図54a)。

30

【0212】

実施例3

以下に記載されるのは上記実施例2にて記載されている実験を行ったのに使用された材料及び方法である。

【0213】

ペプチドの合成、精製及び特定

野生型hNodal(44~67)ペプチド、その変異させた変異体、及びヒトGDFペプチド5及び6/7は、自動SYROシステムを用いた標準のFmoc化学反応に続いてC末端アミド化変異体として段階的な固相合成によって調製した。0.57ミリモル/gの置換等級のリンク-アミドMBHA樹脂及び標準の保護を伴ったアミノ酸誘導体を合成すべてにおいて使用した。それぞれカップリング反応HATU/DIEA事前活性化及び5倍過剰のFmoc保護アミノ酸を用いてペプチド合成の標準条件下でポリペプチドを作った。カップリング及び脱保護の時間はそれぞれ30分及び20分で保持した。Fmoc化学反応についての標準の側鎖保護基を残基すべてに使用した。N末端のアセチル化は、5%DIEAを伴ったDMF中の0.5Mでの無水酢酸を用いた樹脂上で室温にて20分間行った。固相支持体からのペプチドの切断は、トリフルオロ酢酸(TFA)/トリイソプロピルシラン(TIS)/水(90/5/5、v/v/v)混合物で室温にて90分間処理することによって行った。粗精製ペプチドを冷却ジエチルエーテルにて沈殿させ

40

50

、水/アセトニトリル(1/1、v/v)混合物に溶解し、凍結乾燥した。凍結乾燥の後、0.1% TFAを含有するH₂O/CH₃CN 95/5 v/vの溶液にペプチドを溶解した。次いで、半分取用10×1 cmのID C18モノリスOnyxカラムを用い、15 mL/分の流速にてCH₃CN中0.05% TFAの10分間にわたる5%~70%の線形勾配を適用し、214 nmでの吸光度をモニターするWATERSのPrep150 LC分取システムにおける逆相HPLC(RP-HPLC)によってそれらを精製した。回収した分画を凍結乾燥した。ペプチドの純度及び独自性は液体クロマトグラフィ/質量分光分析(LC-MS)によって確認した; 解析は、OPTONES I光源と完全な測量HPLCシステムを備えたLCQ DECA XPIオン捕捉質量分光計にて実施した。ペプチドを溶出するのに適用した典型的な勾配は以下の通りである: 0.2 mL/分の流速; 5% 溶媒B (ACN、0.05% TFA) から60% 溶媒Bまでの10分間の勾配。溶媒AはH₂O、0.08% TFAだった。Biobasic C18 50×2 mmのIDカラムを用いてLC-MS解析の間、ペプチドを分離した。

10

【0214】

免疫原の調製

0.2% v/vのグルタルアルデヒド(ストック溶液25%)を含有する20 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0) 2.0 mLにて室温で混合物を3時間攪拌することによって非アセチル化hNodal(44~67)ペプチドを3.0 mgのキャリアタンパク質(KLH及びBSA)に結合させた。1.0 Mのグリシン水溶液1.0 mLの添加によって反応をブロックし、次いで溶液をpH 7.4のPBS緩衝液に対して激しく透析し、その後凍結乾燥した。ペプチド/タンパク質の結合体の量はBradfordアッセイを用いて決定した。

20

【0215】

抗体の生成

機関の指針に従ってBALB/cマウスを飼育し、取り扱った。完全フロイントアジュバントで乳化した100 µgのKLH結合hNodal(44~67)ペプチド混合物を含有する300 µLの懸濁液の皮下注射によって5週齢のメスBALB/cマウス(Jackson Lab)を免疫した。免疫の前に250 µLの血液試料を各マウスの尾静脈から採取し、免疫前対照(T₀試料)として使用した。18日目と30日目に不完全フロイントアジュバントにおける同じ量の免疫原でマウスを追加免疫した; 後に続く免疫ごとにその前に血液試料(250 µL)を尾静脈から採取し、ELISAによって調べて抗体の力価をモニターした。最高の抗体力価を示すマウスに最後の抗原追加免疫を皮下で投与し、7日後、屠殺し、以下で記載されているように脾臓を取り出した。屠殺したマウスの脾臓から採取した細胞を、ポリエチレングリコール(PEG) 1300~1600と7.5% DMSOを含有するRPMI-GMにて5:1の比で骨髓腫SP2/0(ATCC)細胞と融合させた。

30

【0216】

融合させたハイブリドーマ細胞を、10%のFBS、100 U/mLのペニシリン、100 µg/mLのストレプトマイシン、100 µMのヒポキサンチン、16 µMのチミジン及び400 nMのアミノプテリン(RPMI-HAT, Sigma-Aldrich、ミラノ、イタリア)を含有するRPMI-GM培地を含有する30 mLの選抜培地に再浮遊させた。細胞浮遊液(200 µL)を96穴プレートに分配し、5% CO₂の雰囲気にて37 °Cでインキュベートした。12~14日目の間で、hNodal(44~67)ペプチドへの結合及びグルタミン酸49及び50が2つのアラニンで置換された変異させた変異体hNodal(44~67)E49A-E50Aへの結合についてELISAによって上清をスクリーニングした。

40

【0217】

hNodal(44~67)ペプチドとの強い反応性を持つ(しかし、変異させた変異体とは反応しない)3D1と名付けたハイブリドーマクローンを限界希釈によって2回再クローニングし、その反応性をELISAによって再確認した。サブクローニングしたハ

50

イブリドーマ細胞を10% FBSを含有するRPMI - HATで培養し、ゆっくり無血清培地に取り入れた。10% FBSを含有するOPTI - MEM培地。適応させた細胞をOPTI - MEM培地で培養し、次いで大規模な生産のためのバイオ反応器 (Bio Cell Line, Becton Dickinson) に移した。

【0218】

選抜されたクローンによって産生された抗Nodal抗体のアイソタイプは、製造元の指示書 (Pierce Rapidマウス抗体アイソタイプキット, Thermo Scientific) に従ってマウス抗体専用の市販のキットを用いることによって決定した。

【0219】

ELISA: マウス血清における抗体の滴定

マウス血清における抗体の力価を測定するために、96穴ELISAプレートをPBS中1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSA結合したhNodal (44~67) 50 μL で4 にて一晚被覆した。次いで0.05% Tween 20を含有するPBS (PBS - T) でプレートを3回洗浄した。プレートの非特異的部位を5% BSAでブロックし、室温で120分間インキュベートした。次いでPBS - Tでウェルを3回洗浄し、1:100から開始して1:100, 000までの3倍連続希釈で血清 (50 μL) をウェルに加えた。プレートを37 で1時間インキュベートし、再びPBS - Tで洗浄した。次いで1:1000希釈のHRP結合したウサギ抗マウスIg (1.0 mg/mL) 50 μL をウェルに加え、37 で1時間インキュベートを行った。洗浄の後、100 μL の2,2 - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) (ABTS) 基質溶液を各ウェルに加えた。15分後、1% SDS水溶液50 μL を各ウェルに加えることによって反応を止めた。マイクロプレートリーダーによって415 nmにて光学密度 (OD) を測定した。1:10, 000の免疫血清の希釈と共にインキュベートした3つ組ウェルの平均吸光度が免疫前血清と共にインキュベートしたウェルで測定されたものの少なくとも3倍である場合、抗体力価は十分に高いと評価された。

【0220】

ELISA: ハイブリドーマ上清のスクリーニング

ハイブリドーマ上清のスクリーニングのために、hNodal (44~67) 及びhNodal (44~67) E49A - E50AをPBSで希釈した330 nMにてポリスチレン製円錐平底96穴プレートに4 にて一晚被覆した (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$)。インキュベートの後、被覆したウェルを、0.005%のTween 20を含有するPBS (PBS - T) で3回洗浄し、PBS中1% BSA (300 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) と共に37 で1時間インキュベートすることによって非特異的な結合部位をブロックした。PBS - Tで3回洗浄した後、PBSで33 nMに希釈したハイブリドーマの上清を37 で1時間インキュベートした (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$)。インキュベートの後、プレートをPBS - Tで3回洗浄し、PBSで1:1000に希釈したヤギ抗マウスHRP結合抗体 (1 mg/mL , プロットニング等級アフィニティ精製したヤギ抗マウスIgG (H+L)) を二次抗体として加え (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$)、37 で1時間インキュベートした。インキュベート及びPBS - Tによる3回の洗浄の後、0.1 Mのクエン酸緩衝液 (pH 5.2) にてH₂O₂ (0.4 mg/mL) を含有する100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ の新鮮に調製したO - フェニレンジアミン (0.4 mg/mL) (SIGMAFAST (商標) OPD tablet Sigma - Aldrich) を加えることによって、結合した抗体を検出した。50 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ の2.5 MのH₂SO₄ と共に5分の後、ペルオキシダーゼ反応が停止され、マイクロプレートリーダーを用いて490 nmにて光学密度を測定した。60 nMでのペプチドを被覆し、0.1~66 nMの間での濃度の3D1を用いることによって不動化したhNodal (44~67) 及びhNodal (44~67) E49A - E50Aへの3D1の用量依存性の結合を行った。

【0221】

ELISA: エピトープマッピング及び特異性アッセイ

3 D 1 m A b のエピトープマッピング及び特異性アッセイに使用したペプチドを P B S で希釈して 1 . 0 μ g / m L で被覆した ; P B S に溶解した 3 D 1 m A b は 1 . 0 μ g / m L で一次抗体として使用した。

【 0 2 2 2 】

モノクローナル抗体及び F (a b ') 2 / F a b ' 断片の精製

抗体及び F (a b ') 2 / F a b ' 断片を標準の手順によって精製した。4 で 4 0 0 0 r p m にて 2 0 分間遠心分離した後、モノクローナル I g G を含有するハイブリドーマ細胞 / 培養上清を 0 . 2 2 μ m のフィルターで濾過し、H i T r a p (商標) プロテイン G H P カラム (G E H e a l t h c a r e) に負荷した。A K T A F P L C (商標) 機器 (G E H e a l t h c a r e) にて 0 . 6 m L / 分の流速で、2 8 0 n m での吸光度をモニターして精製を行った。負荷緩衝液としての P B S (p H 7 . 4) を用いて未結合の物質を洗い流した後、溶出緩衝液として 1 0 0 m M のグリシン p H 2 . 7 を用いて p H 条件を大幅に変えることによって結合した抗体を回収した。1 / 1 0 容量の 2 M のトリス p H 9 . 0 を加えることによって、溶出した抗体を素早く中和した。精製した m A b 及び関連する断片の安定性を確保するために、緩衝液を P B S (p H 7 . 4) に交換し、適当な遠心濾過機 (M i l l i p o r e , c i t y D a r m s t a d t , s t a t e , U S A G e r m a n y) を用いて濃縮した。B r a d f o r d アッセイを用いて濃度を推定した。濃縮したタンパク質の純度は S D S - P A G E 及びクマシーブルー染色によって評価した。

10

【 0 2 2 3 】

ランニング緩衝液として P B S p H 7 . 4 を用い、0 . 5 m L / 分の一定流速で 2 5 m L の溶出容量にて 2 8 0 n m での吸光度をモニターしながら、S u p e r d e x (商標) 2 0 0 H R 1 0 / 3 0 0 (G E H e a l t h c a r e , P i s c a t a w a y , N J , U S A) にてサイズ排除クロマトグラフィによる精製を行った。

20

【 0 2 2 4 】

S P R 解析

C M 5 センサーチップ及び認定された H B S 緩衝液 (2 0 m M の H E P E S , 0 . 1 5 M の N a C l , p H 7 . 4 , P 2 0 , 0 . 0 0 5 %) を用いて、G E H e a l t h c a r e の B i a c o r e 3 0 0 0 機器にて S P R 解析を行った。5 μ L / 分で操作する、表面不動化ウイザード手順を用いた標準のアミンカップリング化学反応に続いてタンパク質の不動化を行った。チャンネルを E D C / N H S で 7 分間活性化し ; 精製した m A B の N o d a l タンパク質への結合アッセイのために、予め選択した酢酸ナトリウム緩衝液 p H 4 . 5 で適当に希釈した r h N o d a l を 4 0 0 0 R U のレベルが達成されるまでカップリングさせた。センサーチップ表面上の残留する反応基を 1 . 0 M の塩酸エタノールアミン p H 8 . 5 で失活させた。H B S - E P における漸増濃度 (6 ~ 1 0 0 n M) での 3 D 1 (6 0 μ L) の溶液を 2 0 μ L / 分で注入して抗体結合を調べた。1 0 m M の N a O H 溶液を用いてチップ表面を再生した。

30

【 0 2 2 5 】

単一用量のスクリーニングの後、完全長タンパク質を結合することができる 2 つの抗体 3 D 1 及び 5 F 1 0 で用量依存性結合の解析を行った。6 ~ 1 0 0 n M の間の範囲の濃度で 3 D 1 の結合を行った。5 F 1 0 については、さらに高い濃度 (1 0 0 、 2 5 0 、 5 0 0 及び 7 5 0 n M) を必要とした。解離は少なくとも 5 0 0 秒間モニターした。3 D 1 のマッピングを行うために、抗体全体を 1 0 m M の N a A c 緩衝液 p H 5 における 5 μ g / m L にて標準のアミンカップリング化学反応によって 5 μ L / 分の流速で C M 5 センサーチップ上に不動化した。m A b で達した不動化のレベルは約 5 3 5 0 R U だった。同じセンサーチップの別のチャンネル上で、標準のアミンカップリング化学反応に続いて 1 0 m M の N a A c 緩衝液 p H 4 . 5 における 1 0 μ g / m L にて 5 μ L / 分の流速で 3 D 1 の F a b ' を不動化した。不動化した F a b ' の量は約 2 5 7 0 R U だった。残留反応基を 1 M の塩酸エタノールアミン p H 8 . 5 で失活させた。すでに記載されているようにブランクのチャンネルを準備した。H B S - E P 緩衝液を用いて 6 0 μ L の一定の試料容量を

40

50

注入して20 μ L / 分の流速にてリアルタイムの結合解析を行った。HBS - EP緩衝液で適当に希釈したペプチドを以下の濃度：0.5、1、2.5、5、10及び20 μ Mで注入した。解離は少なくとも500秒間モニターした；再生溶液は5 mMのNaOHだった。

【0226】

各解析について、実験センサーグラムを並べ、ブランクのシグナルを差し引き、重ね合わせた。数学的操作及びフィッティングのすべてはGE HealthcareのBia Evaluationソフトウェアバージョン4.1を用いて実施した。実験データはすべて1:1のLangmuir結合相互作用を想定して処理した場合、最適のフィッティングを与えた。

10

【0227】

抗体の脱グリコシル化及びペプシン分解

ペプシンによる抗体の分割を改善して機能的な断片を入手するために、3D1を先ず、New England Biolabs (Beverly, city, MA, USA) によって供給されたペプチド-N-グリコシダーゼF (PNGアーゼF) による脱グリコシル化反応に供した。最初の予備的な小規模の試みに続いて、PBS (pH 7.4) で希釈した1.5 mgのmAbを11単位のPNGアーゼFと共に37 $^{\circ}$ Cでインキュベートすることによって規模の大きな脱グリコシル化反応を行った。最適な脱グリコシル化の時間は48時間であると特定された。SDS-PAGEによってモニターされるペプシン分解反応は、1:25のペプシン対抗体の最終w/w比を用い、37 $^{\circ}$ Cの水槽で4時間混合物をインキュベートして20 mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.0にて最適化された。

20

【0228】

Fab'断片の調製

5 mMの2-メルカプトエチルアミンを用いてF(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を選択的に還元することによってFab'断片を製作した。PBS pH 7.4におけるF(ab')₂断片に20 mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.0を加えてpHを6.0に合わせ、2 mMのEDTAも加えた。混合物を37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。インキュベートの後、PBSを混合物に加えてpHを中性に合わせた。F(ab')₂のFab'断片への還元は非還元条件下での12% SDS-PAGEゲルによってチェックし、確認した。還元の後、Fab'断片を室温にて暗所で25 mMのIAM (ヨードアセトアミド) と共に30分間インキュベートして反応性チオールをブロックした。

30

【0229】

3D1 Fab'のLC-ESI-TOFMS解析

質量分光分析によって分析した試料を37 $^{\circ}$ Cで1時間20 mMのDTTを用いて還元した。Agilent 6230飛行時間型(TOF) LC/MSシステムに連結したAgilent 1290 Infinity LCシステムにて質量分光分析の解析を行った。二元溶媒ポンプ脱気装置、カラムヒーター、及び自動試料採取器と共に光ダイオードアレイ(PDA)検出器及び6230飛行時間型MS検出器に液体クロマトグラフィAgilent 1290 LCモジュールを連結した。製造元の推奨に基づいて、ポンプを勾配二元溶媒系：溶媒A、H₂Oにおける0.01%のTFA (v/v) 及び溶媒B、CH₃CNにおける0.01% TFA (v/v) に接続した。クロマトグラフィ解析は、15分での25%から65%までの溶媒Bの線形勾配を適用するPhenomenex AERIS WIDE PORE 逆相C4 3.6 mm (50 x 2.1 mm) を用いて行った。20 $^{\circ}$ Cで一定のヒーターと共にカラムの流速を0.2 mL / 分で保持した。UVスペクトルは200 ~ 400 nmの範囲でモニターした。注入容量は1 μ Lであり、針の洗浄が続いた。100から3200 m/zまでの質量走査と共に正のイオン走査モードで操作するように質量分析計Agilent 6230 TOFMSを設定した。イオン供給源は、改善された参照質量送達のために元々のAgilent Jet Stream (AJS) 供給源から二重噴霧器バージョンに等級を高めた。乾燥気体及びネプライザ気体として窒素を使用した。機器は、以下のパラメータ：乾燥気体温度、325 $^{\circ}$ C；乾燥気体流量、10 L / 分；

40

50

ネブライザ、20 psi；シースガス温度、400；シースガス流量、11 L/分；V Cap. 3.500 V；ノズル、0 V；フラグメンター、200 V；スキマー、65 Vを用いてデータを獲得し、8極子RFVppは750だった。機器の状態は拡張動的範囲モード(2 GHz)に設定した。試料が流れる前に調整及び較正を行った。データの回収及び統合はMass Hunterワークステーションソフトウェア(バージョンB.05.00)を用いて実施した。データは獲得の間に質量中心及びプロファイル双方の形式で保存した。参照ネブライザを介したAgilent TOFの参照溶液の一定流量は、システムが2つの独立した参照ロック質量イオンであるプリン(m/z 119.03632)及びHP-922(m/z 922.000725)を用いることによって質量のドリフトについて連続して補正し、質量の精度と再現性を保証するのを可能にした。Agilent Mass Hunter定性ソフトウェアを用いた正確な質量走査データから標的化合物を検出し、報告した。

10

【0230】

3D1抗原ペプチドと内在性Nodalタンパク質との間の競合

以前記載されたように得られたH9及びH14ヒト胚性幹細胞の総タンパク質溶解物30 µgを還元条件下で15% SDS-PAGEゲルにて分離し、分解されたタンパク質をPVDF膜上に移した。50 ngのrhNodalタンパク質を陽性対照として用いた。ウエスタンブロットの手順を実施した：膜をブロックし、次いでTBS-T中の2.5% NFD Mにおける4.0 µg/mLの3D1のみによって、及びその抗原であるhNodal(44~56)ペプチド10 µg/mLと共に予備インキュベートした4.0 µg/mLの3D1 mAbによって探索した。GAM-HRP(Bio-Rad)1:1000(1.0 µg/mL)によって検出を達成した。製造元の指示書に従って増強化学発光ウエスタンブロット基質(Pierce, Rockford, IL, USA)によってブロットをブロットを発色させ、Chemidoc XRSビデオデンシトメータ(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて捕捉した。

20

【0231】

黒色腫細胞における内在性のヒトNodalの検出

以下のヒト皮膚の悪性黒色腫細胞株：PES、A-375、SK-MEL、WM266及びLCMを用いて内在性のNodalタンパク質の検出のためのウエスタンブロット解析を行った。HEK-293(ヒト胚性腎臓)細胞及び100 ngのrhNodalタンパク質を陽性対照として使用した。プロテアーゼ阻害剤のカクテル及びPMSF(フェニル-フッ化メタンシルホニル)を添加した50 mMのトリス-HCl、pH 7.5, 50 mMのNaCl, 1%のNP-40, 10 mMのEDTA, 1 mMのMgCl₂, 1 mMのCaCl₂, 10%のグリセロールにて3回の凍結融解サイクルを行うことによって細胞を溶解した。細胞溶解物を12,000 rpmで4 にて20分間遠心分離することによって透明にし、上清をBradfordアッセイによって定量した。各試料に由来する50 µgの細胞溶解物を還元条件下で15% SDS-PAGEゲルに適用し、80 Vで3時間電気泳動した。分離したタンパク質を100%のメタノールに5分間予め浸したポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜(Millipore)に移した。振盪のもとで室温にて1時間、0.1%のTween-20を含有するトリス緩衝化生理食塩水(TBS-T)における5%ミルク(NFD M)でブロットをブロックし；次に振盪のもとで4 にて一晩、TBS-T中の2.5% NFD Mにおける2 µg/mLの一次抗体としての3D1 mAbによって膜を探索した。膜をTBS-Tで3回洗浄し、攪拌のもとで室温にて1時間、TBS-T中の1:1000に希釈した二次抗体としてのGAM-HRPと共にインキュベートした。製造元の指示書に従って、Pierce Chemical社によって提供されたSuperSignal West Picoキットによる増強化学発光基質法を用いて標的タンパク質を検出した。Quantity Oneソフトウェアを用いたChemidoc XRSビデオデンシトメータによってシグナルを捕捉した。

30

40

【0232】

FACS解析

50

LC P、A 3 7 5 及びWM 2 6 6 の黒色腫細胞を遠心分離によって回収した。上清の吸引の後、細胞を500 μ LのPBSに再浮遊させ、ホルムアルデヒドを加えて4%の最終濃度を得た。細胞を室温で10分間固定した。固定の後、500 μ LのPBS/Tween 20を加えることによって細胞を透過化した。1 \times 10⁶個の細胞を各バイアルに分配し; 1 mLのPBS (インキュベート緩衝液) を各バイアルに加え、細胞を4000 rpmにて4 で5分間の遠心分離によって洗浄した。以下の濃度: 0.1、0.5、1.0 及び2.0 μ g/mLにてPBSで希釈した3D1抗Nodal抗体 (一次抗体) の100 μ L溶液に細胞を再浮遊させた。標準のIgG1アイソタイプを陰性対照として使用した。振盪のもとで細胞を一次抗体と共に4 で1時間インキュベートした。インキュベートの後、1 mLのPBSにおける遠心分離によって細胞を洗浄し、再浮遊させ、振盪のもと暗所にて4 で40分間、PBSで1:1000に希釈した(1.0 μ g/mL) FITCを結合した抗マウス抗体 (二次抗体) と共にインキュベートした。1 mLのインキュベート緩衝液との遠心分離によって細胞を洗浄し、500 μ LのPBSに再浮遊させ、フローサイトメータで解析した。BDのFACScaliburシステムを用いて蛍光を評価した。

10

【0233】

実施例4

種々のヒト組織におけるNodalの発現

本明細書での実施形態の開発の間の実験を行って、Nodalの発現についてWB解析によって一連の正常ヒト組織抽出物を調べた。Nodalの堅実な発現を示すことが知られている、対照として使用したH9ヒト胚性幹細胞株(H9)の溶解物にて検出されたNodalと比べて、脳、腎臓、肝臓、膵臓または心臓といった主要な臓器では感知できるほどのNodalタンパク質の発現は観察されなかった(図55)。しかしながら、H9及びC8161細胞溶解物で検出されたものに類似する分子量を持つが、かなり低い強度のバンドが調べた2つの骨格筋試料の1つに由来する溶解物にて観察された。

20

【0234】

抗Nodal mAbの生成及び性状分析

抗Nodal mAbの産生及び選択

3D1は抗原hNodal [44~67]を結合するのに対して、変異させたペプチド変異体であるhNodal [44~67]E49A-E50Aをあまり確実に認識しないということ(図56a)は、それがCripto-1-1との結合に関与する2つのグルタミン酸残基と優先的に相互作用し、Nodal/Cripto-1-1受容体複合体の相互作用についての中和活性を潜在的に有することを示している。

30

【0235】

抗Nodal mAbのrhNodalへの結合

3D1のrhNodalを結合する能力は、Biacoreのセンサーチップ上にタンパク質を不動化し、漸増濃度で精製抗体を注入することによるSPRによって評価した(図57b)。会合速度定数及び解離速度定数は熱力学的解離定数(K_D)と一緒に各試行について決定し、平均した。3D1 mAbとタンパク質との間の相互作用についてこの方法で1.42 nMの K_D 値が推定された。

40

【0236】

競合アッセイ

rhCripto-1-1で誘導体化したBiacoreのセンサーチップを用いて競合アッセイを行った。rhCripto-1-1とrhNodalとの間の結合は、漸増濃度でNodalタンパク質の溶液を注入することによって評価した。rhNodalを5 nMにて1:0.5、1:1、及び1:2のモル比(タンパク質:mAb)に一致する濃度での3D1 mAbと共にインキュベートした。3D1 mAbは5 nM(1:2のモル比)にてNodalのCripto-1-1への結合をおよそ70%阻害したということ(図56c)は、NodalとCripto-1-1共受容体との間の相互作用を阻止する3D1の能力を明らかにしている。

50

【0237】

試験管内での3D1mAbの機能阻止効果

3D1mAbがC8161黒色腫の腫瘍コロニー形成能に影響を及ぼす潜在力を有するかどうかを判定するために、未処理の細胞またはIgG対照もしくは3D1mAbのいずれかで72時間処理した細胞を軟寒天にて3週間培養した(足場非依存性の増殖を測定する)。3D1mAbで処理した細胞は、未処理の細胞及びIgG対照で処理した細胞に比べて非付着性の球形クラスターを形成する能力の低下を示した(足場非依存性の増殖の低下を表す)(図57a)。Nodalは癌幹細胞の表現型に関連する腫瘍細胞の可塑性の根底にあることが示されている。特に、Nodalは、それによって黒色腫細胞が血管擬態(VM)として知られる過程にて毛細管様構造の形成を介して内皮様の表現型を取ることが出来る表現型の切り替えを誘導し、それは試験管内の試験についての三次元(3D)培養にて繰り返すことができる。C8161細胞を4mg/mLの3D1mAbまたはIgG対照で処理し、次いで3D培養にて24時間増殖させてVMに携わるその能力を測定した場合、AngioSysソフトウェアパッケージを用いて接合部と細管の数の低下によって測定されるように、対照に比べて3D1mAbで処理した細胞はVMに特徴的な完全なネットワークを形成することができなかつた(図57b)。

10

【0238】

Nodalのシグナル伝達及び細胞サイクル調節因子に対する3D1mAbの効果
黒色腫細胞

4µg/mLの3D1mAbによるC8161細胞の処理はNodal関連のシグナル伝達分子であるSmad2及びERK1/2のリン酸化の低下を引き起こし、それは4時間後明らかであり、72時間の実験の間ずっと維持された(図58a)。また、3D1mAb処理の72時間後、Nodal発現にて関連する低下があった(図58b)。有糸分裂に関与し、活発に増殖している細胞で発現が高い調節性タンパク質であるサイクリンB1はもまた、3D1mAbで72時間処理したC8161細胞で低下した(図58b)。付随して、G1相で細胞周期停止を起こす細胞周期の阻害因子タンパク質であるp27及び有糸分裂特異的な増殖マーカーであるホスホヒストンH3(P-H3)の上昇が対照に対比して同じ3D1で処理したC8161細胞で観察された(図58b)。

20

【0239】

乳癌細胞

同じ時間の3D1mAbによるMDA-MB-231ヒト乳癌細胞の処理を含めるように解析を拡大した。これらの結果はWBによってP-H3と同様にNodal発現の注目値に値する低下を示している(図60)。

30

【0240】

これらの結果は、黒色腫細胞における3D1mAbの処理がNodalの発現と同様にSmad2及びERK1/2の下流のリン酸化を低下させ、サイクリンB1を低下させる一方でp27を上昇させること、及び乳癌細胞でも同様の効果を見ることができていることを示している。

【0241】

生体内での3D1mAbの効果

幾つかの異なる異種移植モデルがヌードマウスで確立された。まず、C8161細胞を皮下注射することによって皮膚黒色腫の同所性のモデルが確立された。いったんマウスにて感知できるほどの腫瘍が検出されると、直接的な腫瘍内注射を介した3D1mAbまたは対照IgGによる処理が開始された。実験の8~14日目にて、3D1mAbで処理したマウスではIgG処理した対照に比べて腫瘍体積が有意に小さかつた(図60a)。これらのマウスにおけるC8161細胞によって形成された代表的な腫瘍の切片を分析してNodalのシグナル伝達に対する3D1mAbの効果判定した。これらの切片におけるP-Smad2についてのIHC染色は、IgG処理した対照に比べて3D1mAbで処理した動物にて強陽性の核P-Smad2染色を伴った細胞の平均比率(±SEM)で有意な低下を示した[IgG=83%±8.2%(N=4)対51.3%±3.3%(N

40

50

= 4) ; $P < 0.05$] (図 6 1 b) 。 転移性黒色腫は最も進行性で臨床的に難題の疾患形態を表すので、関連する転移モデルを C 8 1 6 1 細胞の全身性の注入を介してヌードマウスにて確立した。このモデルでは、C 8 1 6 1 は注射後 7 ~ 1 0 日以内に肺でコロニー形成し易く、これらの細胞は N o d a l に対する市販のポリクローナル抗体を用いて標的化できることが示されている。本明細書の実施形態の開発の間に実施された実験では、I g G 対照で処理したヌードマウスを 3 D 1 m A b で処理したものと比べると、C 8 1 6 1 のコロニーによって占められた肺組織 (肺腫瘍組織量) の平均比率 (\pm S E M) で有意な低下が認められた (図 6 1 c) [3 D 1 m A b = 2 5 . 8 % \pm 4 . 6 % (N = 8) 対 I g G 対照 = 5 9 . 3 % \pm 1 1 . 4 % (N = 8) ; $P < 0.05$] (F i g . 6 0 d) 。 3 D 1 m A b 及び I g G で処理したマウスに由来する C 8 1 6 1 肺コロニーの代表的な切片を I H C 染色用に処理して N o d a l 関連のシグナル伝達に対する効果を判定した。皮下腫瘍と同様に、3 D 1 m A b で処理したヌードマウスに由来する肺の切片は、I g G 対照で処理したマウスの切片における肺コロニーに比べて P - S m a d 2 の核局在化を伴った細胞の有意に低い平均比率 (\pm S E M) を示した [3 D 1 m A b = 3 9 \pm 8 . 9 (N = 6) 対 I g G 対照 5 9 . 4 \pm 9 . 9 (N = 6) ; $P < 0.01$] (図 6 0 e) 。 これらの肺コロニー切片のさらなる染色は、p 2 7 について染まる細胞の平均比率 (\pm S E M) の 3 D 1 m A b で処理したヌードマウスにおける有意な上昇 [3 D 1 m A b = 3 9 . 5 % \pm 1 7 % (N = 6) 対 I g G 対照 = 2 1 % \pm 1 5 . 3 % (N = 6) ; $P < 0.001$] (図 6 1) と共に、サイクリン B 1 について染まる細胞の平均比率 (\pm S E M) の 3 D 1 で処理したヌードマウスにおける有意な低下 [3 D 1 m A b = 2 5 . 9 % \pm 9 . 4 % (N = 6) 対 I g G 対照 = 3 8 . 8 % \pm 1 0 . 5 % (N = 6) ; $P < 0.001$] を示した。

【 0 2 4 2 】

本明細書の実施形態の開発の間に実施された実験は、ヒト黒色腫細胞株 A 3 7 5 S M (活性のある B R A F 変異を含有する) を B R A F i ダブラフェニブで処理すると、P - E R K 1 / 2 は予想どおり有意に低下するが、N o d a l の発現は相対的に影響を受けないことを明らかにしている (図 6 2 a) 。 しかしながら、N o d a l の発現は 3 D 1 m A b によって処理されると A 3 7 5 S M 細胞で有意に低下する (図 6 2 b) 。 さらに、ヌードマウスにて形成された A 3 7 5 S M 同所性異種移植の腫瘍体積は、B R A F i または I g G 対照で処理されたマウスに比べて 3 D 1 m A b で処理したマウスにて有意に低下する (図 6 3 a) 。 これらの処理した動物 (図 6 3 b) に由来する代表的な組織切片における P - S m a d 2 の I H C 染色は、B R A F i または I g G 対照で処理されたマウスに比べて 3 D 1 で処理したマウスにて核 P - S m a d 2 の平均比率 (\pm S E M) の有意な低下を示した [3 D 1 = 2 8 . 1 % \pm 2 . 6 % (N = 4) ; B R A F i = 6 8 . 7 % \pm 6 . 3 % (N = 4) ; I g G = 5 0 . 2 % \pm 7 . 3 (N = 4) ; $P < 0.05$] 。 これらのデータは、生体内での 3 D 1 m A b 処理の N o d a l 機能の阻止活性及び腫瘍縮小効果を実証している。

【 0 2 4 3 】

可溶性 N o d a l の E L I S A による検出

乳癌患者由来の血清試料で N o d a l を検出できるかどうかを判定するために N o d a l の E L I S A を開発した。可溶性組換え N o d a l を検出するためのサンドイッチ E L I S A を用いた校正曲線を図 6 4 a にて示す。初めに、N o d a l を分泌する H 9 細胞用の馴化培地を採用して E L I S A による分泌された N o d a l の評価におけるアッセイの妥当性を調べた。これらの知見は、分泌された N o d a l を可能性のある生体マーカーとして特定する生体液 (たとえば、血清) の試験をもたらす実行可能なやり方を支持した。この E L I S A を用いて、N o d a l は 1 5 / 2 3 (6 5 %) の血清試料で検出された。血清試料が疾患の進行性に基いて分類された場合 (図 6 4 b) 、非浸潤性の乳癌患者の血清に比べて浸潤性の血清で高い N o d a l レベルの傾向が指摘された [浸潤性乳癌についての中央値 = 6 8 0 7 (範囲 : 0 ~ 2 3 4 6 7 ; N = 1 2) 対非浸潤性乳癌についての中央値 = 3 5 0 9 (範囲 : 0 ~ 1 1 5 4 1 ; N = 1 1)] 。 従って、これらの結果は、我々の新規の 3 D 1 m A b に基づく E L I S A によって癌患者由来の血清にて N o d a l を

検出することができることを示している。

【0244】

本発明の実施形態の開発の間に実験を行って、ヒトNodalを標的とし、機能的に阻止することができるmAbである3D1の機能を提示し、明らかにした。データは、3D1mAbがNodalの強い結合能力があり、それがGlu49及びGlu50を包含するCripto-1-1共受容体との相互作用領域の近傍で結合することを明らかにしている。3D1抗体はまた、試験管内でのNodalのCripto-1-1への結合を効率的に阻止することができるという従って、それが、Cripto-1-1共受容体複合体に依存したNodalの下流のシグナル伝達を阻むことができることを示している。試験管内で処理された黒色腫細胞は、Nodalタンパク質の発現レベルの有意な低下ならびにSMAD2及びERK1/2の活性化(リン酸化)形態の低下を示した。この処理はまた、足場非依存性の増殖及び血管擬態の低下、及び細胞周期阻害剤p27の上昇で補完される細胞増殖関連分子サイクリンB1とP-H3のレベルの低下も伴った。3D1mAbで処理した皮下同所モデル及び肺コロニー形成モデル双方のヌードマウス異種移植モデルは、それぞれ低下した腫瘍体積及び肺腫瘍組織量という点で抗腫瘍効果を示した。腫瘍切片におけるP-Smad2、p27及びサイクリンB1についてのIHC染色の分析は試験管内の結果を裏付けた。Nodal発現の下方調節及びP-H3の付随する低下を示す乳癌細胞の3D1処理の効果。

10

【0245】

実施例5

以下に記載されているのは、上記実施例4にて記載されている実験を行うのに使用された材料及び方法である。

20

【0246】

試薬

TRIzol及び制限エンドヌクレアーゼ酵素はInvitrogen(Carlsbad, CA, USA)から購入した。プロテインGカラムはGE Healthcareから購入した。SPR解析は、CM5センサーチップ及び認定されたHBS緩衝液(20mMのHEPES, 0.15MのNaCl, pH7.2, P20, 0.005%)を用いてGE HealthcareのBiacore3000機器にて実施した。組換えヒトNodal(rhNodal)及びヒトCripto-1-1(rhCripto-1-1)はR&D Systems(Minneapolis, Minnesota, USA)が提供した。以下の抗体をWBに使用した:ウサギ抗-Nodal(H-110; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX);ウサギ抗-P-Smad2(44-244G; Life Technologies, Grand Island, NY);ウサギ抗-Smad2/3(07-408; Millipore, Lake Placid, NY);ウサギ抗-P-p44/42 MAPK(P-ERK1/2)(9101S; Cell Signaling, Beverly, MA);ウサギ抗-p44/24 MAPK(ERK1/2)(44-654-G; Life Technologies);マウス抗-アクチン(MAB1501; Millipore, Temecula, CA)。以下の抗体を免疫組織化学法に使用した:ヤギ抗-ヒトNodal抗体(LS-B3955; LifeSpan Biosciences, Seattle, WA)1:150;ウサギ抗-P-Smad2(AB3849; Millipore)1:100~1:250;抗-p27(2552; Cell Signaling)1:400;ウサギ抗-サイクリンB1(ab32053; Abcam, Cambridge MA)1:200。

30

40

【0247】

3D1の生成及び分析上の性状分析

ヒトNodalの領域44~67に対して3D1抗体を生成した。抗原は、共受容体であるCripto-1-1との結合に関与する2つのグルタミン酸残基E49及びE50を含有する。これら2つのホットスポット残基を認識できる抗Nodal抗体を選択する

50

ために、hNoda1 [44~67]と、E49及びE50が2つのアラニンで置換された変異させたペプチドhNoda1 [44~67] E49A-E50Aとを用いてクローンをスクリーニングした。典型的なELISAアッセイでは、ペプチドを0.18 µg/mL (60 nM)で被覆し、1.0~67 nMの間での漸増濃度で抗体を用いて結合を探索した。野生型ペプチドを結合する抗体のみをさらに進展させ、ELISA及び表面プラズモン共鳴 (SPR) の双方によって完全長の組換えNoda1に対する結合について調べた。プロテインGアフィニティークロマトグラフィ及び結合した分画のゲル濾過を含む2つのクロマトグラフィ工程によって3D1抗体を均質まで精製した。

【0248】

表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析

HBSをランニング緩衝液として用いて25 にてSPR解析を行った。5 µg/分で操作する表面不動化ウィザード手順を用いた標準のアミンカップリング化学反応に従ってタンパク質の不動化を行った。EDC/NHS [N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC)/N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS)] によって7分間チャンネルを活性化し; 結合アッセイのために、予め選択した酢酸ナトリウム緩衝液pH4.5で適当に希釈したrhNoda1を4000RUレベルが達成されるまでカップリングさせた。センサーチップ表面上の残留する反応基を1.0Mの塩酸エタノールアミンpH8.5の添加によって失活させた。漸増濃度(6.0 nM~100 nM)での3D1のHBS溶液(60 µL)を20 µL/分で注入することによって抗体結合を調べた。10 mMのNaOH溶液を用いてチップ表面を再生した。競合アッセイについては、10 mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH4.5における5 µg/mLで5 µL/分の流速にてCM5センサーチップ上にrhCrip1-1を共有結合で不動化して、600RUの不動化レベルに達した。HBS中5 nMのrhNoda1を漸増濃度の3D1と共にインキュベートした。Noda1:抗体の1.0:0.5、1:1及び1.0:2.0の最終モル比を達成するために、センサーチップを通す前に各混合物を30分間室温でインキュベートした。60 µLの各溶液を20 µL/分の流速で注入した。各バイオチップ上で、誘導体化されない表面を準備し、対照ブランクとして使用した。一定容量の60 µLの抗体を注入して、または種々の濃度でHBSランニング緩衝液にて適宜希釈した競合溶液を注入して20 µL/分の流速で解析を行った。結合についての接触時間は3分だった。解離は少なくともさらに3分間モニターした。各解析について、実験センサーグラムを並べ、ブランクのシグナルを差し引き、重ね合わせた。GE HealthcareのBiaEvaluationソフトウェアバージョン4.1を用いて数学的な操作及びフィッティングを行った。実験データは1:1のLangmuir結合相互作用を想定して処理すると最適なフィッティングを与えた。

【0249】

細胞株

細胞株は、短縦列反復遺伝子型決定によって認証され、PCR ELISAキット (Roche Applied Science) によってマイコプラズマの混入について日常的に調べられ、標準の手順に従って維持された。

【0250】

足場非依存性増殖アッセイ

0.35%アガロース、RPMI 1640; 4 µg/mLのマウスIgG対照 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) または3D1 mAb (2.8 µg/mL) のいずれかを伴った10%血清にC8161黒色腫細胞 (5,000個/ウェル) を浮遊させ、次いで6穴ディッシュにおける0.5%寒天; RPMI 1640; 10%血清の固化層に重層した。3週間の培養の後、細胞クラスターを形成させ、スコア化した (50個の細胞以上のクラスター)。別々の実験から3組ウェルを平均し、IgG対照の比率 (平均値 ± SEM) として提示した。

【0251】

血管性ネットワーク形成アッセイ

75 μ l の氷冷マトリゲル (平均 12 ~ 15 mg/ml ; Corning, Bedford, MA) を 12 穴培養ディッシュにて広げることによって三次元マトリクスを調製し、37 °C で 1 時間重合させた。次いで 4 μ g/ml のマウス IgG 対照または 3D1mAb (2.8 μ g/ml) の存在下で、C8161 ヒト黒色腫細胞 (1×10^5 個/ウェル) を調製されたマトリゲルマトリクス上に置いた。追加の抗体は加えなかった。次いで管状ネットワークの形成を 24 時間後観察し、Zeiss モデル 25 倒立顕微鏡 (Carl Zeiss, Inc, Thornwood, NY) 及び Hitachi HV-C20 CCD カメラ (Hitachi Denshi Ltd., Woodbury, NY) を用いて画像をデジタルで捕捉した。IgG 対照及び 3D1mAb で処理した培養物双方の少なくとも 4 つの異なる視野の画像から平均値を算出し、次いで AngioSys ソフトウェアパッケージ (TCS CellWorks, Ltd., Buckingham, UK) を用いて解析し、解析した視野から接合部及び細管の平均数 (\pm SEM) を算出した。

10

【0252】

ウエスタンブロット解析

脳、腎臓、肝臓、膵臓、心臓及び骨格筋における Nodal 発現のレベルを測定するために、ウエスタンブロット (WB) 用のすぐ使える成人組織抽出物を Santa Cruz Biotechnology から購入した。細胞株の WB 実験については、全細胞溶解物を調製し、定量した。常法を用いて SDS-PAGE ゲル電気泳動及び WB を行った。製造元の推奨に応じて、PVDF 膜を 5% 脱脂粉乳または 5% BSA にてブロックし、5% 脱脂粉乳または 5% ウシ血清アルブミンのいずれかで希釈された抗体にて 4 °C で一晩ブロックした。West Pico 化学発光試薬 (Thermo Fisher) 及び X 線フィルムへの露出を用いてシグナルを検出した。

20

【0253】

生体内の実験

3D1mAb の生体内での効果を評価するために、250,000 個の C8161 細胞をヌードマウスに静脈注射することによって転移性黒色腫の肺転移モデルを確立した。細胞が肺でコロニー形成する間の 4 日後、マウスを処理群と対照群に分離した。10 日間にわたって投与される対照群における 500 μ g の無関係なアイソタイプ IgG に対比して、処理群は合計 500 μ g の 3D1mAb を受け取った (100 μ g の 3D1mAb または IgG の隔日の腹腔内注射 (IP))。処理期間の終了時、マウスを屠殺し、肺を採取し、肺腫瘍組織量の組織学的評価及び免疫組織化学のために処理した。肺腫瘍組織量は、各群について少なくとも 4 匹の別々のマウスに由来する肺における低倍率 (10 \times 対物レンズ) での少なくとも 4 つの別々の視野にて C8161 によって占められる肺組織の、且つ 2 人の異なる観察者によって実施される平均比率を評価することによって決定された。最終的な平均値 \pm SEM は個々の観察者によって決定された別々の平均値から算出された。

30

【0254】

原発黒色腫に対する 3D1mAb の生体内での効果を判定するために実験を行った。この目的で、500,000 個の C8161 細胞をヌードマウスに皮下注射した。触診可能な腫瘍に直接、合計 700 μ g の 3D1mAb または IgG 対照抗体を注入した (14 日間にわたって 100 μ g の隔日の腫瘍内注射)。次いでマウスを屠殺し、皮下の腫瘍を回収し、以前記載したように処理した。BRAF (V600E) 変異の存在下で 3D1mAb の効果を評価するために、およそ 150,000 個の A375SM ヒト転移性黒色腫細胞の皮下注射を介して第 3 の同所性異種移植モデルをヌードマウスにて確立した。マウスを上述のように 3D1mAb または IgG 対照、または 3 mg/kg のダブラフェニブで IP 処理した。

40

【0255】

免疫組織化学法

厚さ 4 ミクロンのホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織切片を調製し、Dako

50

Plus自動染色装置(DAKO, Inc, Carpinteria, CA)で免疫組織化学法を実施した。抗原回復及びブロッキングの工程に続いて、切片を一次抗体と共に60分間インキュベートし、その後適当なビオチン化二次抗体(Biocare Medical, Conrad, CA)及びストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Thermo Scientific Lab Vision)と共にインキュベートした。3,3'-ジアミノベンジジン基質(Thermo Scientific Lab Vision)によって発色させ、切片をヘマトキシリン(Biocare Medical, LLC)で対比染色した。陰性対照として、一次抗体と同じ濃度での適当な種の無関係なIgG(Jackson ImmunoResearch Labs)と共に隣接する連続切片をインキュベートした。上述の肺腫瘍組織量の評価と同様に、陽性染色±SEMの平均比率が2人の異なる観察者によって決定され、それぞれ、群当たり少なくとも2匹の異なるマウスに由来する4つの別々の高倍率視野(63×対物レンズ)について陽性細胞/細胞の総数×100の比率を評価した。

10

【0256】

サンドイッチELISA

市販のNodal抗体及び3D1mAbのエピトープマッピングによって、後者がELISAディッシュを被覆するための捕捉抗体として選択された一方で、ウサギモノクローナル抗Nodal(Abcam)は結合したNodalを検出するのに役立った。QuantaRed増強化学蛍光西洋ワサビペルオキシダーゼ基質(ThermoFisher)と併せて西洋ワサビペルオキシダーゼを結合した抗ウサギ抗体を用いて、その後、免疫複合体を定量した。確立したサンドイッチELISAアッセイは、ヒト胚性幹細胞に由来する馴化培地及び生体液における組換えタンパク質として75pg/ウェルの検出限界(組換えNodalを用いて算出された)でNodalを検出する。乳癌患者に由来するヒト血清試料はBioOptions(Brea, CA)から購入した。

20

【0257】

参考文献

以下の出版物はその全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

Schier, A.F. Nodal signaling in vertebrate development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003, 19, 589-621.

30

Shen, M.M. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 2007, 134, 1023-1034.

Schier, A.F. Nodal morphogens. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009, 1, a003459.

Strizzi, L.; Hardy, K.M.; Kirschmann, D.A.; Ahrlund-Richter, L.; Hendrix, M.J. Nodal expression and detection in cancer: Experience and challenges. *Cancer Res.* 2012, 72, 1915-1920.

40

Strizzi, L.; Postovit, L.M.; Margaryan, N.V.; Lipavsky, A.; Gadiot, J.; Blank, C.; Seftor, R.E.; Seftor, E.A.; Hendrix, M.J. Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert. Rev. Dermatol.* 2009, 4, 67-78.

Strizzi, L.; Hardy, K.M.; Margaryan, N.V.; Hillman, D.W.; Seftor, E.A.; Chen, B.

50

- ; Geiger, X.J.; Thompson, E.A.; Lingle, W.L.; Andorfer, C.A.; et al. Potential for the embryonic morphogen Nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012, 11, R75.
- Lawrence, M.G.; Margaryan, N.V.; Loessner, D.; Collins, A.; Kerr, K.M.; Turner, M.; Seftor, E.A.; Stephens, C.R.; Lai, J.; Postovit, L.M.; et al. Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells. *The Prostate* 2011, 71, 1198-1209. 10
- Quail, D.F.; Siegers, G.M.; Jewer, M.; Postovit, L.M. Nodal signalling in embryogenesis and tumorigenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013, 45, 885-898.
- Topczewska, J.M.; Postovit, L.M.; Margaryan, N.V.; Sam, A.; Hess, A.R.; Wheaton, W.W.; Nickoloff, B.J.; Topczewski, J.; Hendrix, M.J. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat. Med.* 2006, 12, 925-932. 20
- Postovit, L.M.; Margaryan, N.V.; Seftor, E.A.; Hendrix, M.J. Role of nodal signaling and the microenvironment underlying melanoma plasticity. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008, 21, 348-357. 30
- Strizzi, L.; Hardy, K.M.; Kirsammer, G.T.; Gerami, P.; Hendrix, M.J. Embryonic signaling in melanoma: Potential for diagnosis and therapy. *Lab Investig.* 2011, 91, 819-824.
- Seftor, E.A.; Seftor, R.E.; Weldon, D.S.; Kirsammer, G.T.; Margaryan, N.V.; Gilgur, A.; Hendrix, M.J. Melanoma tumor cell heterogeneity: a molecular approach to study subpopulations expressing the embryonic morphogen nodal. *Semin Oncol.* 2014, 41, 259-266. 40
- Hardy, K.M.; Strizzi, L.; Margaryan, N.V.; Gupta, K.; Murphy, G.F.; Scolyer, R.A.; Hendrix, M.J. Targeting nodal in conjunction with dacarbazine induces synergistic anticancer effects in metastatic melanoma. *Mol. Cancer Res.* 2015, 13, 670-680.
- Postovit, L.M.; Margaryan, N.V.; Seftor, 50

- E. A. ; Kirschmann, D. A. ; Lipavsky, A. ; Whetton, W. W. ; Abbott, D. E. ; Seftor, R. E. ; Hendrix, M. J. Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 4329-4334.
- Costa, F. F. ; Seftor, E. A. ; Bischof, J. M. ; Kirschmann, D. A. ; Strizzi, L. ; Arndt, K. ; Bonaldo Mde, F. ; Soares, M. B. ; Hendrix, M. J. Epigenetically reprogramming metastatic tumor cells with an embryonic microenvironment. *Epigenomics* 2009, 1, 387-398. 10
- Strizzi, L. ; Hardy, K. M. ; Seftor, E. A. ; Costa, F. F. ; Kirschmann, D. A. ; Seftor, R. E. B. ; Postovit, L. - M. ; Hendrix, M. J. Development and cancer: at the crossroads of Nodal and Notch signaling. *Cancer Res.* 2009, 69, 7131-7134. 20
- Hardy, K. M. ; Kirschmann, D. A. ; Seftor, E. A. ; Margaryan, N. V. ; Postovit, L. M. ; Strizzi, L. ; Hendrix, M. J. Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.* 2010, 70, 10340-10350.
- Bianco, C. ; Adkins, H. B. ; Wechselberger, C. ; Seno, M. ; Normanno, N. ; De Luca, A. ; Sun, Y. ; Khan, N. ; Kenney, N. ; Ebert, A. ; et al. Cripto-1 activates nodal- and ALK4-dependent and -independent signaling pathways in mammary epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 2002, 22, 2586-2597. 30
- Reissmann, E. ; Jornvall, H. ; Blokzijl, A. ; Andersson, O. ; Chang, C. ; Minchiotti, G. ; Persico, M. G. ; Ibanez, C. F. ; Brivanlou, A. H. The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev.* 2001, 15, 2010-2022. 40
- Calvanese, L. ; Sandomenico, A. ; Caporale, A. ; Foca, A. ; Foca, G. ; D'Auria, G. ; Falcigno, L. ; Ruvo, M. Conformational features and binding affinities to Cripto, ALK7 and ALK4 of Nodal synthetic fragments. *J. Pept. Sci.* 2015, 21, 283-293.
- De Luca, A. ; Lamura, L. ; Strizz, L. ; Rom 50

- a, C.; D'Antonio, A.; Margaryan, N.; Pirozzi, G.; Hsu, M.Y.; Botti, G.; Mari E.; et al. Normanno N. Expression and functional role of CRIPTO-1 in cutaneous melanoma. *Br. J. Cancer* 2011, 105, 1030-1038.
- Strizzi, L.; Margaryan, N.V.; Gilgur, A.; Hardy, K.M.; Normanno, N.; Salomon, D.S.; Hendrix, M.J. The significance of a Cripto-1 positive subpopulation of human melanoma cells exhibiting stem cell-like characteristics. *Cell Cycle*. 2013, 12, 1450-1456. 10
- Quail, D.F.; Zhang, G.; Findlay, S.D.; Hess, D.A.; Postovit, L.M. Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Oncogene* 2014, 33, 461-473.
- Kirsammer, G.; Strizzi, L.; Margaryan, N.V.; Gilgur, A.; Hyser, M.; Atkinson, J.; Kirschmann, D.A.; Seftor, E.A.; Hendrix, M.J. Nodal signaling promotes a tumorigenic phenotype in human breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2014, 29, 40-50. 20
- Karimkhani, C.; Gonzalez, R.; Dellavalle, R.P. A review of novel therapies for melanoma. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2014, 15, 323-337.
- Hao, M.; Song, F.; Du, X.; Wang, G.; Yang, Y.; Chen, K.; Yang, J. Advances in targeted therapy for unresectable melanoma: New drugs and combinations. *Cancer Lett.* 2015, 359, 1-8. 30
- Spagnolo, F.; Ghiorzo, P.; Orgiano, L.; Pastorino, L.; Picasso, V.; Tornari, E.; Ottaviano, V.; Queirolo, P. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther.* 2015, 8, 157-168.
- Eggermont, A.M.; Kirkwood, J.M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? *Eur. J. Cancer* 2004, 12, 1825-1836. 40
- Sullivan, R.J.; Flaherty, K.T. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur. J. Cancer* 2013, 49, 1297-1304.
- Calvanese, L.; Marasco, D.; Doti, N.; Saparito, A.; D'Auria, G.; Paolillo, L.; Ruvo, M.; Falcigno, L. Structural investi 50

- gations on the Nodal-Cripto binding: A theoretical and experimental approach. *Biopolymers* 2010, 93, 1011-1021.
- Saporito, A. Chemical synthesis of proteins for biotechnology applications. PhD Thesis, University of Naples "Federico II", 2005.
- de Caestecker, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15, 1-11. 10
- Wilson, D.S.; Wu, J.; Peluso, P.; Nock, S. Improved method for pepsinolysis of mouse IgG(1) molecules to F(ab')(2) fragments. *J. Immunol. Methods* 2002, 260, 29-36.
- Yamaguchi, Y.; Kim, H.; Kato, K.; Masuda, K.; Shimada, I.; Arata, Y. Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. *J. Immunol. Methods* 1995, 181, 259-267. 20
- Sondermann, P.; Huber, R.; Oosthuizen, V.; Jacob, U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gamma RIII complex. *Nature* 2000, 406, 267-273.
- Fields, G.B.; Noble, R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9 fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, 35, 161-214. 30
- Carter, J.M. Techniques for conjugation of synthetic peptides to carrier molecules. *Methods Mol. Biol.* 1994, 36, 155-191.
- Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254. 40
- Kohler, G.; Milstein, C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976, 6, 511-519.
- Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277. 50

- Malchenko, S.; Galat, V.; Seftor, E.A.; Vanin, E.F.; Costa, F.F.; Seftor, R.E.; Soares, M.B.; Hendrix, M.J. Cancer hallmarks in induced pluripotent cells: New insights. *J. Cell Physiol.* 2010, 225, 390-393.
- Aykul, S.; Ni, W.; Mutatu, W.; Martinez-Hackert, E. Human Cerberus prevents nodal-receptor binding, inhibits nodal signaling, and suppresses nodal-mediated phenotypes. *PLoS ONE* 2015, 10, e0114954. 10
- Song X, Zhao Z, Barber B, Farr AM, Ivanov B and Novich M. Overall survival in patients with metastatic melanoma. *Curr Med Res Opin.* 2015; 31(5):987-991.
- Gogas HJ, Kirkwood JM and Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer.* 2007; 109(3):455-464.
- Han SF, Liu P, Zhang W, Bu L, Shen M, Li H, Fan YH, Cheng K, Cheng HX, Li CX and Jia GL. The opposite-direction modulation of CD4+CD25+ Tregs and T helper 1 cells in acute coronary syndromes. *Clin Immunol.* 2007; 124(1):90-97. 20
- Coit DG, Thompson JA, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE, 3rd, Daniels GA, Daud A, Dimairo D, Fleming MD, Gonzalez R, Guild V, Halpern AC, et al. Melanoma, version 4.2014. *J Natl Compr Canc Netw.* 2014; 12(5):621-629. 30
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363(8):711-723.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26):2507-2516. 40
- Ascierto PA, Minor D, Ribas A, Lebbe C, O'Hagan A, Arya N, Guckert M, Schadendorf D, Kefford RF, Grob JJ, Hamid O, Amara vadi R, Simeone E, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafen 50

nib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2013; 31(26):3205-3211.

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2012; 367(2):107-114.

10

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366(26):2443-2454.

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*. 2015; 372(1):30-39.

20

Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlini MS, Hyman J, Shahheydari H, Tembe V, Thompson JF, Saw RP, Howle J, Hayward NK, Johansson P, et al. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun*. 2014; 5:5694.

30

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015.

40

Klinac D, Gray ES, Millward M and Ziman M. Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring. *Front Oncol*. 2013; 3:54.

Roesch A. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. *Oncogene*. 2015; 34(23):2951-2957.

Ascierto PA. Immunotherapies and novel c

50

ombinations: the focus of advances in the treatment of melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64(3):271-274.

Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT and Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(5):1136-1144.

Strizzi L, Hardy K, Seftor E, Costa F, Kirschmann D, Seftor R, Postovit L and Hendrix M. Development and cancer: at the crossroads of Nodal and Notch signaling. *Cancer Res.* 2009; 69:7131 - 7134. 10

Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development.* 2007; 134(6):1023-1034.

Costa FF, Seftor EA, Bischof JM, Kirschmann DA, Strizzi L, Arndt K, Bonaldo Mde F, Soares MB, Hendrix MJ. Epigenetically reprogramming metastatic tumor cells with an embryonic microenvironment. *Epigenomics.* 2009;1(2):387-98. 20

Strizzi L, Hardy KM, Kirsammer GT, Gerami P and Hendrix MJ. Embryonic signaling in melanoma: potential for diagnosis and therapy. *Lab Invest.* 2011; 91(6):819-824.

Strizzi L, Hardy K, Margaryan N, Hillman D, Seftor E, Chen B, Geiger X, Thompson E, Lingle W, Andorfer C, Perez E and Hendrix M. Potential for the embryonic morphogen Nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2012; 14(3):R75. 30

Lawrence M, Margaryan N, Loessner D, Collins A, Kerr K, Turner M, Seftor E, Stephens C, Lai J, BioResource A, Postovit L, Clements J and Hendrix M. Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells. *Prostate.* 2011; 71:1198 - 1209. 40

Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Kirschmann DA, Lipavsky A, Wheaton WW, Abbott DE, Seftor RE and Hendrix MJ. Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(11):4329-4334. 50

- Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, Lipavsky A, Gadiot J, Blank C, Seftor RE, Seftor EA and Hendrix MJ. Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert Rev Dermatol*. 2009; 4(1): 67-78.
- Kirsammer G, Strizzi L, Margaryan NV, Gligur A, Hyser M, Atkinson J, Kirschmann DA, Seftor EA and Hendrix MJ. Nodal signaling promotes a tumorigenic phenotype in human breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014; 29:40-50. 10
- Hardy KM, Strizzi L, Margaryan NV, Gupta K, Murphy GF, Scolyer RA and Hendrix MJ. Targeting nodal in conjunction with dacarbazine induces synergistic anticancer effects in metastatic melanoma. *Mol Cancer Res*. 2015; 13(4):670-680.
- Foca A, Sanguigno L, Foca G, Strizzi L, Iannitti R, Palumbo R, Hendrix MJ, Leonardi A, Ruvo M, Sandomenico A. New anti-Nodal monoclonal antibodies targeting the Nodal pre-helix loop involved in Cripto-1 binding. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 21342-21362. 20
- Calvanese L, Sandomenico A, Caporale A, Foca A, Foca G, D'Auria G, Falcigno L and Ruvo M. Conformational features and binding affinities to Cripto, ALK7 and ALK4 of Nodal synthetic fragments. *J Pept Sci*. 2015; 21(4):283-293. 30
- Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, Nickoloff BJ, Topczewski J and Hendrix MJ. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nature Med*. 2006; 12(8):925-932.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS and Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999; 155(3):739-752. 40
- Lo JA and Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*. 2014; 346(6212):945-949.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST 50

- , Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012; 150(2):251-263.
- Murphy GF, Wilson BJ, Girouard SD, Frank NY and Frank MH. Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Mol Aspects Med*. 2014; 39:33-49.
- Vallier L, Reynolds D and Pedersen RA. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol*. 2004; 275(2):403-421. 10
- Li FZ, Dhillon AS, Anderson RL, McArthur G and Ferrao PT. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol*. 2015; 5:31.
- Quail DF, Zhang G, Findlay SD, Hess DA and Postovit LM. Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Oncogene*. 2014; 33(4):461-473. 20
- Huang S, Holzel M, Knijnenburg T, Schlicker A, Roepman P, McDermott U, Garnett M, Grerum W, Sun C, Prahallad A, Groenendijk FH, Mittempergher L, Nijkamp W, et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF-beta receptor signaling. *Cell*. 2012; 151(5):937-950. 30
- Khalkhali-Ellis Z, Kirschmann DA, Seftor EA, Gilgur A, Bodenstine TM, Hinck AP and Hendrix MJ. Divergence(s) in nodal signaling between aggressive melanoma and embryonic stem cells. *Int J Cancer*. 2015; 136(5):E242-251.
- Calvanese L, Marasco D, Doti N, Saporito A, D'Auria G, Paolillo L, Ruvo M and Falcigno L. Structural investigations on the Nodal-Cripto binding: a theoretical and experimental approach. *Biopolymers*. 2010; 93(11):1011-1021. 40
- Calvanese L, Falcigno L and D'Auria G. Essential dynamics analysis captures the concerted motion of the integrin-binding site in jerdostatin, an RTS disintegrin. *Biopolymers*. 2015; 103(3):158-166.
- Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, Roy S, Eggermont 50

AM, Routier E and Robert C. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol.* 2013; 24(6):1697-1703.

Johnsson B, Lofas S and Lindquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem.* 1991; 198(2):268-277.

10

Gaddameedhi S, Kemp MG, Reardon JT, Shields JM, Smith-Roe SL, Kaufmann WK and Sancar A. Similar nucleotide excision repair capacity in melanocytes and melanoma cells. *Cancer research.* 2010; 70(12):4922-4930.

Hardy KM, Kirschmann DA, Seftor EA, Margaryan NV, Postovit LM, Strizzi L and Hendrix MJ. Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.* 2010; 70(24):10340-10350.

20

Kozlowski JM, Hart IR, Fidler IJ and Hanna N. A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1984; 72(4):913-917.

30

Bodenstine TM, Seftor RE, Seftor EA, Khalikali-Ellis Z, Samii NA, Monarrez JC, Chandler GS, Pemberton PA and Hendrix MJ. Internalization by multiple endocytic pathways and lysosomal processing impact maspin-based therapeutics. *Mol Cancer Res.* 2014; 12(10):1480-1491.

Adkins HB, Bianco C, Schiffer SG, Rayhorn P, Zafari M, Cheung AE, Orozco O, Olson D, De Luca A, Chen LL, Miatkowski K, Benjamin C, Normanno N, et al. Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo. *J Clin Invest.* 2003; 112(4):575-87.

40

Yu L, Harms PW, Pouryazdanparast P, Kim DS, Ma L, Fullen DR. Expression of the embryonic morphogen Nodal in cutaneous melanocytic lesions. *Mod Pathol.* 2010; 23(9):1209-14.

50

Lee CC, Jan HJ, Lai JH, Ma HI, Hueng DY, Lee YC, Cheng YY, Liu LW, Wei HW, Lee HM. Nodal promotes growth and invasion in human gliomas. *Oncogene*. 2010; 29(21):3110-23.

Fu G, Peng C. Nodal enhances the activity of FoxO3a and its synergistic interaction with Smads to regulate cyclin G2 transcription in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2011; 30(37):3953-66.

Jamil S, Cedervall J, Hultman I, Ali R, Margaryan NV, Rasmuson A, Johnsen JI, Sveinbjornsson B, Dalianis T, Kanter L, Orrego A, Strizzi L, Hendrix MJ, et al. Neuroblastoma cells injected into experimental mature teratoma reveal a tropism for embryonic loose mesenchyme. *Int J Oncol*. 2013; 43(3):831-8.

Duan W, Li R, Ma J, Lei J, Xu Q, Jiang Z, Nan L, Li X, Wang Z, Huo X, Han L, Wu Z, Wu E, et al. Overexpression of Nodal induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer cells via the Smad2/3 pathway. *Oncotarget*. 2015; 6(3):1490-506.

Kong B, Wang W, Esposito I, Friess H, Michalski CW, Kleeff J. Increased expression of Nodal correlates with reduced patient survival in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2015; 15(2):156-61.

【0258】

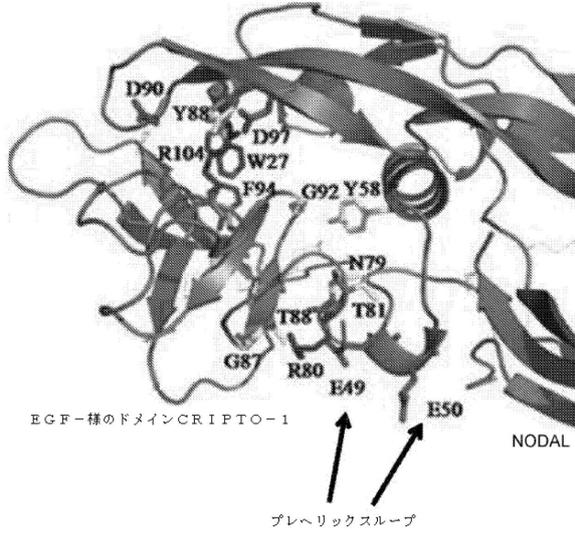
本出願で言及されている出版物及び特許はすべて参照によって本明細書に組み入れられる。本発明の記載されている方法及び組成物の種々の改変及び変化は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく当業者に明らかであろう。本発明は特定の好まれる実施形態と併せて記載されてきたが、請求されているような本発明はそのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、関連分野の当業者に明らかである本発明を実施するための記載されている形態の種々の改変は以下のクレームの範囲内にあるように意図される。

10

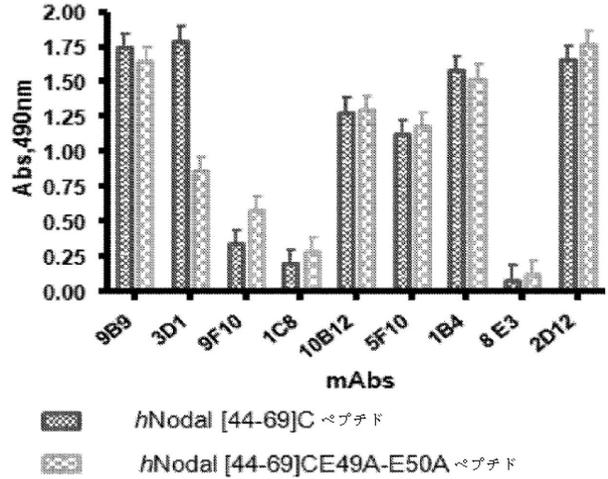
20

30

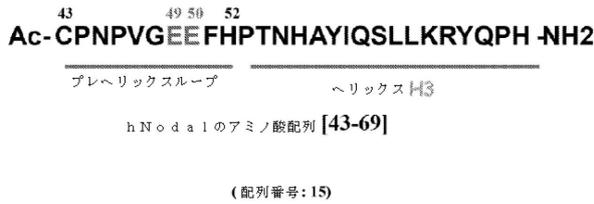
【図1】



【図3】



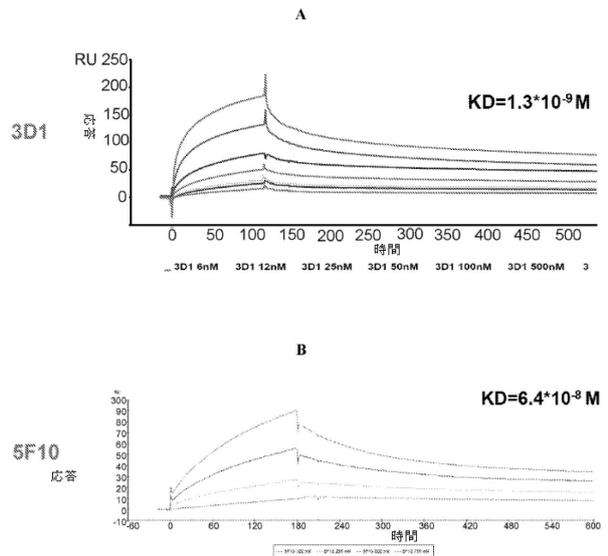
【図2】



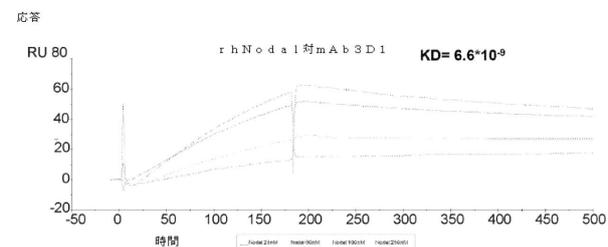
【図4】

mAbs 100 nM	r h N o d a l への結合
1B4	なし
9B9	なし
2D12	なし
10B12	なし
3D1	あり
5F10	あり

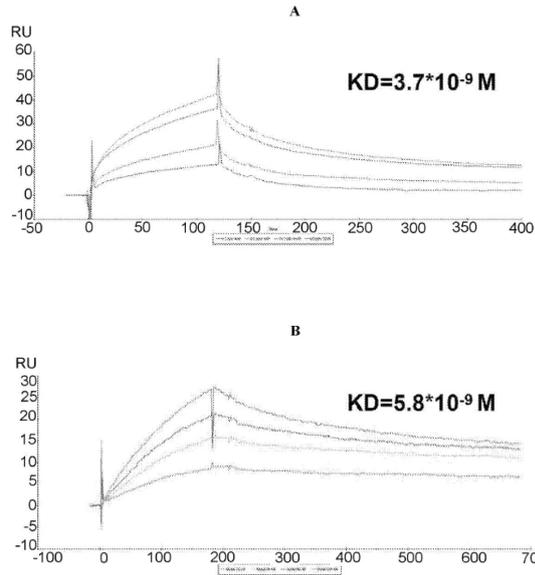
【図5】



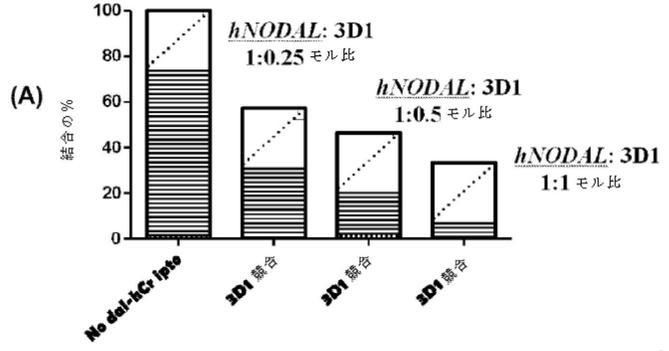
【図6】



【 図 7 】



【 図 8 】



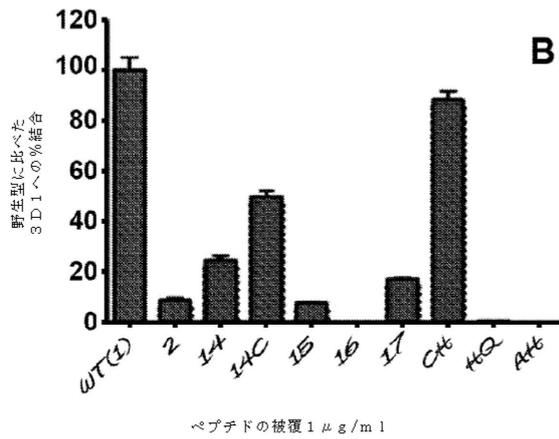
【 図 9 - 1 】

(B)

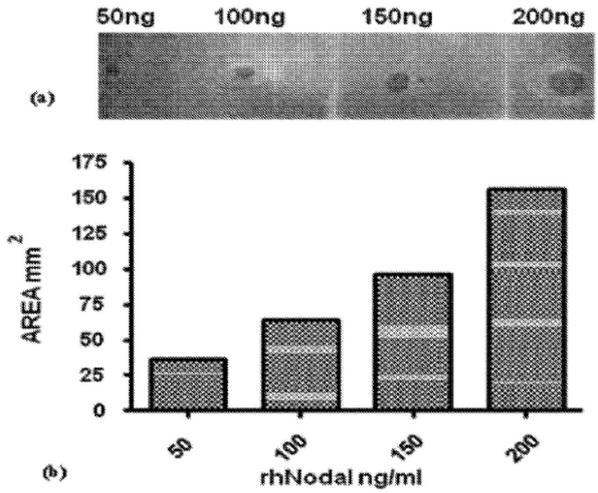
ペプチド番号	ペプチド名	配列
配列番号:15	WT(1)	43-69 CPNPVGGEPHPINRHYIQSLRKRYQPH
配列番号:16	2	43-69 EE-AA CPNPVGAAPHPINRHYIQSLRKRYQPH
配列番号:17	14	44-67 PNPVGGEPHPINRHYIQSLRKRYQ
配列番号:18	14C	43-67 CPNPVGGEPHPINRHYIQSLRKRYQ
配列番号:19	15	44-67 EE-AA PNPVGAAPHPINRHYIQSLRKRYQ
配列番号:20	16	44-67 PV-AA PNAAGEFHPINRHYIQSLRKRYQ
配列番号:21	17	44-67 Y-A PNPVGGEPHPINRHYIQSLRKRYQ
配列番号:22	CH	CH [43-56] CPNPVGGEPHPINR
配列番号:23	HQ	HQ [52-60] RHPINRHYIQ
配列番号:24	AH	AH [56-69] ATIQSLRKRYQPH

A

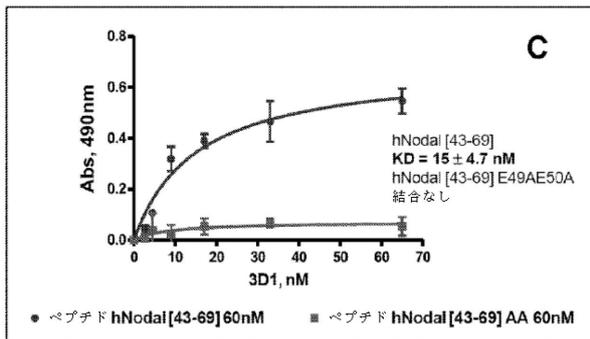
【 図 9 - 2 】



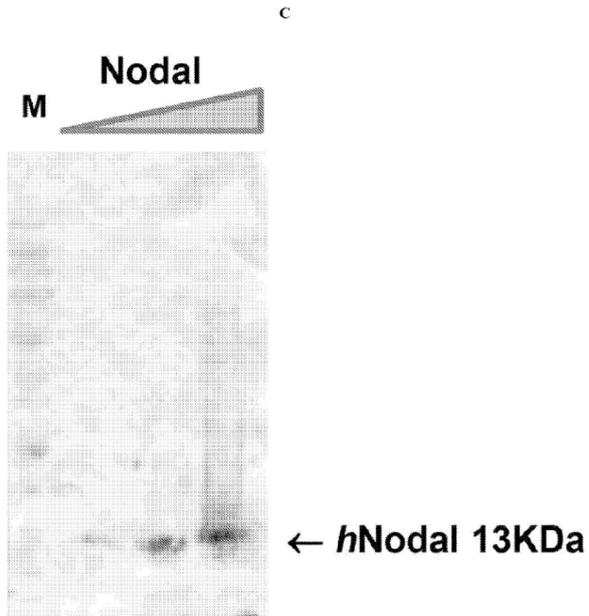
【 図 10 - 1 】



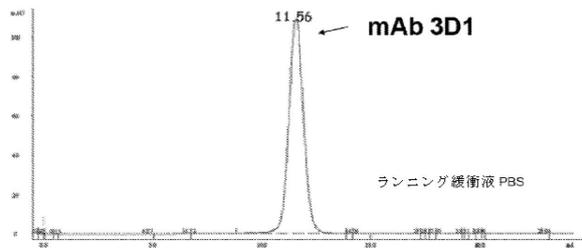
【 図 9 - 3 】



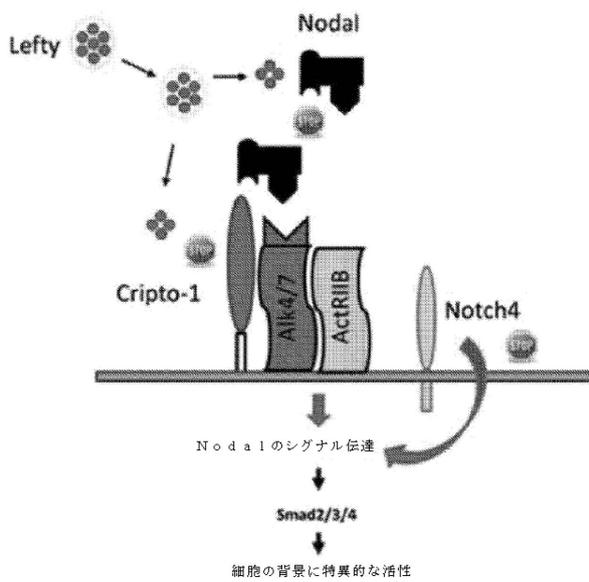
【 図 1 0 - 2 】



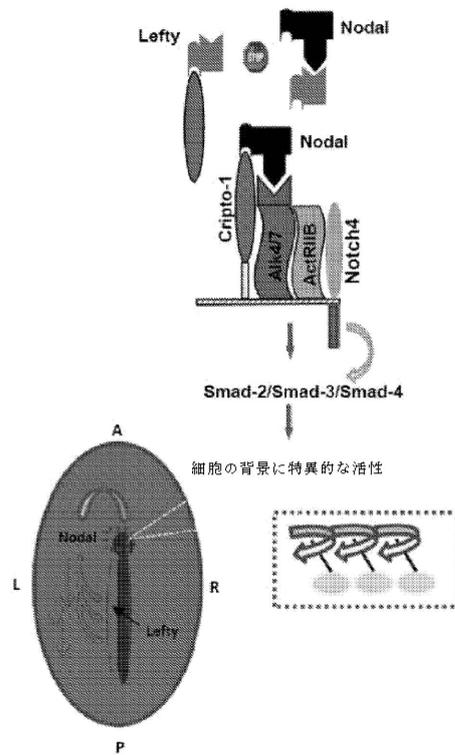
【 図 1 1 】



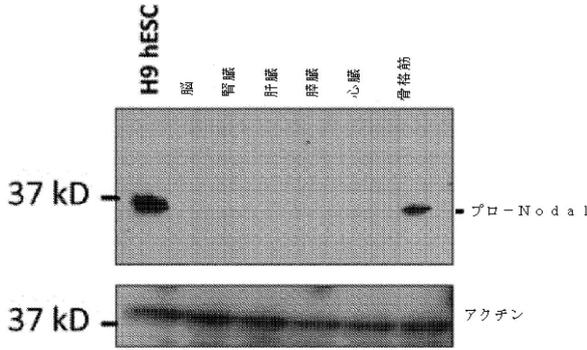
【 図 1 2 】



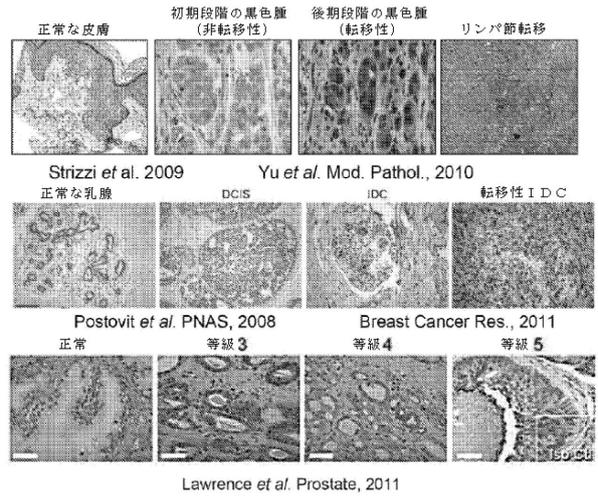
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



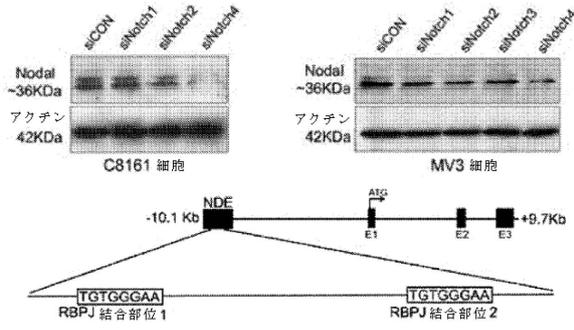
【 図 1 5 】



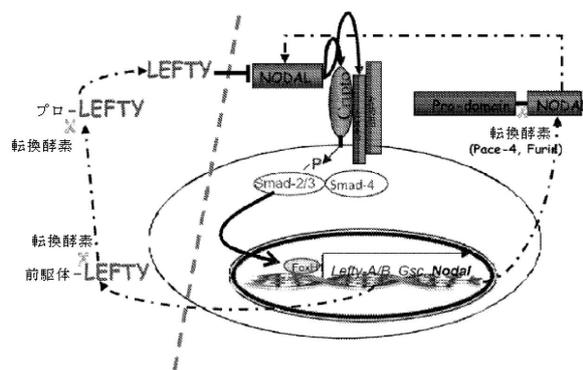
【 図 1 6 】



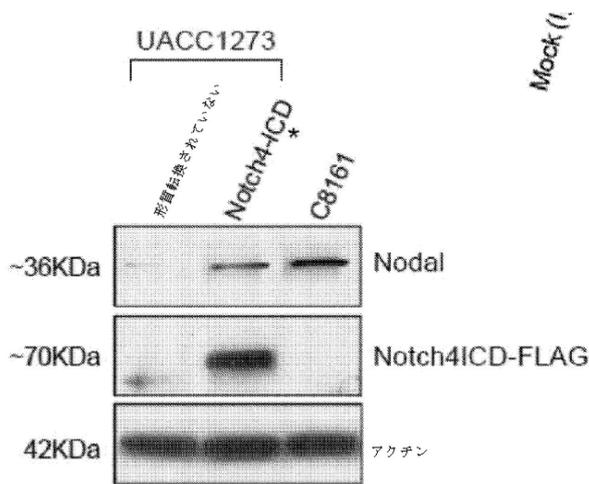
【 図 1 8 】



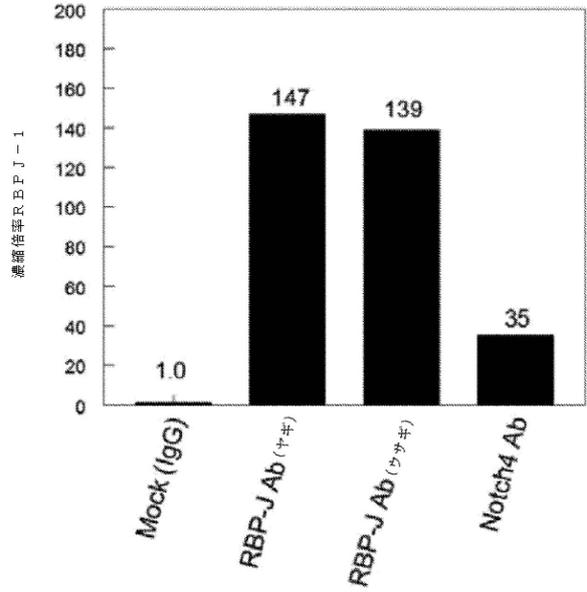
【 図 1 7 】



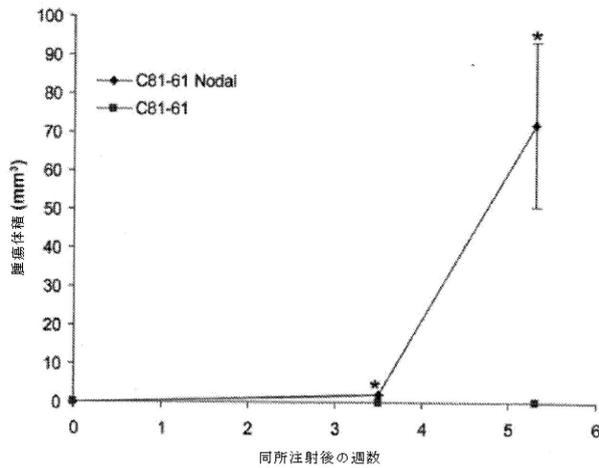
【 図 1 9 】



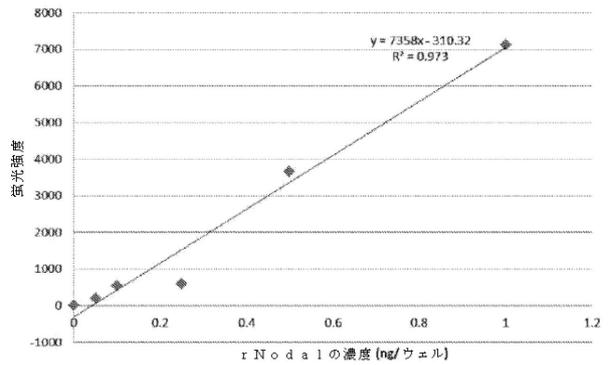
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



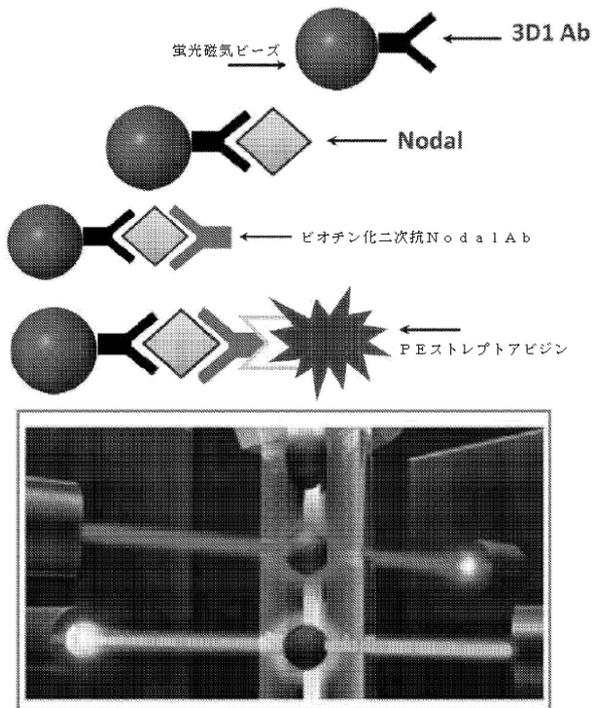
【 図 2 3 - 1 】

- カルボジミド化学反応による抗Nodal 3D1 (捕捉Ab)の蛍光色素を付けた磁気ビーズへのカップリング
- 血清/血漿試料とのインキュベート及び未結合の洗い流し
- ビオチン化抗Nodal (検出Ab)とのインキュベート
- フィコエリスリン (PE) 蛍光レポーターを結合したストレプトアビジンによる検出
- Bioplexリーダーを使用することによって、赤色 (635 nm) レーザーがその定量的特定を可能にするビーズの蛍光色素を励起する。緑色 (532 nm) レーザーは正確で感度の良い検体の定量のためのPEを励起する。

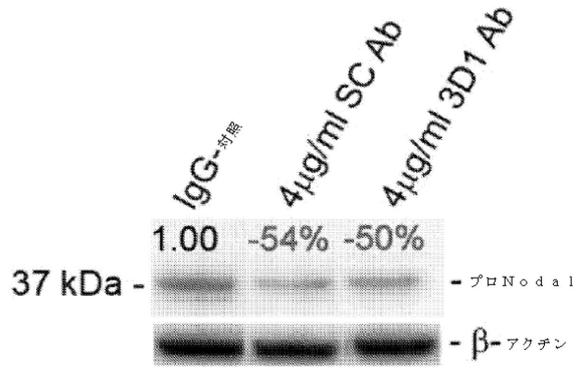


二次抗Nodal抗体はすでに特定されている。このアプローチはNaplesにおける研究室で調べられている。アプローチはpg/mLレベルでNodalの感度の良い検出を可能にするはずである。

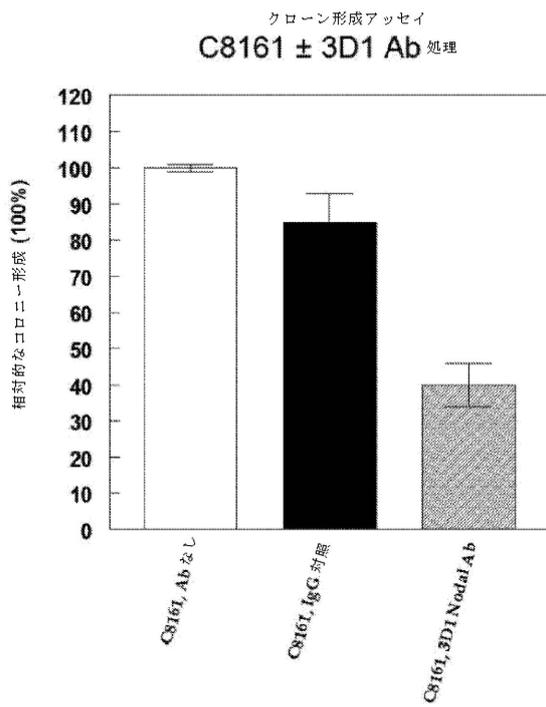
【 図 2 3 - 2 】



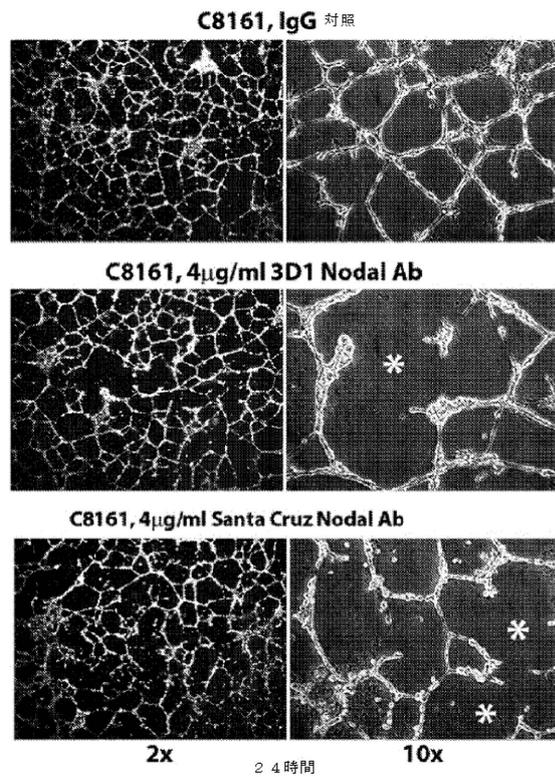
【 図 2 4 - 1 】



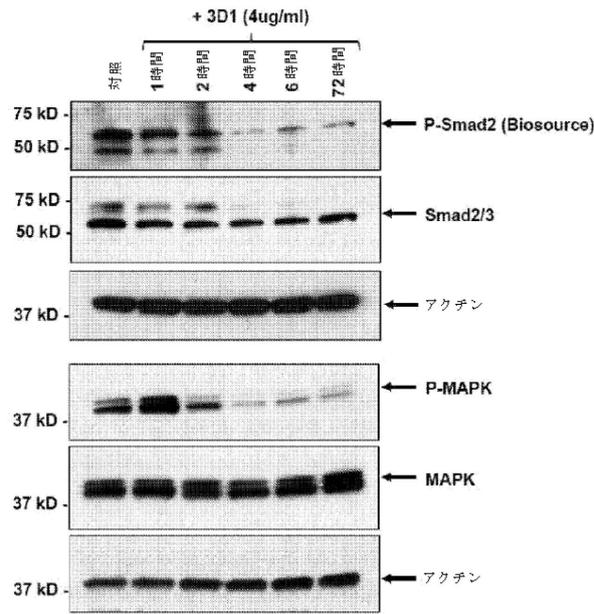
【 図 2 4 - 2 】



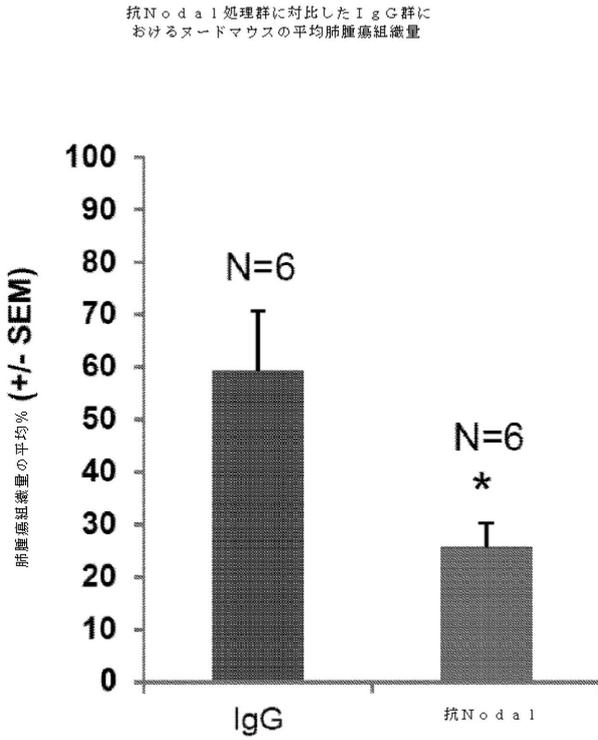
【 図 2 4 - 3 】



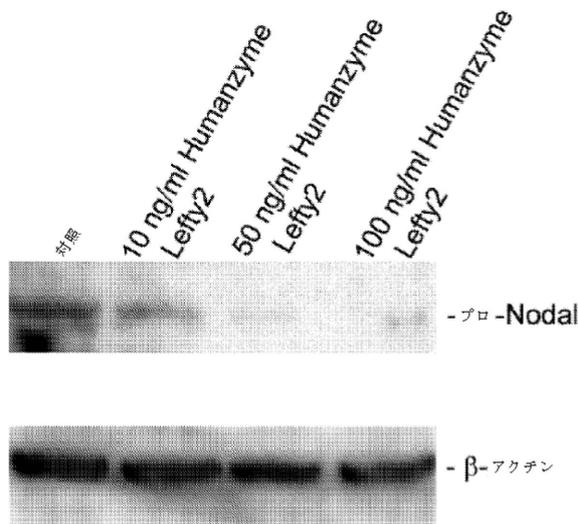
【 図 2 5 】



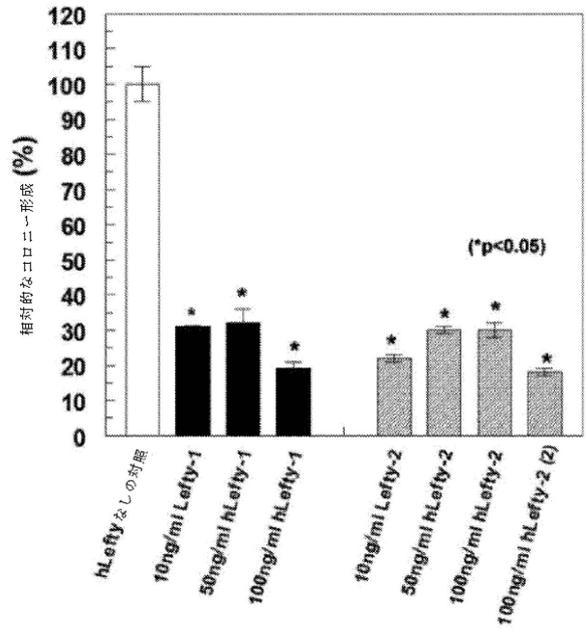
【 図 2 6 】



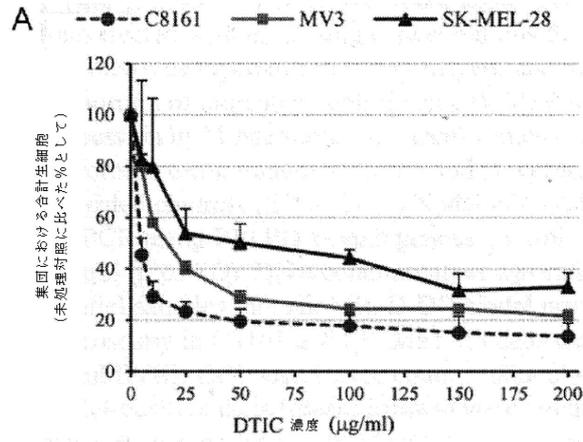
【 図 2 7 】



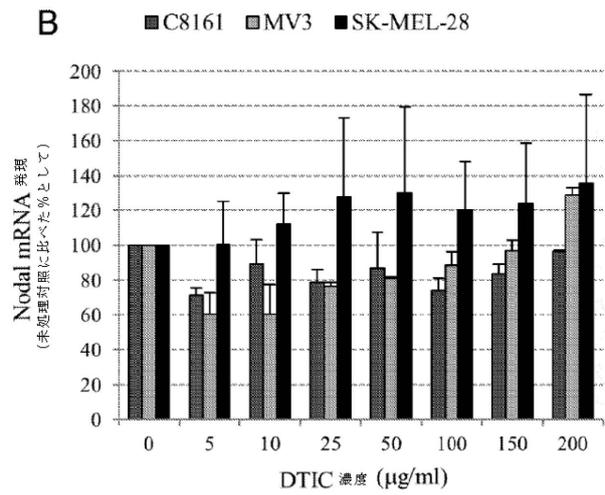
【 図 2 8 】



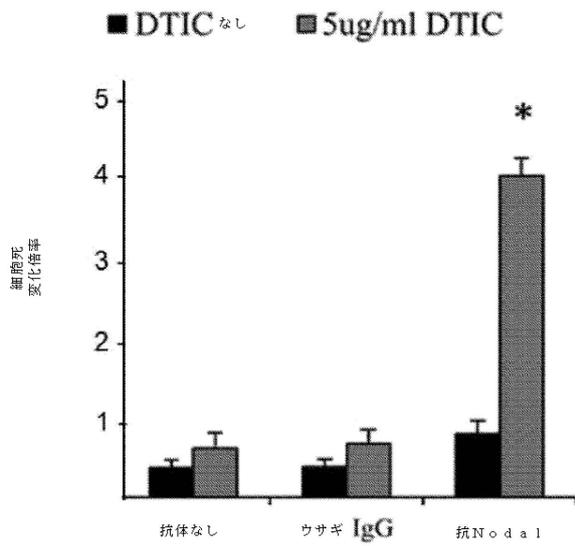
【 図 29 - 1 】



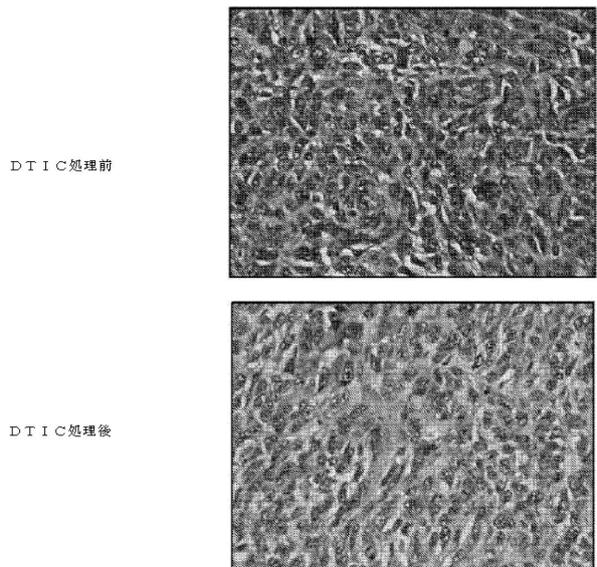
【 図 29 - 2 】



【 図 30 】

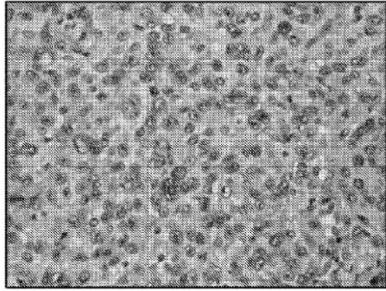


【 図 31 - 1 】

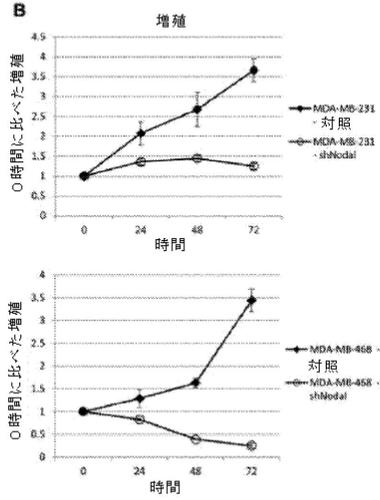
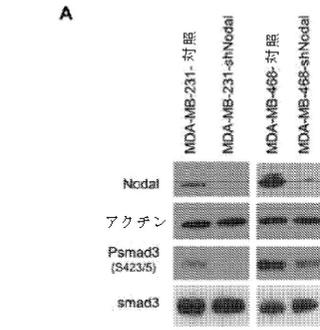


【図 3 1 - 2】

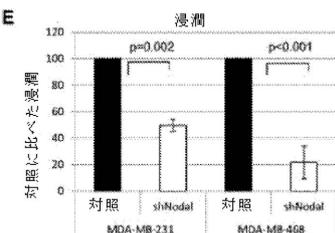
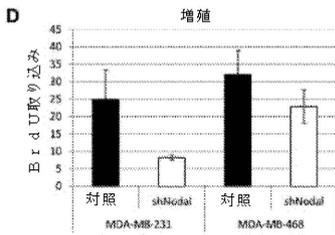
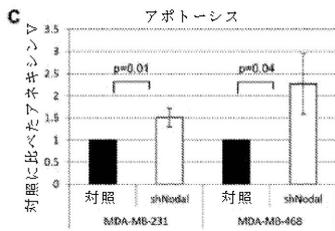
I g G 対照



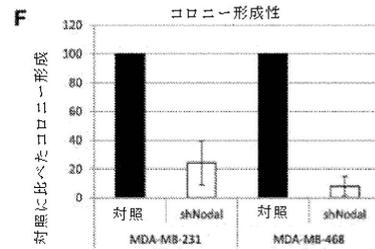
【図 3 2 - 1】



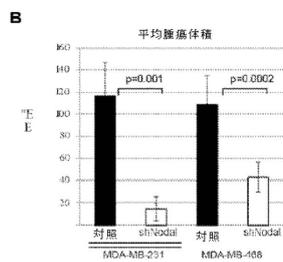
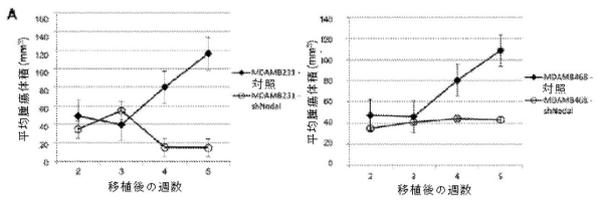
【図 3 2 - 2】



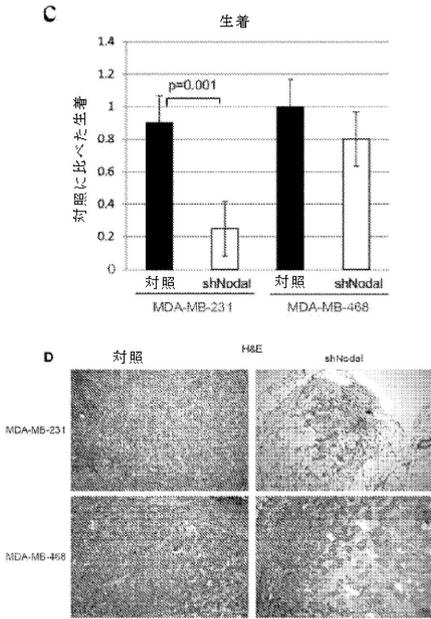
【図 3 2 - 3】



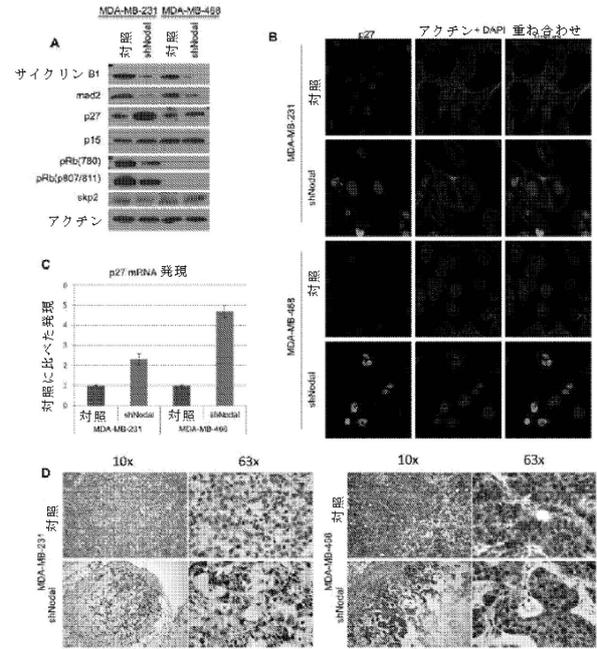
【図 3 3 - 1】



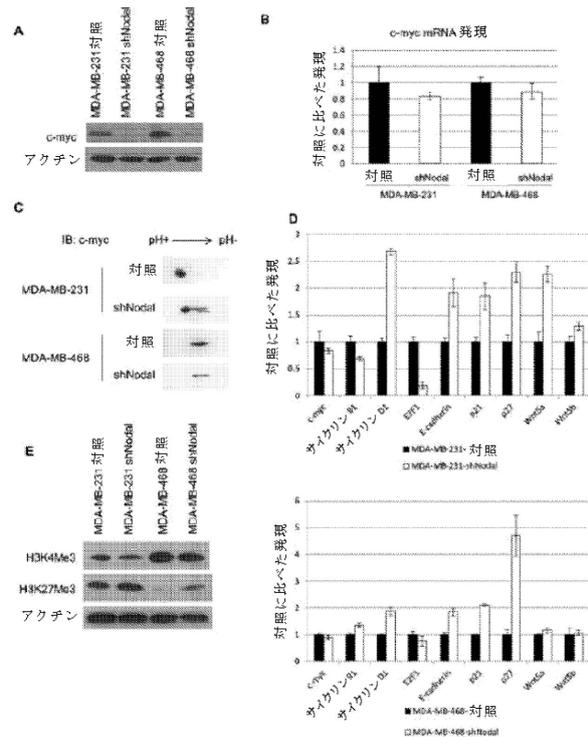
【 図 3 3 - 2 】



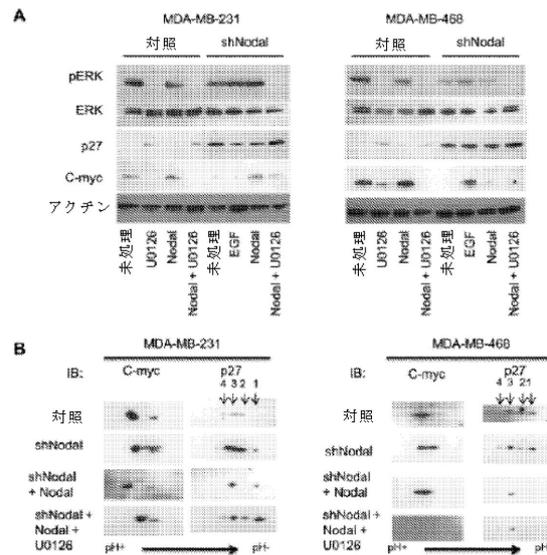
【 図 3 4 】



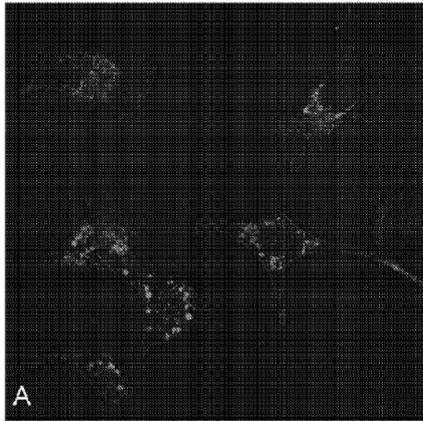
【 図 3 5 】



【 図 3 6 - 1 】

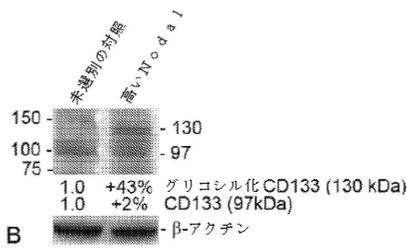


【 図 4 1 - 1 】

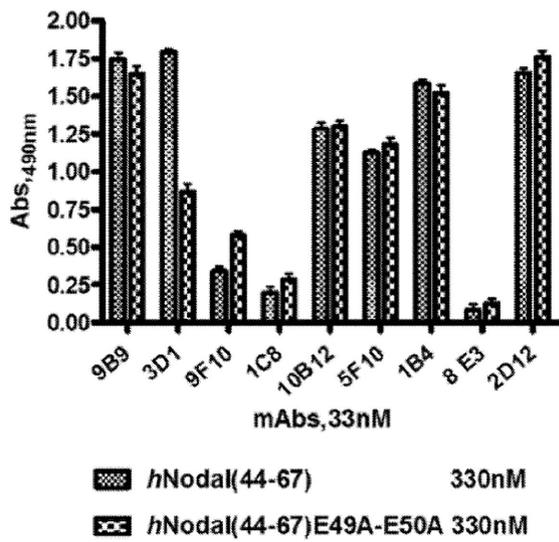


Cy3-Nodal (緑色)
CD133 (赤色)

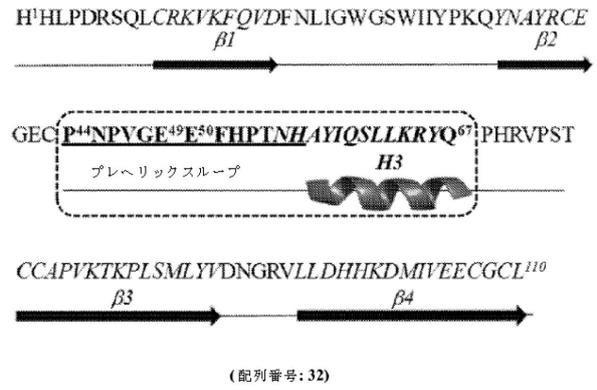
【 図 4 1 - 2 】



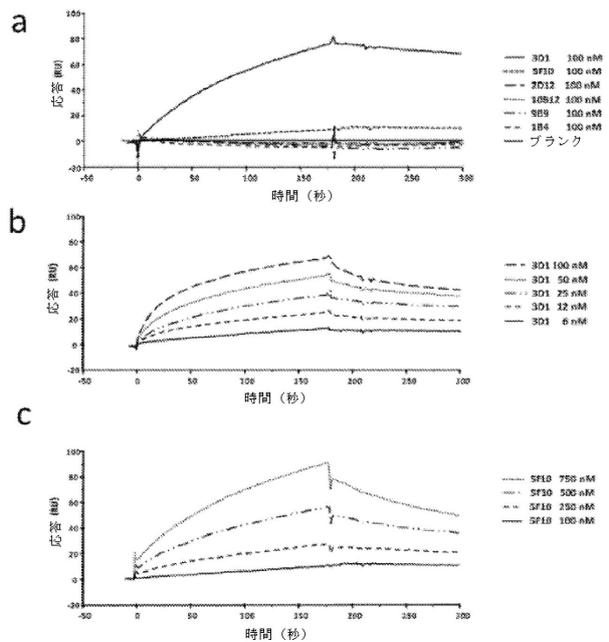
【 図 4 3 】



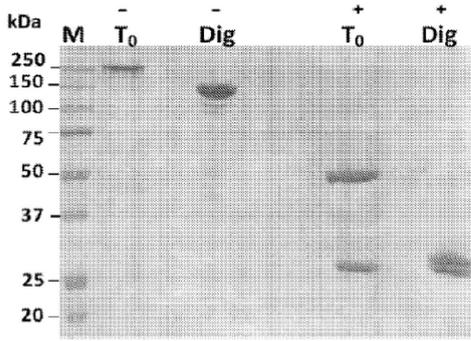
【 図 4 2 】



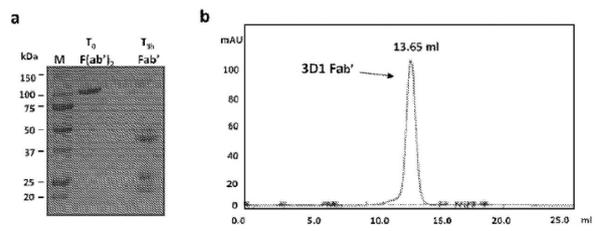
【 図 4 4 】



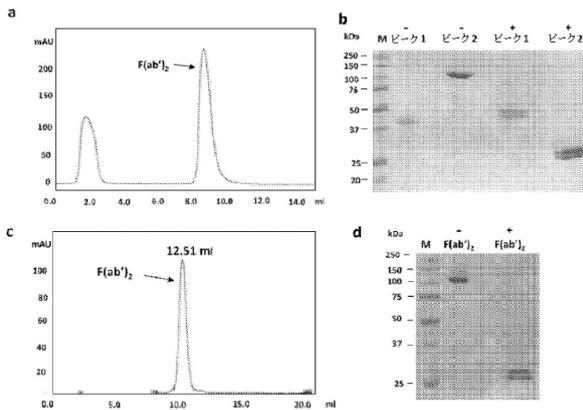
【 図 4 5 】



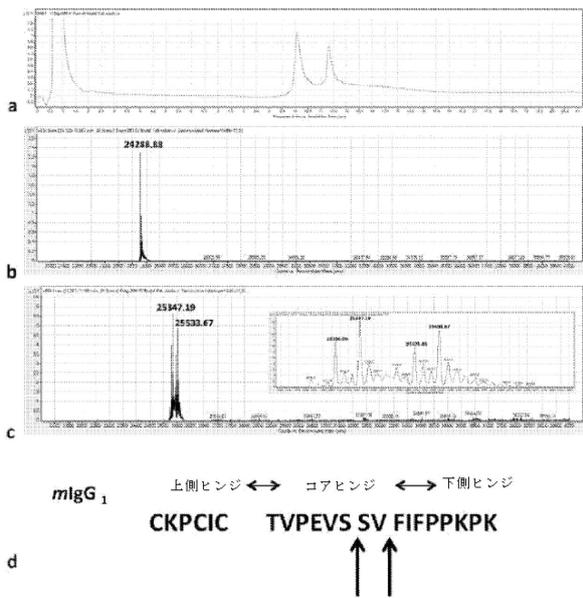
【 図 4 7 】



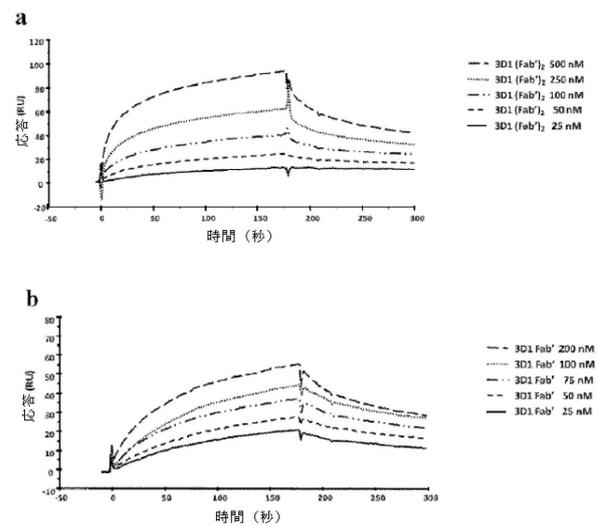
【 図 4 6 】



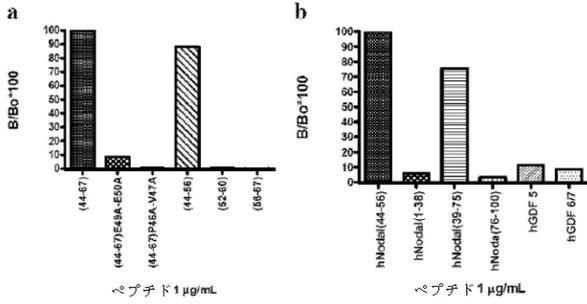
【 図 4 8 】



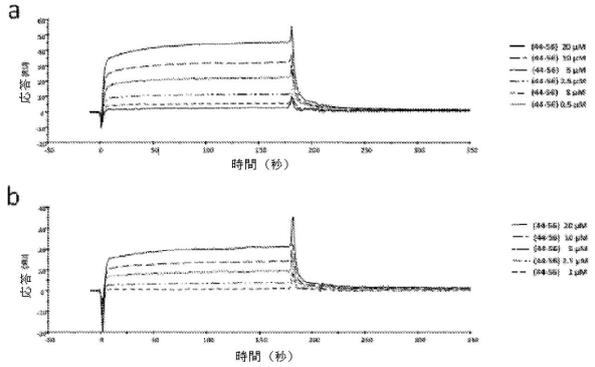
【 図 4 9 】



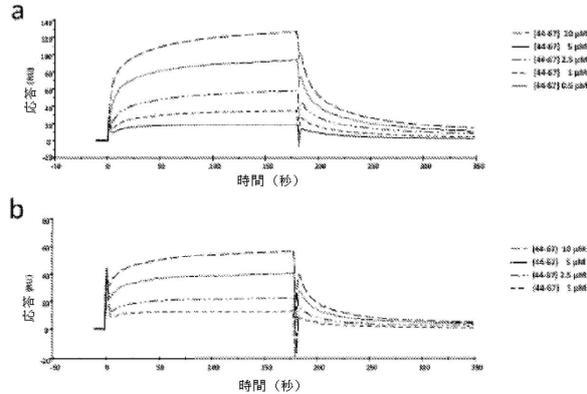
【 5 0 】



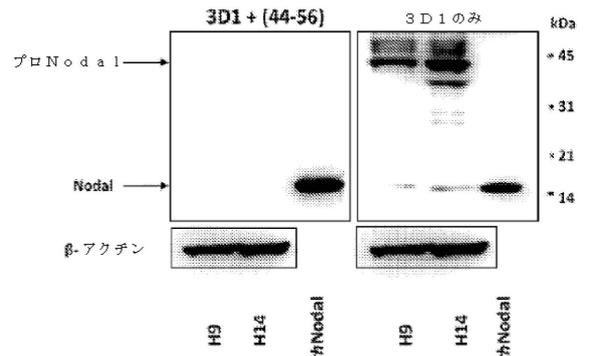
【 5 2 】



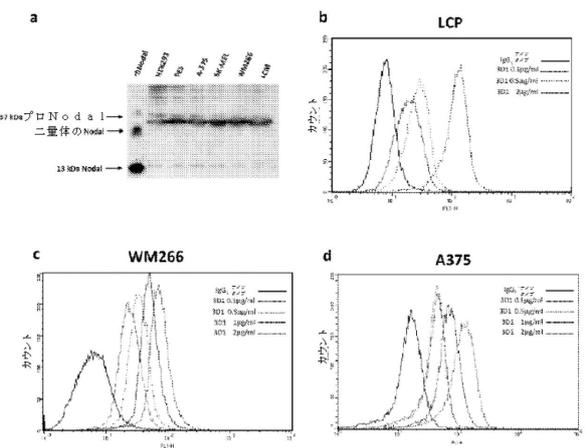
【 5 1 】



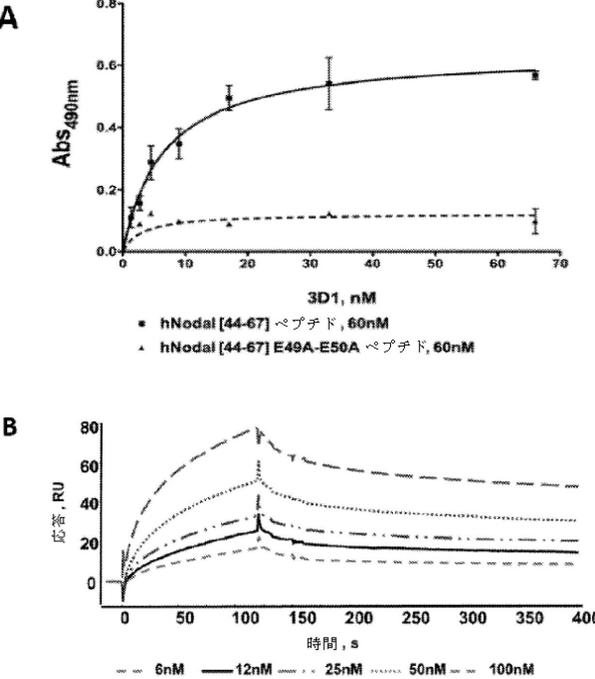
【 5 3 】



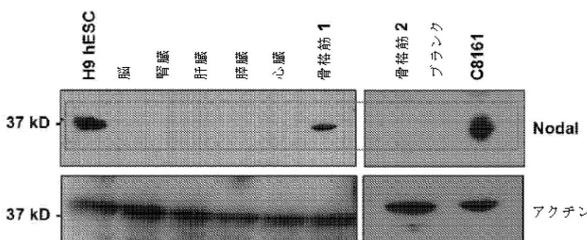
【 5 4 】



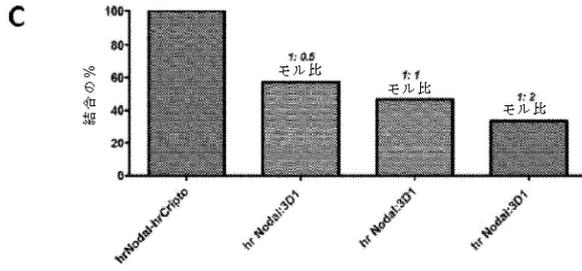
【 5 6 - 1 】



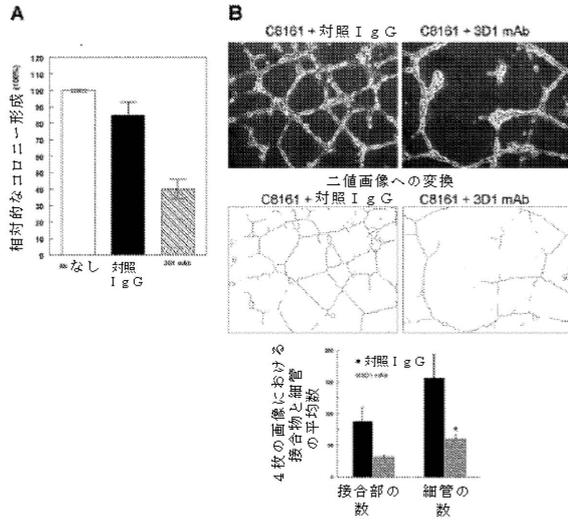
【 5 5 】



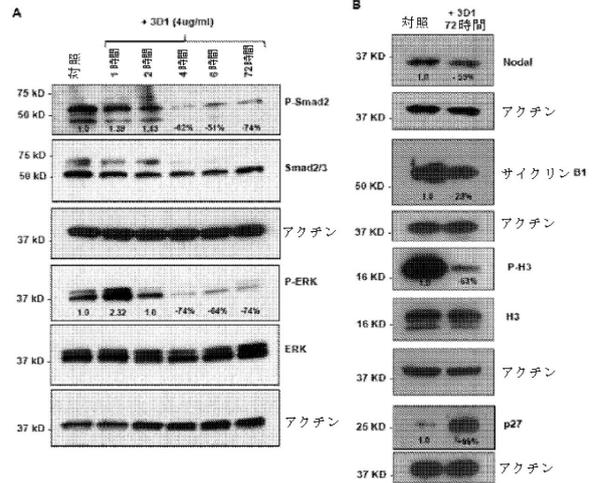
【 図 5 6 - 2 】



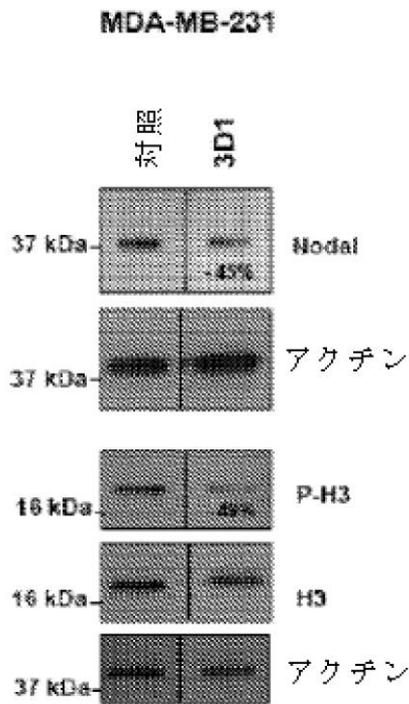
【 図 5 7 】



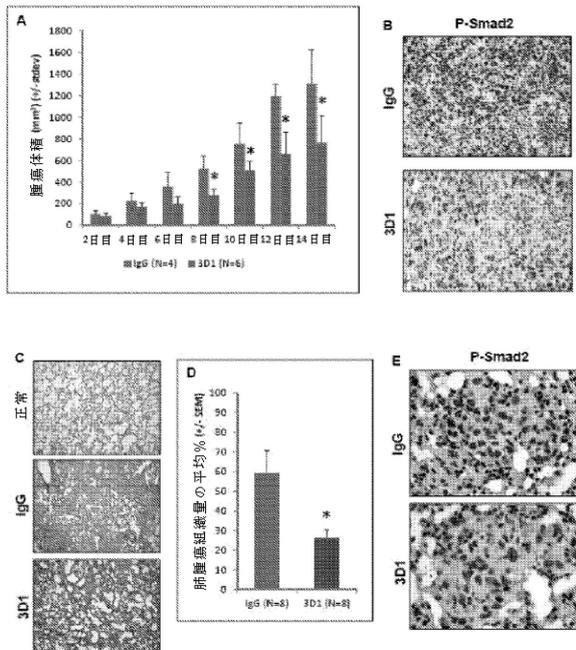
【 図 5 8 】



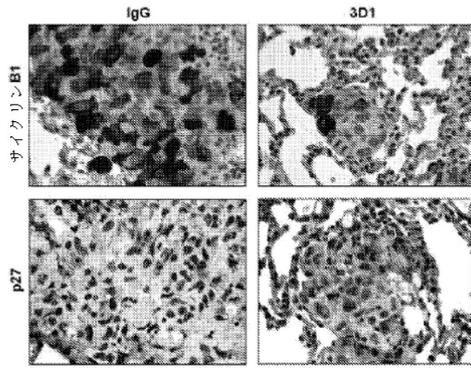
【 図 5 9 】



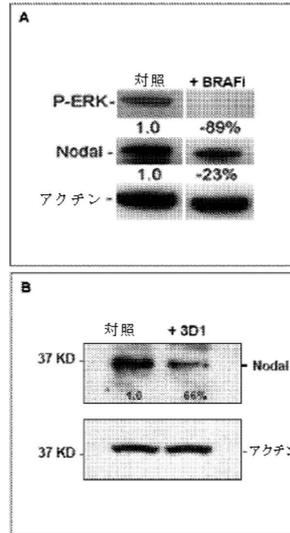
【 図 6 0 】



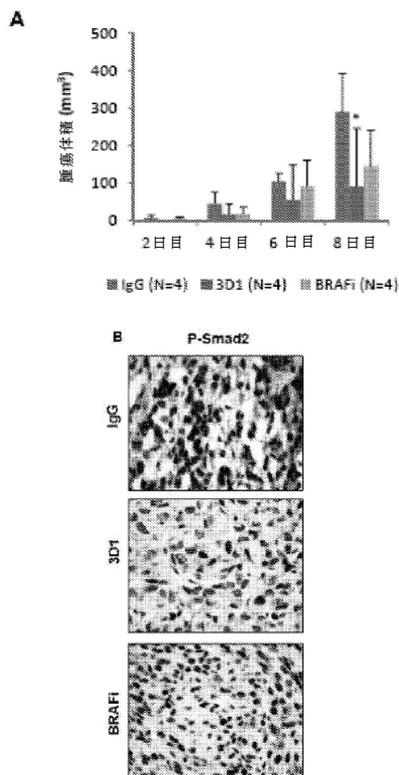
【 図 6 1 】



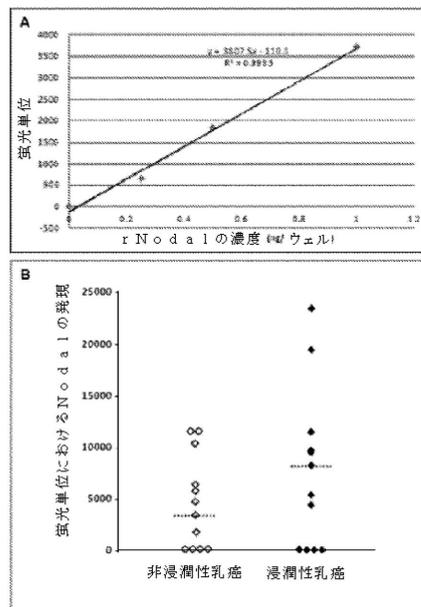
【 図 6 2 】



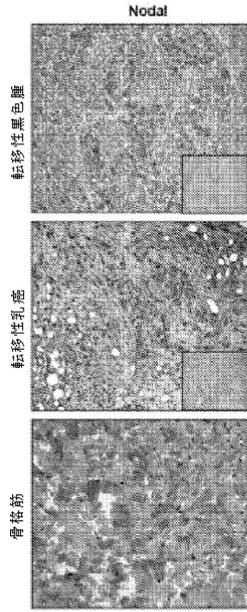
【 図 6 3 】



【 図 6 4 】



【 6 5 】



【 配列表 】

0006574257000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 4 1 B
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 4 5
C 1 2 N	15/19 (2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 7 5
		C 1 2 P	21/08
		C 1 2 N	15/19

(73)特許権者 517123564

サンドメニコ, アナマリーア

イタリア国 イー - 8 0 1 3 7 ナポリ, ヴィーア エメ. エル. キング 8

(73)特許権者 517123586

レオナルディ, アントニオ

イタリア国 イー - 8 0 1 2 8 ナポリ, ヴィーア ジーノ ドリア 1 1 3

(73)特許権者 517123601

サンギーニョ, ルーカ

イタリア国 イー - 8 0 0 5 5 ナポリ, ボルティーチ, ヴィーア リベルタ 3 7

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ルーヴォ, メノッティ

イタリア国 イー - 8 1 0 2 0 カゼルタ, サン ニコラ ラ ストラダ, ヴィーア フェ
デリコ フェリーニ 1 1

(72)発明者 サンドメニコ, アナマリーア

イタリア国 イー - 8 0 1 3 7 ナポリ, ヴィーア エメ. エル. キング 8

(72)発明者 レオナルディ, アントニオ

イタリア国 イー - 8 0 1 2 8 ナポリ, ヴィーア ジーノ ドリア 1 1 3

(72)発明者 サンギーニョ, ルーカ

イタリア国 イー - 8 0 0 5 5 ナポリ, ボルティーチ, ヴィーア リベルタ 3 7

(72)発明者 ヘンドリックス, メアリー ジェイ.シー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 1 1, シカゴ, イー. シカゴ アベニュー 2 2 5,
ナンバー 2 0 5

(72)発明者 セフター, エリザベス エー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 1 1, シカゴ, イー. シカゴ アベニュー 2 2 5,
ナンバー 2 0 5

(72)発明者 セフター, リチャード イー.ピー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 1 1, シカゴ, イー. シカゴ アベニュー 2 2 5,
ナンバー 2 0 5

- (72)発明者 ストリッツィ, ルイーヂ
アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, イー. シカゴ アベニュー 225,
ナンバー 205
- (72)発明者 ハルハリ-エリス, ジーラ
アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, イー. シカゴ アベニュー 225,
ナンバー 205

審査官 清野 千秋

- (56)参考文献 Luigi Strizzi et al., Breast Cancer Research, 2012年, Vol.14, No.3, p.1-12
Luigi Strizzi et al., Expert Rev Dermatol., 2009年, Vol.4, No.1, p.67-78

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46

C12N 15/09 - 15/90

REGISTRY(STN)

UniProt

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq