

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

C07K 16/00

C07K 16/18

C07K 16/30

C07K 16/46



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02812887.7

[43] 公开日 2005 年 4 月 13 日

[11] 公开号 CN 1606453A

[22] 申请日 2002.4.17 [21] 申请号 02812887.7

[30] 优先权

[32] 2001.4.26 [33] US [31] 60/286,782

[32] 2001.5.17 [33] US [31] 60/293,020

[32] 2001.6.26 [33] US [31] 60/301,091

[32] 2002.3.22 [33] US [31] 60/367,002

[86] 国际申请 PCT/US2002/011950 2002.4.17

[87] 国际公布 WO2002/088170 英 2002.11.7

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.26

[71] 申请人 比奥根公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 米歇尔·萨尼科拉-内德尔

凯文·威廉斯 苏珊·希弗

保罗·雷霍恩

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 26 页 序列表 3 页
附图 3 页

[54] 发明名称 CRIPTO 阻断抗体及其用途

[57] 摘要

本发明提供了 CripTo 阻断抗体,或其生物功能片段。本发明提供了可结合 CripTo 且能调控 CripTo 信号传导的抗体。本发明提供了可结合 CripTo 且能阻断 CripTo 和 ALK4 间相互作用的抗体。本发明提供了可结合 CripTo 且能调控肿瘤生长的抗体。本发明提供了可结合 CripTo,调控信号传导,且能调控肿瘤生长的抗体。本发明提供了可结合 CripTo,阻断 CripTo 和 ALK4 间相互作用,且能调控肿瘤生长的抗体。本发明还提供了使用这些抗体进行治疗、诊断和研究的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种特异性结合 Cripto 配体/受体结合结构域中的表位的抗体。
2. 权利要求 1 中的抗体, 其中所述的 Cripto 选自 SEQ ID NO: 1 或 2。
- 5 3. 权利要求 2 中的抗体, 其中所述的表位为 EGF-样结构域。
4. 权利要求 2 中的抗体, 其中所述的表位为富含 cys 的结构域。
5. 权利要求 2 中的抗体, 该抗体选自 A6C12.11, A6F8.6, A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5, A8H3.1, A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18, A27F6.1, A40G12.8, A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, 10 A17C12.28, A17G12.1, A17H6.1, A18B3.11, A19E2.7, B3F6.17, 和 B6G7.10。
6. 权利要求 3 中的抗体, 该抗体选自 A40G12.8, A8H3.1, A27F6.1, B6G7.10, A17G12.1 和 A18B3.11。
7. 权利要求 4 中的抗体, 该抗体选自 A19A10.30, A8G3.5, A6F8.6 和 A6C12.11。
- 15 8. 一种抗体, 它与 Cripto 第 46-62 位氨基酸残基所示结构域中的表位特异性结合。
9. 权利要求 8 中的抗体, 该抗体为 A10B2.18 和 B3F6.17。
10. 一种与表位特异性结合的抗体, 所述表位选自可被下列抗体结合的表位: A6C12.11, A6F8.6, A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5, A8H3.1, A8H3.2, 20 A19A10.30, A10B2.18, A27F6.1, A40G12.8, A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1, A17H6.1, A18B3.11, A19E2.7, B3F6.17, 和 B6G7.10。
11. 一种特异性结合 Cripto 且能调控 Cripto 信号传导的抗体。
12. 权利要求 11 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 的 EGF-样结构 25 域中的表位。
13. 权利要求 12 中的抗体, 该抗体选自 A40G12.8, A8H3.1 和 A27F6.1。
14. 权利要求 11 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 富含 cys 的结构域中的表位。
15. 权利要求 14 中的抗体, 该抗体为 A6C12.11。
- 30 16. 权利要求 11 中的抗体, 该抗体选自 A40G12.8, A8H3.1, A27F6.1, 和 A6C12.11。

17. 一种特异性结合 Cripto 且能调控肿瘤生长的抗体。
18. 权利要求 17 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 的 EGF-样结构域中的表位。
19. 权利要求 17 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 富含 cys 的结构域中的表位。
20. 权利要求 17 中的抗体, 该抗体选自 A27F6.1, A8G3.5 和 B6G7.10。
21. 一种能特异性结合 Cripto、调控 Cripto 信号传导且能调控肿瘤生长的抗体。
22. 权利要求 21 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 的 EGF-样结构域中的表位。
23. 权利要求 21 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 富含 cys 的结构域中的表位。
24. 权利要求 21 中的抗体, 该抗体为 A27F6.1。
25. 一种由选自下列的杂交瘤制备的抗体: A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318), A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A10B2.18 (ATCC 保藏号 PTA-3311), A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A17G12.1 (ATCC 保藏号 PTA-3314), A18B3.11 (ATCC 保藏号 PTA-3312), B3F6.17 (ATCC 保藏号 PTA-3319), 和 B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313)。
26. 一种特异性结合 Cripto 且能阻断 Cripto 和 ALK4 之间相互作用的抗体。
27. 权利要求 26 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 的 EGF-样结构域中的表位。
28. 权利要求 26 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 富含 cys 的结构域中的表位。
29. 权利要求 26 中的抗体, 该抗体选自 A8G3.5, A6F8.6 和 A6C12.11。
30. 一种能特异性结合 Cripto、阻断 Cripto 和 ALK4 之间相互作用且能调控肿瘤生长的抗体。
31. 权利要求 30 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 的 EGF-样结构域中的表位。

32. 权利要求 30 中的抗体, 该抗体可特异性结合 Cripto 富含 cys 的结构域中的表位。
33. 权利要求 30 中的抗体, 该抗体为 A8G3.5。
34. 一种能内化 Cripto 的 Cripto 抗体。
- 5 35. 权利要求 34 中的抗体, 其中所述抗体与化疗药物偶联。
36. 权利要求 34 中的抗体, 该抗体选自 A27F6.1 和 B3F6.17。
37. 一种用于向患有表达 Cripto 的肿瘤的受试者施用的组合物, 该组合物包含至少一种根据权利要求 1-35 中任一项所述的抗体。
38. 权利要求 37 中的组合物, 其中所述的受试者为人。
- 10 39. 权利要求 37 中的组合物, 还包括一种可药用赋形剂。
40. 权利要求 37 中的组合物, 其中所述的抗体与一种化疗药物偶联。
41. 权利要求 37 中的组合物, 还包括未偶联的化疗药物。
42. 一种体外调控样本中肿瘤细胞生长的方法, 该方法包括向样本中加入权利要求 37 所述组合物的步骤。
- 15 43. 一种调控受试者体内肿瘤细胞生长的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的权利要求 37 所述组合物。
44. 权利要求 43 中的方法, 其中所述受试者为人。
45. 一种治疗过表达 Cripto 的肿瘤患者的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 37 所述组合物。
- 20 46. 一种治疗过表达 Cripto 的肿瘤患者的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 39 所述组合物。
47. 一种治疗过表达 Cripto 的肿瘤患者的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 40 所述组合物。
48. 一种治疗过表达 Cripto 的肿瘤患者的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 41 所述组合物。
- 25 49. 权利要求 42 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。
50. 权利要求 43 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。
- 30 51. 权利要求 44 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。

52. 权利要求 45 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。
53. 权利要求 46 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。
- 5 54. 权利要求 47 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。
55. 权利要求 48 中的方法, 其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。
56. 一种测定组织是否表达 Cripto 的方法, 该方法包括使用权利要求
- 10 1-37 中任一项所述抗体通过免疫测定对取自受试者的组织进行分析的步骤。
57. 一种测定细胞系是否表达 Cripto 的方法, 该方法包括使用权利要求 1-37 中任一项所述抗体通过免疫测定对该细胞系进行分析的步骤。
58. 权利要求 1 中的抗体, 其中所述抗体为单克隆抗体。
59. 权利要求 1 中的抗体, 其中所述抗体为人源化抗体。
- 15 60. 权利要求 1 中的抗体, 其中所述抗体为人抗体。
61. 一种治疗受试者中与不良细胞增生相关的病症的方法, 该方法包括向所述受试者施用权利要求 37 所述组合物。

CRIPTO 阻断抗体及其用途

5 相关申请

该申请是 2002 年 3 月 22 日提交的 U.S.S.N. 60/367, 002 的继续申请, 而后者又是 2001 年 6 月 26 日提交的 U.S.S.N. 60/301, 091 的部分继续申请, U.S.S.N.60/301, 091 是 2001 年 5 月 17 日提交的 U.S.S.N. 60/293, 020 的部分继续申请, U.S.S.N. 60/293, 020 是 2001 年 4 月 26 日提交的 U.S.S.N. 60/286, 10 782 的部分继续申请。上述这些专利申请每一篇的完整内容在此引入作为参考。

技术领域

本发明广义上涉及遗传学、细胞及分子生物学领域。更具体地说, 本发明涉及能结合和调控 Cripto 信号传导的抗体, 含有该抗体的试剂盒以及该抗 15 体的使用方法。

背景技术

Cripto 是在对人胚癌文库进行 cDNA 筛选时偶然分离到的一种 188 氨基酸残基的细胞表面蛋白质(Ciccodicola 等, 1989, EMBO J., vol. 8, no. 7, pp. 1987-1991)。Cripto 蛋白具有至少两个明显的结构域: 一个富含半胱氨酸的 20 结构域和一个最初被认为与表皮生长因子(EGF)家族中发现的结构域近似的结构域。Cripto 最初被归类为 EGF 家族的一个成员(Ciccodicola 等, 上述); 但是, 随后的分析表明 Cripto 不能与任一已知的 EGF 受体结合, 其 EGF-样结构域实际上是从 EGF 家族分化而来 (Bianco 等, 1999, J. Biol. Chem., 274: 8624-8629)。

25 尽管进行了持续的研究, Cripto 信号传导途径仍然让人琢磨不透, 出现了支持下列几种不同激活途径的文献, 包括 MAP 激酶途径(DeSantis 等, 1997, Cell Growth Differ., 8: 1257-1266; Kannan 等, 1997, J. Biol. Chem., 272: 3330-3335)、TGF- β 途径 (Gritsman 等, 1999, Development, 127: 921-932; Schier 等, 2000, Nature, 403: 385-389)、与 Wnt 途径间可能的相互 30 作用 (Salomon 等, Endocr Relat Cancer. 2000 Dec;7(4): 199-226; 以及与 EGF 途径的信息交换(Bianco 等, 1999, J. Biol. Chem., 274: 8624-8629)。

美国专利 5, 256, 643 及与其相关的两个分案申请(美国专利 5,654,140 和 5,792,616)公开了人 Cripto 基因、Cripto 蛋白及抗 Cripto 抗体。

美国专利 5,264,557 及与其相关的三个分案申请(美国专利 5,620,866, 5,650,285, 和 5,854,399)公开了人 Cripto-相关基因及蛋白。另外还公开了能
5 结合 Cripto-相关蛋白但不能通过与 Cripto 蛋白本身结合而发生交叉反应的抗体。

用抗 cripto 短肽的兔多克隆抗体进行免疫染色表明: Cripto 蛋白的过表达与多种肿瘤类型(包括但不限于乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃)相关。Panico 等 1996, Int. J. Cancer, 65: 51-56; Byrne
10 等, 1998, J Pathology, 185: 108-111; DeAngelis 等, 1999, Int J Oncology, 14: 437-440。因此, 本领域需要有办法来控制、限制和/或阻止这类过表达, 调控 Cripto 信号传导, 以及调控 Cripto 的表达结果(即, 促进和/或保持细胞转化)。

发明概述

15 本发明提供了能特异性结合 Cripto 的新的抗体, 以及制备和使用该抗体的方法。本发明还提供了能结合 Cripto 并能调控 Cripto 信号传导或蛋白相互作用的抗体, 例如, 结合 Cripto 从而使与 Cripto 相互作用的蛋白质产生的信号被下调的抗体。本发明还提供了能结合 Cripto 并能阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用的抗体。本发明还提供了能结合 Cripto 并能调控肿瘤生长的抗体。
20 本发明还提供了能结合 Cripto、调控 Cripto 信号传导以及调控肿瘤生长的抗体。本发明还提供了能结合 Cripto、阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用以及调控肿瘤生长的抗体。

本发明的一个方面, 本发明所述抗体能特异性地结合选自与下列抗体结合的表位的表位: A6C12.11, A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318), A7H1.19,
25 A8F1.30, A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18 (ATCC 保藏号 PTA-3311), A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (ATCC 保藏号 PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11 (ATCC 保藏号
30 PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17 (ATCC 保藏号 PTA-3319), B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313), B11H8.4。

本发明的另一方面，本发明所述的抗体特异性地结合 Cripto 配体/受体结合结构域中的表位。Cripto 可选自：CR-1 (SEQ ID NO: 1) 或 CR-3 (SEQ ID NO: 2)。在一个更具体的实施方案中，与配体/受体结合结构域中表位特异性结合的抗体包括例如 A6C12.11, A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318),
5 A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A19A10.30, A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A17G12.1 (ATCC 保藏号 PTA-3314), A18B3.11 (ATCC 保藏号 PTA-3312) 和 B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313)。

一个实施方案中，本发明所述抗体结合的表位在 EGF-样结构域中。特异性结合 EGF-样结构域中表位的抗体包括但不限于 A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313), A17G12.1 (ATCC 保藏号 PTA-3314) 和 A18B3.11 (ATCC 保藏号 PTA-3312)。
10

另一个实施方案中，本发明所述抗体特异性结合的表位在富含 cys 的结构域中。特异性结合富含 cys 的结构域中表位的抗体包括但不限于 A19A10.30, A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318) 和 A6C12.11。
15

另一实施方案中，本发明所述抗体结合的表位位于跨越 Cripto 第 46-62 位氨基酸残基的结构域内。特异性结合跨越 Cripto 第 46-62 位氨基酸残基的结构域内表位的抗体包括但不限于 A10B2.18 (ATCC 保藏号 PTA-3311), B3F6.17 (ATCC 保藏号 PTA-3319) 和 A17A2.16。
20

本发明还涉及特异性结合 Cripto 且能调控 Cripto 信号传导的抗体。特异性结合 Cripto 且能调控 Cripto 信号传导的抗体，包括但不限于，A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), 和 A6C12.11。一个实施方案中，特异性结合 Cripto 且能调控 Cripto 信号传导的本发明所述抗体能够结合 Cripto 的 EGF-样结构域或富含 cys 的结构域中的表位。
25

本发明还涉及特异性结合 Cripto 且能阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用的抗体。特异性结合 Cripto 且能阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用的抗体，包括但不限于，A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318) 和 A6C12.11。在一个实施方案中，本发明所述的特异性结合
30

Cripto 且能阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用的抗体能够结合 Cripto 的 EGF-样结构域或富含 cys 的结构域中的表位。

另一方面，本发明涉及能特异性结合 Cripto 且能调控肿瘤生长的抗体。特异性结合且能调控肿瘤生长的抗体，包括但不限于，A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313) 和 A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317)。

一个实施方案中，本发明所述的能特异性结合 Cripto 且能调控肿瘤生长的抗体能够结合 Cripto 的 EGF-样结构域或富含 cys 的结构域中的表位。

另一方面，本发明涉及能特异性结合 Cripto、能调控 Cripto 信号传导且能调控肿瘤生长的抗体。能特异性结合 Cripto、能调控 Cripto 信号传导且能调控肿瘤生长的抗体，包括但不限于 A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310)。

一个实施方案中，本发明所述的能特异性结合 Cripto、能调控 Cripto 信号传导且能调控肿瘤生长的抗体能够结合 Cripto 的 EGF-样结构域或富含 cys 的结构域中的表位。

另一方面，本发明涉及能特异性结合 Cripto、能阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用且能调控肿瘤生长的抗体。能特异性结合 Cripto、能阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用且能调控肿瘤生长的抗体，包括但不限于 A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317)。

另一实施方案中，本发明提供了由选自下列的杂交瘤制备的抗体：
A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318), A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A10B2.18 (ATCC 保藏号 PTA-3311), A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A17G12.1 (ATCC 保藏号 PTA-3314), A18B3.11 (ATCC 保藏号 PTA-3312), B3F6.17 (ATCC 保藏号 PTA-3319), 和 B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313)。

本发明所述抗体包括但不限于单克隆、多克隆、人源化、嵌合及人抗体。

本发明还提供了一种用于向生长有表达 Cripto 的肿瘤的受试者施用的组合物，该组合物包含至少一种上述抗体。在一个更具体的实施方案中，所述受试者是人。所述组合物可包含一种可药用赋形剂。上述抗体可偶联于一化疗药物或者与一非偶联的化疗药物联合提供。

本发明另一方面还涉及体外调控样本中肿瘤细胞生长的方法，该方法包括向样本中加入上述组合物的步骤。

另外还涉及体内调控受试者肿瘤细胞生长的方法,该方法包括向受试者施用有效量的上述组合物的步骤。在一个具体实施方案中,所述受试者是人。

- 本发明的另一方面是治疗过表达 Cripto 的肿瘤患者的方法,该方法包括向受试者施用有效量的上述组合物。用于施用的组合物可包括可药用赋形剂、与化疗药物偶联的抗体以及与非偶联化疗药物联合施用的抗体。

具体而言,本发明所述的方法可用于调控肿瘤细胞生长和/或治疗生长有肿瘤的受试者(即,人),其中所述的肿瘤细胞选自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。

- 另一实施方案中,本发明涉及测定组织是否表达有 Cripto 的方法,该方法包括用上述任一抗体通过免疫测定对取自受试者的组织进行分析的步骤。另外还涉及测定细胞系是否过表达 Cripto 的方法,该方法包括用上述任一抗体通过免疫测定对细胞系进行分析。

本发明的这些方面及其它方面,在本发明的详述部分有更详细地描述。

发明详述

- 能特异性结合 Cripto 的抗体及其用于调控 Cripto 信号传导或蛋白相互作用,以及/或者阻断 Cripto 和 ALK4 间相互作用,以及/或者调控肿瘤细胞生长的用途已经被公开。已经被公开的可特异性结合 Cripto 的各类抗体,包括,例如,特异性结合天然 Cripto 蛋白或非天然 Cripto 的配体/受体结合结构域中表位的抗体;结合 EGF-样结构域、富含 cys 的结构域、或来自含第 46-150 位氨基酸残基的区域的肽(例如,约第 3-20 位氨基酸);结合 Cripto 且能调控 Cripto 信号传导的抗体;结合 Cripto 且能调控肿瘤细胞生长的抗体;结合 Cripto、调控 Cripto 信号传导、且能调控肿瘤细胞生长的抗体。用常规体外测定筛选这些抗体,选取可结合配体/受体结合结构域、可调控 Cripto 信号传导、且能调控肿瘤细胞生长的抗体。
- 本发明所述方法可用于治疗哺乳动物的恶性或良性肿瘤,其中肿瘤的生长速率(相对于正常组织来说为异常速率)至少部分取决于 Cripto。异常生长速率是指超过了正常体内稳态所需速率和超过了相同来源的正常组织的生长速率的生长速率。

定义

本申请全文中进行了各种定义。其中多数词汇均采用本领域技术人员赋予这些词汇的含义。下文或本申请其它部分专门定义的词汇其含义在本发明上下文中前后一致且一般与本领域技术人员的理解相同。

本发明中，“区域”一词是指生物分子一级结构中的空间上邻接的部分。

5 就蛋白质而言，区域由该蛋白氨基酸序列中的邻接部分限定而成。

本发明中，“结构域”一词是指生物分子中对该分子的已知或待求证功能作出贡献的结构部分。结构域可以与区域或其部分互为延伸；也可以并入生物分子中作为特定区域的全部或部分之外的不同部分。蛋白质结构域的实例包括，但不限于胞外结构域(跨越 Cripto 中约第 31-约第 188 位残基，所述
10 的 Cripto 包括 Cripto、CR-1 (SEQ ID NO: 1) 和 CR-3 (SEQ ID NO: 2))和跨膜结构域 (跨越 Cripto 中约第 169-约第 188 位残基，所述的 Cripto 包括 Cripto、CR-1 (SEQ ID NO: 1) 和 CR-3 (SEQ ID NO: 2))。Cripto 蛋白的配体/受体结合结构域跨越例如 Cripto 中约第 75 -约第 150 位残基，所述的 Cripto 包括 Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) 和 CR-3 (SEQ ID NO: 2)，其中包
15 含 Cripto 的 EGF-样结构域，该结构域跨越例如 Cripto 中约第 75 -约第 112 位残基，所述的 Cripto 包括 Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) 和 CR-3 (SEQ ID NO: 2)，和 Cripto 的富含半胱氨酸的结构域，该结构域跨越例如 Cripto 中约第 114 -约第 150 位残基，所述的 Cripto 包括 Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) 和 CR-3 (SEQ ID NO: 2)。例如，经鉴定本发明所述的多数单克隆抗体可
20 结合所述的 EGF-样或富含 cys 的结构域。其它单克隆抗体 A10B2.18 (ATCC 保藏号 PTA-3311), B3F6.17 (ATCC 保藏号 PTA-3319)和 A17A2.16 经鉴定可结合位于 EGF-样结构域上游、跨越第 46-62 位残基的那个区域内所形成的表位。参见下文实施例 3。配体/受体结合结构域中的表位，无论是天然构象 Cripto 蛋白还是非天然 Cripto 蛋白中形成的表位，抗体都可与其结合。

25 本发明中，“抗体”一词是指完整无缺的抗体和 Fab, Fab', F(ab)2, 及其其它片段。完整无缺的抗体包括，但不限于，单克隆抗体如鼠单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人抗体以及人源化抗体。各种形式的抗体都可以用标准重组 DNA 技术(Winter And Milstein, Nature 349: 293-99, 1991)来制备。例如，“嵌合”抗体可通过将动物抗体的抗原结合区与人抗体恒定区连接而
30 构建成(起初源自非人哺乳动物的抗体，通过重组 DNA 技术将重链铰链区及恒定区和/或轻链恒定区的全部或部分用人免疫球蛋白轻链或重链的相应区

域取代)(参见, 例如, Cabilly 等, 美国专利 4, 816, 567; Morrison 等, Proc. Natl.Acad. Sci. 81: 6851-55, 1984)。当用于人的临床治疗时嵌合抗体可减弱动物抗体引发的免疫反应。

此外, 重组“人源化”抗体也可以合成。人源化抗体是最初起源于非人哺乳动物的抗体, 用重组 DNA 技术将该抗体中并非抗原结合所需的部分或全部氨基酸用人免疫球蛋白轻链或重链相应区域中的氨基酸取代。也就是说, 它们是主要包含人免疫球蛋白序列但其中已经插入了负责特异性抗原结合的区域嵌合体(参见, 例如, PCT 专利申请 WO 94/04679)。用目的抗原免疫动物, 分离获得相应的抗体, 取出可变区序列中负责抗原结合的部分。然后, 将动物来源的抗原结合区域克隆入已经删除了抗原结合区域的人抗体基因的合适位置。人源化抗体将用于治疗人的抗体内使用的异源(种间)序列减至最小, 因而几乎不会引发不良(unwanted)免疫反应。灵长类源化的抗体也可用类似方法制备。

本发明的另一实施方案包括人抗体的用途, 该抗体可用非人动物来制备, 例如含有一种或多种人免疫球蛋白转基因的转基因动物。所述动物可用于作用于制备杂交瘤的脾细胞的来源, 描述见美国专利 5,569,825。

抗体片段和单价抗体也可用于本发明所述的方法和组合物中。单价抗体包含与第二抗体重链 Fc (或茎干)区结合的重链/轻链二聚体。“Fab 区域”是指链中大体上等同于或类似于包含重链 Y 分枝部分和整个轻链的序列的那部分, 已证实所述序列联合(集合)在一起显示抗体活性。Fab 蛋白包括一重链和一轻链的集合体(通常称为 Fab'), 以及相应于抗体 Y 的两个分枝节段的四聚体(通常称为 F(ab)2), 上述任一个体可以共价方式也可以非-共价方式集合在一起, 只要所述集合能与特定抗原或抗原家族特异性反应即可。

本发明所述任一抗体都可任选与化疗药物偶联在一起, 描述见下文。

本发明中, “结合”一词意指在两种蛋白或化合物或关联蛋白或化合物或其组合之间的物理或化学相互作用, 包括抗体与蛋白间的相互作用。结合包括离子键、非-离子键、氢键、范德华力、疏水相互作用等。物理相互作用, 结合, 可以是直接的也可以是间接的, 间接结合是指借助或归因于另一种蛋白或化合物的效力, 直接结合是指, 不借助或归因于另一种蛋白或化合物的效应、反而无需借助其它实体化学介质而发生的相互作用。结合可通过多种不同方式检测。检测结合的方法已为本领域技术人员熟知。

本发明中，“能内化 Cripto 的抗体”意指在将 Cripto 从细胞表面除去的同时进入细胞的抗体。可以通过使用荧光标记的单克隆抗体筛选能内化 Cripto 的 Cripto 抗体。为了测定哪种抗体内化入 Cripto 阳性细胞，可以通过在荧光和/或共焦显微镜下观察细胞来测定抗体荧光信号的细胞摄入量。那些实现了

5 内化的抗体会在细胞浆和/或细胞囊泡中观察到荧光信号。能内化 Cripto 的 Cripto 抗体的非限制性实例包括 A27F6.1 和 B3F6.17。

本发明中，“化合物”一词意指任一可鉴定的化合物或分子，包括但不限于离子、原子、小分子、肽、蛋白质、糖、核苷酸或核酸，以及其它天然或合成的化合物。

10 本发明中，“调控”或“修饰”是指一种具体活性或蛋白质在数量、质量或效力上的增或减。

本发明中，“调控 Cripto 信号”是指 Cripto 活性在数量、质量或效力上的增或减约 5%，优选 10%，较优选 20%，更优选 30%，更优选 40%，更优选 50%，更优选 60%，更优选 70%，更优选 80%，更优选 90%，以及最优选

15 100%。活性可用本领域已知方法来测量，例如实施例 3 所述的无效细胞试验(null cellAssay)。另一实施方案中，类似地可通过结合本发明所述抗体调控 Cripto 和另一蛋白之间的蛋白相互作用。

本发明中，“阻断 Cripto 和 ALK 4 间相互作用”是指将 Cripto 和 ALK4 之间的相互作用即结合增或减约 5%，优选 10%，较优选 20%，更优选 30%，

20 更优选 40%，更优选 50%，更优选 60%，更优选 70%，更优选 80%，更优选 90%，以及最优选 100%。活性可用本领域已知方法来测量，例如实施例 8 所述的结合试验。

本发明中，“体外调控肿瘤细胞生长”是指体外使肿瘤细胞数目增或减约 5%，优选 10%，较优选 20%，更优选 30%，更优选 40%，更优选 50%，更

25 优选 60%，更优选 70%，更优选 80%，更优选 90%，以及最优选 100%。肿瘤细胞生长的体外调控可通过本领域已知方法来测定，例如实施例 4 所示的 GEO 细胞软琼脂试验。

本发明中，“体内调控肿瘤细胞生长”是指体内使肿瘤细胞数目增或减约 5%，优选 10%，较优选 20%，更优选 30%，更优选 40%，更优选 50%，更

30 优选 60%，更优选 70%，更优选 80%，更优选 90%，以及最优选 100%。肿

瘤细胞生长的体内调控可通过本领域已知方法来测定，例如实施例 5 所示的试验。

“预防”一词是指降低生物体发生或发展异常状况的可能性。

“治疗”一词是指产生治疗效果并至少部分减轻或消除生物体的异常状况。治疗包括维持已受抑制的肿瘤细胞以及诱导消退。

“治疗效果”是指抑制一种异常状况。治疗效果可一定程度减轻异常状况的一种或多种症状。就异常状况的治疗而言，治疗效果可指一种或多种下述情形：(a) 细胞增殖、生长和/或分化的增或减；(b) 抑制(即，减慢或停止)或促进细胞死亡；(c) 抑制退化；(d) 一定程度地减轻所述异常状况的一种或多种症状；以及 (e) 增强细胞群的功能。显示针对异常状况效力的化合物可按本申请所述方法鉴定。

“施用”涉及将化合物引入生物体细胞或组织的方法。当生物体的细胞或组织存在于生物体内或生物体外时所述异常状况可被防止或治疗。存在于生物体外的细胞可维持或生长于细胞培养皿中，或另一生物体内。就包含在生物体内的细胞而言，多种本领域中现有的技术都可以施用化合物，包括(但不限于)口服、肠胃外、皮肤、注射以及气雾剂方式应用。就生物体外的细胞而言，多种本领域中现有的技术都可以施用化合物，包括(但不限于)细胞显微注射技术、转化技术以及载体技术。施用可通过本领域已知的多种方式完成，例如，口服、静脉内、腹膜内、肌内等。当用于体内治疗时，本发明所述抗体按有效量施用给受试者。本发明中使用的“有效量”是指足以实现有益或期望临床结果的量(即，消除或减轻受试者肿瘤负担的量)。有效量可以一次或多次施用。就本发明目的而言，本发明所述抗体的有效量是指足以改善、稳定或延缓 Cripto-相关疾病病情发展的量，具体为 Cripto-相关肿瘤。这些效果指征的检测及测量在下文讨论。常规治疗方案的实例包括将本发明所述抗体静脉输注给受试者，按每周一次的治疗方案，剂量为 2-5 mg/kg。抗体可以在门诊的化学输注室(chemoinfusion unit)施用，除非受试者要求入院。其它本领域已知的施用方案也在本发明涉及范围之内。

异常状况也可通过向一组在向生物传递信号的途径中有异常的细胞施用本发明所述抗体来预防或治疗。然后，监测施用化合物对生物的功能的影响。所述生物优选是人。

“Cripto 过表达”是指组织中 Cripto 的表达量以统计学显著量大大超过邻近正常组织的 Cripto 表达。

“化疗药物”是指本领域已鉴定的在抑制肿瘤生长、维持已受抑的肿瘤生长、和/或诱导消退方面具有治疗作用的任一药物，例如天然化合物、合成化合物、蛋白质、经修饰的蛋白质、以及放射性化合物。本发明涉及的化疗药物包括可与本发明所述抗体偶联的药物或者与本发明所述抗体联用而不与该抗体偶联的药物。可与本发明抗体偶联的范例性的化疗药物包括，但不限于放射偶联物(⁹⁰Y, ¹³¹I, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹⁸⁶Rh, 等)、肿瘤活化药物前体(maytansinoids, CC-1065 类似物, clicheamicin 衍生物, 蒽环类抗生素, 长春花生物碱等)、蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素。

化疗药物可以与本发明所述抗体联用，而不必与其偶联(即，非偶联化疗药物)，包括，但不限于：铂(即，顺铂)，蒽环类抗生素，核苷类似物(嘌呤和嘧啶)，taxanes，喜树碱，外足叶草毒素(epipodophyllotoxins)，DNA 烷基化试剂，叶酸拮抗剂、长春花生物碱、核糖核苷酸还原酶抑制剂、雌激素抑制剂、孕酮抑制剂、雄性激素抑制剂、芳香酶抑制剂、干扰素、白细胞介素、单克隆抗体、紫杉酚、伊立替康(camptosar)、阿霉素(dox)，5-FU 和吉西他滨(gemcitabine)。所述化疗药物可在实施本发明时通过将抗体和非偶联化疗药物共施用而与本发明所述抗体联用。

“可药用的载体或赋形剂”是指本领域已知的、用于施用本发明所述抗体的生物学惰性化合物。可接受的载体为本领域熟知，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., 1990 中所记载的载体。可接受的载体可以包括生物可接受的、惰性地或生物可吸收的盐类、缓冲试剂、寡-或多糖、聚合物、粘弹性化合物如透明质酸、增粘剂、防腐剂，等。

“受试者”是指脊椎动物、具体为哺乳动物成员，包括但不限于家畜、竞技动物(sportsAnimals)及灵长类动物，包括人。

本发明的抗体

本发明所述抗体可特异性结合 Cripto：本发明中，Cripto 包括 CR-1 Cripto 蛋白、CR-3 Cripto 蛋白、及其片段。所述片段可以是完整的结构域，例如胞外或胞内结构域，EGF-样结构域，富含 cys 的结构域，受体结合结构域，等。所述片段还可包括 Cripto 蛋白任一结构域中的邻接及非邻接的表位。

CR-1 的 188 个氨基酸的序列如下[SEQ ID NO: 1]:

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS
FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
5 GLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGICLSIQSYY

CR-3 的 188 个氨基酸的序列如下[SEQ ID NO: 2]:

MDCRKMVRFSYSVIWIMAISKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLESFCACPPSF
10 YGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGL
VMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLAGICLSIQSYY

在一个实施方案中,本发明所述抗体可结合 Cripto 的 EGF-样结构域中的表位。所述 EGF-样结构域跨越成熟 Cripto 蛋白质中约第 75-112 位氨基酸
15 残基。EGF-样结构域中的表位可包括氨基酸残基的线性或非线性跨幅。所述
线性表位的实例包括但不限于约第 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105,
100-110, 或 105-112 位残基。在一个实施方案中, EGF 结构域中的表位是
在天然构象 Cripto 蛋白中形成的相对于非天然 Cripto 蛋白的表位。

另一实施方案中,本发明所述抗体可结合 Cripto 富含 cys 的结构域中的
20 表位。所述富含 cys 的结构域跨越成熟 Cripto 蛋白中的约第 114 位-约 150
位氨基酸残基。富含 cys 的结构域中的表位可以包含线性或非线性跨幅的氨
基酸残基。涉及的线性表位的实例包括但不限于约第 114-125, 120-130,
125-135, 130-140, 135-145, 或 140-150 位残基。一个实施方案中, 富含 cys
的结构域中的表位为天然构象 Cripto 蛋白相对于非天然 Cripto 蛋白其中形
25 成的表位。

一旦生成抗体,该抗体与 Cripto 的结合就可以使用本领域常规技术,例
如 ELISA 来测定,而细胞表面上 Cripto 的存在可用流式细胞计量术(FACS)
测定,如实施例 2 所示。也可以使用测量所述结合的任一其它技术。

本发明提供了 Cripto 特异性抗体(例如,单克隆及多克隆抗体,单链抗
30 体、嵌合抗体、双功能/双特异性抗体、人源化抗体、人抗体及互补决定区
(CDR)-移植抗体,包括包含特异性识别本发明多肽的 CDR 序列的化合物)或

其片段。本发明还提供了抗体片段,包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 和 F_v。“特异性”和“选择性”当用来描述本发明所述抗体的结合时,意味着本发明所述抗体的可变区能识别和结合 Cripto。应该理解的是,本发明所述的特异性抗体还可与其它蛋白(例如,金黄色葡萄球菌(*S.Aureus*)蛋白 A 或 ELISA 技术中的其它抗体)相互作用,该作用借助于该抗体可变区外侧的序列,尤其该分子的恒定区中的序列的相互作用。用于测定本发明所述抗体(即,特异性结合表位配体/受体结合结构域和跨越第 46-62 位氨基酸残基的结构域的抗体)的结合特异性的试验已为本领域熟知并且是常规实践。所述试验的详细描述,参见 Harlow 等 (Eds.), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), 第 6 章。能够识别和结合 Cripto 蛋白片段的抗体也在本发明范围之内,只要该抗体对于 Cripto 多肽是特异性的。本发明所述的多肽可用本领域熟知的方法制备并常规使用。

一个实施方案中,本发明提供了一种特异性结合 Cripto 配体/受体结合结构域中表位的抗体。抗体的特异性在下文有更详细地描述。但是,应该强调的是,用现有技术描述的其它多肽制备的并且恰好能与 Cripto 交叉反应(例如,由于这两种多肽中恰好存在类似的表位)的抗体称为“交叉-反应”抗体。这类交叉-反应抗体不是特异性针对 Cripto 的抗体。测定抗体是否特异性结合 Cripto 表位可以用本领域熟知的多种方法中的任一种,例如 Western 印迹试验来进行。在鉴别表达 Cripto 的细胞以及调控 Cripto 配体/受体结合活性方面,特异性结合 Cripto 蛋白胞外结构域(即, Cripto 蛋白可见于细胞外侧的部分)的抗体都是特别有用的。

一个实施方案中,本发明提供了一种包含多克隆抗体的无细胞组合物,其中所述抗体中的至少一种是本发明特异于 Cripto 的抗体。从动物分离的抗血清是组合物一个实例,另一实例是一种含有已重悬于水或其它稀释剂、赋形剂或载体中的抗血清之抗体组分的组合物。

另一实施方案中,本发明提供了单克隆抗体。单克隆抗体具有高度的特异性,针对单一的抗原位点。另外,与多克隆抗体通常包括针对不同表位的不同抗体不同,每一种单克隆抗体都只对抗原上的单一决定簇。单克隆抗体可用于增强利用抗原-抗体结合的诊断及测定试验的选择性和特异性。单克隆抗体的另一种优势是他们可用杂交瘤培养物合成,不受其它免疫球蛋白的污染。制备这类抗体的杂交瘤也是本发明的一个方面。

在另一个相关实施方案中,本发明提供了一种特异性针对 Cripto 特异性抗体的抗-独特型抗体。抗-独特型抗体的更详细描述,参见,例如,美国专利 6,063,379 和 5,780,029。

已经熟知的是,抗体含有可用化学方法或重组技术分离的、相对较小的
5 抗原结合结构域。这类结构域本身就是有用的 Cripto 结合分子,也可被重导入人抗体,或融合于化疗药物或多肽。因此,在另一实施方案中,本发明提供了一种含有 Cripto-特异性抗体片段的多肽,其中所述片段及相关分子,无论是那个,都可结合 Cripto。本发明提供了本身是单链抗体和 CDR-移植抗体的多肽作为非限制性实例。关于 CDR-移植抗体的更详细讨论,参见,例如,
10 美国专利 5,859,205。

另一实施方案中,可以用本领域已知的任一方法将非-人抗体人源化。人源化后的抗体可用于体内治疗用途。另外,重组"人源化"抗体可以合成。人源化抗体最初源自非人哺乳动物,但已用重组 DNA 技术将并非抗原结合所必需的全部或部分氨基酸用人免疫球蛋白轻链或重链相应区域的氨基酸
15 取代。它们是主要包含人免疫球蛋白序列但其中已经插入了负责特异性抗原结合的区域嵌合体(参见,例如,PCT 专利申请 WO 94/04679)。用目的抗原免疫动物,分离获得相应的抗体,取出可变区序列中负责特异性抗原结合的部分。然后,将动物来源的抗原结合区域克隆入已经删除了抗原结合区域的人抗体基因的合适位置。人源化抗体将用于治疗人的抗体内使用的异源
20 (种间)序列减至最小,因而几乎不会引发不良免疫反应。类似地,可用灵长类动物(例如,恒河猴、狒狒和黑猩猩)抗体基因,制备灵长类源化的抗体。然后,可将其它变化导入抗体框架调节亲和力和免疫原性。参见,例如,美国专利 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, 和 6,180,370。

本发明的另一实施方案包括人抗体的用途,该抗体可用非人动物来制备,例如含有一种或多种人免疫球蛋白转基因的转基因动物。所述动物可用作
25 作用于制备杂交瘤的脾细胞的来源,描述见美国专利 5,569,825, WO00076310, WO00058499 和 WO00037504, 在此引入作为参考。

信号调控

另一实施方案中,本发明的抗体可结合 Cripto,并调控 Cripto 信号传导
30 或 Cripto-蛋白相互作用。Cripto 活性的过表达会导致去分化状态,该状态促进间质细胞的特征化、加速增殖,及细胞迁移(Salomon 等, BioEssays 21:

61-70, 1999; Ciardiello 等, Oncogene 9: 291-298, 1994; Baldassarre 等, Int. J. Cancer 66: 538-543, 1996), 瘤形成中可见的与细胞转化相关的表型。

测试抗-Cripto 抗体活性及其调控 Cripto 信号传导能力的一种方法是使用 F9-Cripto 敲除(KO)细胞系 (Minchiotti et al., Mech. Dev. 90: 133-142, 2000)。Cripto 能刺激 smad2 磷酸化及非洲爪蟾胚胎中的转录因子 FAST, 转录因子 FAST 的活性可通过测量来自 FAST 调控单元-萤光素酶报道基因的萤光素酶活性来监测 (Saijoh 等, Mol. Cell 5: 35-47, 2000)。F9-Cripto KO 细胞缺失了 Cripto 基因, 因此 Cripto 和 Cripto-依赖性信号传导是无效的 (Minchiotti et al., Mech. Dev. 90: 133-142, 2000)。可以通过转染 Cripto, FAST, 和 FAST 调控单元-萤光素酶基因构建体而在 F9 Cripto KO 细胞中测定 Cripto 信号传导。在这些细胞系中未发现 Cripto 依赖性 FAST 萤光素酶活性, 除非其中转染入了 Cripto cDNA, 和 FAST cDNA。能阻断 Cripto-依赖性 Nodal 信号传导的抗体是可阻断 Cripto 信号传导功能的抗体。

本领域技术人员可以采用测量 Cripto 活性的其它试验, 例如, 软琼脂生长试验(参见下文实施例 4)。细胞在软琼脂中的生长能力与细胞转化相关, 该试验是测量肿瘤细胞生长抑制情况的一种典型的体外试验。用于测定对活性的抑制情况的其它试验包括塑料上进行的体外试验, 等。

治疗用途

本发明的抗体还可用于治疗目的, 例如调控肿瘤细胞生长, 为诊断目的而检测或定量 Cripto, 以及纯化 Cripto。

在本发明的一个实施方案中, 提供了能特异性结合 Cripto 且能调控受试者体内肿瘤细胞生长的抗体。一个实施方案中, 所述肿瘤细胞是乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的肿瘤细胞。

另一实施方案中, 提供了能特异性结合 Cripto 且能调控过表达 Cripto 的肿瘤细胞的生长的抗体。一个实施方案中, 所述肿瘤细胞是过表达 Cripto 的细胞系, 例如源自乳腺、睾丸、结肠、肺、卵巢、膀胱、子宫、子宫颈、胰腺以及胃的癌细胞系。

可以按照本领域技术人员用到的常规方法(如下文实施例 4 所示)筛选抗-Cripto 抗体的体内活性, 以便将其作为潜在的抗癌药物。这些方法的实例已由国立癌症研究所 (NCI) 在其 "in vivo cancer models screening" protocols, NIH publication number 84-2635 (Feb 1984) 中作了概述。

本发明的另一实施方案中，本发明所述抗体可用于治疗患有癌性肿瘤的受试者。

本发明所述抗体可与药理学可接受的赋形剂联合，以治疗有效剂量施用给受试者。关于抑制肿瘤生长方法的讨论参见，例如，美国专利 6,165,464。

5 另外，本发明还包括对患有与 Cripto 异常水平(即，升高或耗竭)相关的病症的受试者进行治疗的方法，其中该方法包括向受试者施用有效量的可特异性结合 Cripto 的配体/受体结合结构域中表位的抗体，所述表位包括但不限于 EGF-样结构域或富含 cys 的结构域中的表位。

另外，本发明还包括对患有与 Cripto 异常水平(即，升高或耗竭)相关的
10 病症的受试者进行治疗的方法，其中该方法包括向受试者施用有效量的可特异性与 Cripto 形成复合体且针对具有下述特征的表位的抗体，即该表位是选自下列的抗体针对的表位：A6C12.11, A6F8.6 (ATCC 保藏号 PTA-3318), A7H1.19, A8F1.30, A8G3.5 (ATCC 保藏号 PTA-3317), A8H3.1 (ATCC 保藏号 PTA-3315), A8H3.2, A19A10.30, A10B2.18 (ATCC 保藏号 PTA-3311),
15 A27F6.1 (ATCC 保藏号 PTA-3310), A40G12.8 (ATCC 保藏号 PTA-3316), A2D3.23, A7A10.29, A9G9.9, A15C12.10, A15E4.14, A17A2.16, A17C12.28, A17G12.1 (ATCC 保藏号 PTA-3314), A17H6.1, A18B3.11 (ATCC 保藏号 PTA-3312), A19E2.7, B3F6.17 (ATCC 保藏号 PTA-3319)和 B6G7.10 (ATCC 保藏号 PTA-3313)。

20 通过检测 Cripto 进行的诊断可以很容易地用本发明的新抗体通过常规结合试验来实现，这就使得本领域技术人员可检测 Cripto 在多种样本、培养物等中的特异性存在。

用于本发明任一目的的含本发明所述抗体的试剂盒也在本发明范围之内。通常，本发明所述试剂盒包括一种抗体免疫特异性针对的对照抗原。实
25 施方案包括含有所有试剂及其使用说明书的试剂盒。

本发明的其它特征可从下列说明性的实施例中清楚地看出。

实施例

实施例 1: Cripto 的表达和纯化

通过将编码人 Cripto 1-169 位氨基酸残基(即 SEQ ID NO: 1 中第 1-169
30 位氨基酸)与人 IgG₁ Fc 结构域(即，“CR(del C)-Fc”)融合体的 cDNA 亚克隆入载体 pEAG1100，得到名为 pSGS480 的表达质粒。该载体的更详细描述，

- 参见于 2000 年 9 月 18 日提交的同时待审的序列号为 No. 60/233,148 的美国专利申请。载体 pEAG1100 是 GIBCO-BRL Life Technologies 质粒 pCMV-Sport-betagal 的衍生物,其在 CHO 瞬间转染中的用途由 Schifferli 等, 1999, Focus 21:16 所述。它是将报道基因 β -半乳糖苷酶 NotI 片段从质粒
- 5 pCMV-Sport-Betagal (产品目录号为 10586-014)中除去而得到的,该过程如下:用 NotI 和 EcoRV 消化该质粒,凝胶纯化出 4.38 kb NotI 载体骨架片段并连接。将连接后的 DNA 转化入感受态大肠杆菌 DH5 α 。从分离的单个克隆中分离出含目的重组体的质粒 pEAG1100。pEAG1100 的序列跨越了启动子、多聚接头及转录终止信号,这一点得到证实。
- 10 将质粒 pSGS480 瞬间转染入 CHO 细胞,将该细胞在 28°C 下培养 7 天。用 Western 印迹试验测定这些细胞及条件培养基(conditioned medium)中是否有 CR(del C)-Fc 蛋白的存在。就 Western 印迹试验而言,将取自 Cripto 转染细胞的条件培养基和细胞在还原条件下 4-20% 梯度凝胶上进行 SDS-PAGE 电泳,电泳转移到 消化纤维膜上,用兔抗 Cripto 17-元(mer)肽 (含 SEQ ID
- 15 NO: 1 中第 97-113 位残基)-匙孔血蓝蛋白 偶联物的多克隆抗血清检测 Cripto 融合蛋白。离心除去细胞后,Western 印迹试验表明 CR(del C)-Fc 蛋白有效地分泌到适应后培养基(上清)中。将该上清加样于蛋白 A-Sepharose (Pharmacia),用 25 mM 磷酸钠 pH 2.8, 100 mM NaCl 洗脱结合蛋白。洗脱的蛋白质用 pH 8.6 的 0.5 M 磷酸钠中和,从 240-340 nm 处的吸光度测量值推算出总蛋白浓度,然后进行 SDS-PAGE 纯化。洗脱后的蛋白质用 0.2 微米滤器过滤,存储于-70°C。
- 20

实施例 2: 抗体的制备和筛选

用洗脱得到的 CR(del C)-Fc 蛋白注射小鼠,用本领域技术人员已知的常规杂交瘤技术制备单克隆抗体。

25 A. 抗体的制备

- 具体而言,用完全弗氏佐剂(GibcoBRL #15721-012)乳化后的纯化人 CR del C-Fc 25 μ g 腹膜内免疫雌性罗伯逊小鼠(Jackson Labs)。用不完全弗氏佐剂(GibcoBRL #15720-014)乳化后的纯化人 CR del C-Fc 25 μ g 腹膜内方式加强免疫,并用蛋白微珠上的形式加强一次。最后一次加强免疫的 3 周后筛选
- 30 血清,具有最佳滴度的小鼠在融合的 3 天前用 50 μ g 可溶性 CR del C-Fc 腹膜内加强免疫。融合的前一天用 50 μ g CR del C-Fc 加强免疫小鼠。将小鼠脾

细胞与 FL653 骨髓瘤细胞以 1 个脾细胞 : 6 个骨髓瘤细胞的比例融合, 然后以 100, 000, 33, 000 和 11, 000 个细胞/孔加入装有选择培养基的 96 孔组织培养板。1 周后用 FACS 和 ELISA 筛选出生长阳性的孔。进行两次融合。

B. 抗体的筛选

- 5 首先, 用 ELISA 板筛选第一或第二次融合得到的上清对 Cripto del C 和 /或 Cripto 的 EGF-样结构域蛋白的识别。用对照融合蛋白(LT- β 受体-Fc)包被 ELISA 板, 以丢弃识别人 Fc 表位的单克隆抗体。按照下面 C 部分的描述进行 ELISA。第一次融合中, 初步的上清也可以通过 FACS 来筛选其识别睪丸肿瘤细胞系 NCCIT 表面 Cripto 蛋白的能力。第二次融合中, 也可以通过
- 10 FACS 测试上清识别 NCCIT 和乳腺癌细胞系 DU4475 这两种肿瘤细胞系表面的 Cripto 的能力。次级筛选包括测试单克隆抗体上清识别一系列肿瘤细胞系的细胞表面 Cripto 的能力(结果参见表 1 和 2), 免疫组化试验中单克隆抗体识别人乳腺和结肠肿瘤组织切片上的人 Cripto 的能力, 单克隆抗体阻断 Cripto-Nodal 信号传导试验的能力, 阻断塑料或软琼脂试验中肿瘤细胞系生
- 15 长的能力, 内化细胞表面 Cripto 的能力。

C. ELISA

ELISA 试验操作如下:

材料:

- 板: Costar 高结合力易清洗 96 孔平板 (07-200-642)
- 20 2' 抗: Pierce 山羊抗-鼠 IgG (H+L)- HRP (P131430)
- 底物: Pierce TMB 底物试剂盒(34021)
- 终止溶液: 1N H₂SO₄
- 缓冲液:
- 结合缓冲液: 0.1 M NaHPO₄ pH 9.0
- 25 封闭缓冲液: PBS + 10 % Donor Calf Serum
- 洗涤缓冲液: PBS + 0.1 % tween-20

- 将抗原 CR-del-C-Fc 及 CR-EGF-fc、作为对照用的人 IgG1 融合蛋白用结合缓冲液稀释至 500ng/ml。每孔加入 100 μ l, 37° C 下孵育 1 小时或 4° C 孵育过夜。倒去液体, 倒扣平板, 吸干。然后加入 250 μ l/孔封闭缓冲液, 然后在 37° C 下孵育 30 分钟。重复一次, 倒去液体, 倒扣平板, 吸干。上清用
- 30 洗涤缓冲液作 1: 50 稀释, 以 50 μ l/孔铺板, 然后室温孵育 1 小时。用 250 μ l/

孔洗涤缓冲液剧烈洗板 3 次。然后向每孔中加入 100 μ l 用洗涤缓冲液 1: 10,000 稀释后的 2' 抗体, 然后室温下孵育 30 分钟。然后用 250 μ l/孔洗涤缓冲液剧烈洗板 3 次, 然后加入底物 100 μ l/孔。显色至充分变暗, 然后加入终止缓冲液 100 μ l/孔, 然后读取该板在 450nm 处的吸光度。

5 D. 流式细胞计量

Cripto 阳性细胞系可用于经细胞表面染色及流式细胞计量术测定单克隆抗体与 Cripto 的结合, 操作如下:

37°C 下用 2 ml 加有 5 mM EDTA 的 PBS 作用 10 分钟, 将细胞从 T162 烧瓶上消化下来。用加有血清的培养基补至 20 ml, 上下吹打几次, 分散细胞。1200 rpm 离心 5 分钟。用 5-10 ml 4°C 的加有 0.1% BSA 的 PBS (洗涤缓冲液) 洗涤细胞。1200 rpm 离心 5 分钟。以 4×10^6 - 10^7 /ml 浓度重悬于洗涤缓冲液。置于冰上。

制备用于染色的抗体。用洗涤缓冲液将纯化后的抗体稀释至 1-10 μ g/ml。将 50 μ l 细胞加入 96-孔 Linbro V 形底的平板(ICN 7632105)。待分析细胞系的每一种对照都铺一孔细胞, 包括不加抗体, 只加 2° 抗体, 杂交瘤培养物、阳性对照抗体上清, 如果可以, 或纯化抗体, 以及 IgG 亚类对照(如果使用纯化后的抗体)的细胞。

待分析细胞系的每一试验样本都铺一孔细胞。将平板 4°C 下用台式离心机, 1200 rpm 旋转 5 分钟。反扣平板倒出缓冲液, 摇动直至液体基本清除干净。向孔中加入 40-50 μ l 抗体(或者向不加抗体或只加 2° 抗体的对照孔加入洗涤缓冲液)。4°C 孵育至少 30 分钟至 1 小时。旋转平板, 1200 rpm 5 分钟。倒掉抗体溶液。每孔加 200 μ l 洗涤缓冲液洗孔两次, 洗涤后离心。倒掉缓冲液。

将 R-PE 标记的 Fc 特异性山羊抗-小鼠 IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories Cat# 115-116-071) (用洗涤缓冲液)1: 200 稀释, 每孔中的细胞用该稀释液 50 μ l 重悬。暗室中 4°C 孵育 20 分钟。向每孔细胞加 150 μ l 洗涤缓冲液。1200 rpm 旋转平板 5 分钟。每孔用 200 μ l 洗涤缓冲液洗涤 1 次。将细胞重悬于 150 μ l 含 1% PFA 的 PBS。将每孔内容物转移至单个管(5 ml Falcon 聚苯乙烯圆底管-352052)中。用锡纸将管包起来。

然后用流式细胞计量仪读取管中的内容物。

用该方法制备的单克隆抗体的两次筛选的结果产生了下列结果,概述于下表 1 和 2, 其中第一列提供的是杂交瘤亚克隆的命名, 接下来给出的是 ELISA 筛选的结果, 其余列显示的是 4 种 *cripto*-阳性细胞系流式细胞计量测定的结果。结果以平均荧光指数(MFI)为单位。

5 表 1: 抗-*Cripto* 单克隆抗体特性

杂交瘤 亚克隆	ATCC 保藏号	ELISA <i>Cripto</i> delC 上清	ELISA <i>Cripto</i> EGF 样结构域上清	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
对照- ELISA		0.06	0.07				
对照- 小鼠 Ig				14	9	37	18
A6C12.11		2.21	0.07	11	35	29	8
A6F8.6	PTA-3318	2.32	0.08	11	50	29	10
A7H1.19		2.14	0.09	14	34	27	12
A8F1.30		2.15	0.1	17	27	32	28
A8G3.5	PTA-3317	2.39	0.09	9	30	25	15
A8H3.1	PTA-3315	2.4	1.7	9	44	23	10
A8H3.2		2.54	0.07	13	13	16	14
A19A10.30		2.02	0.09	9	40	20	10
A10B2.18	PTA-3311	2.36	0.07	40	63	100	43
A27F6.1	PTA-3310	2.28	1.19	9	44	26	17
A40G12.8	PTA-3316	2.27	1.59	10	47	26	16

表 2: 抗-*Cripto* 单克隆抗体特性

杂交瘤 亚克隆	ATCC 保藏号	ELISA <i>Cripto</i> delC	ELISA <i>Cripto</i> EGF 样结构域	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
对照-ELISA		0.05	0.05				
对照-小鼠 Ig				10	6	4	6
A2D3.23		0.93	0.90	73	138	37	27
A7A10.29		1.37	0.07	75	83	33	83
A9G9.9		1.39	0.07	52	62	32	82
A15C12.10		1.42	0.06	46	55	25	93
A15E4.14		1.38	0.06	50	63	23	95
A17A2.16		1.40	0.06	76	97	41	81
A17C12.28		0.96	0.97	6	16	3	22

A17G12.1	PTA-3314	1.30	1.37	61	66	28	78
A17H6.1		1.38	0.05	35	30	5	28
A18B3.11	PTA-3312	1.36	1.38	50	42	33	65
A19E2.7		1.40	0.06	53	59	26	99
B3F6.17	PTA-3319	1.37	0.06	77	51	39	89
B6G7.10	PTA-3313	1.38	1.40	28	22	22	56
B11H8.4		1.41	0.06	59	101	39	107
B12C12.5		1.10	1.04	27	14	23	59
B15A2.6		1.40	0.06	36	44	22	59
C4A2.16		1.40	0.06	24	36	22	65

实施例 3: 用于测定 Cripto 信号传导抑制情况的无效细胞(null cell)试验

下面描述的是用于评估对 Cripto 信号传导的抑制的 F9 Cripto 无效细胞
5 信号传导试验。

第 0 天, 用 0.1 % 明胶包被 6 孔板, 2ml/孔, 37°C 下作用 15 分钟。

种植细胞, 每孔 6×10^5 个 F9 CRIPTO 无效细胞。

第 1 天 转染:

向下列每一试样加入 300 μ l OptiMem1, 得到每一试样的溶液 A:

- 10 试样 1: 0.5 μ g (N₂)₇ 萤光素酶 FAST 报道 cDNA 加 1.5 μ g 空载体 cDNA。
试样 2: 0.5 μ g (N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g FAST, 和 1 μ g 空载体 cDNAs。
试样 3: 0.5 μ g (N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g Cripto ADD 0.5 FAST, 和 0.5 μ g 空载体 cDNAs。
- 15 试样 4: 0.5 μ g(N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g Cripto, 0.5 FAST, 和 0.5 μ g 空载体 cDNAs。
试样 5: 0.5 μ g(N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g Cripto, 0.5 FAST, 和 0.5 μ g 空载体 cDNAs。
试样 6: 0.5 μ g(N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g Cripto, 0.5 FAST, 和 0.5 μ g 空载体 cDNAs。
- 20 试样 7: 0.5 μ g(N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g Cripto, 0.5 FAST, 和 0.5 μ g 空载体 cDNAs。
试样 8: 0.5 μ g(N₂)₇ 萤光素酶, 0.5 μ g Cripto, 0.5 FAST, 和 0.5 μ g 空载体 cDNAs。

试样 9: 0.5µg(N₂)₇ 萤光素酶, 0.5µg Cripto, 0.5 FAST, 和 0.5µg 空载体 cDNAs。

溶液 B 含 30 µl 脂转染胺试剂(Lipofectamine)外加 270 µl OptiMem1。

对于每一试样, 将溶液 A 与溶液 B 混合在一起。室温孵育 45 分钟。用
5 2 ml/孔 OptiMem1 洗孔。吸出后马上进行下一步骤。

向每一溶液 A + B 的混合物加入 2.4 ml OptiMem1 , 混合, 每孔加入 1.5 ml, 双份孔。37°C 下孵育 5 小时。向接受了试样 1-3 的孔每孔加入 1.5 ml DMEM+20 % FCS, 2mM Gln, P/S。按下述要求加入抗-Cripto 抗体: 试样 4 的孔: A27F6.1, 10 µg/ml; 试样 5 的孔: A27F6.1, 2µg/ml; 试样 6 的孔:
10 A40G12.8; 10µg/ml, 试样 7 的孔: A40G12.8 2µg/ml; 试样 8 的孔: A10B2.18, 10µg/ml; 试样 9 的孔: A10B2.18, 2µg/ml。

第 2 天 除去培养基, 用 PBS 洗孔, 2ml/孔。向相同的孔内加入 DMEM+0.5 % FCS, 2mM Gln, P/S(其中含有与前一天相同量的 Cripto 抗体)。

第 3 天 显示萤光素酶信号。用 PBS+Ca²⁺和 Mg²⁺, 2 ml/孔, 洗孔。
15 使用 LucLite 试剂盒, Packard cat# 6016911。室温加入缓冲液和底物。暗光。用 10ml 缓冲液重配底物。用 PBS + Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 作 1: 1 稀释。吸干孔。用 连排移液枪向每孔中快速加入 250 µl 稀释后的底物。漩涡溶液, 并转移 200 µl 至 96 孔白色、底部不透明的板, Falcon 35-3296。使用 Winglow 用 发光仪读板, 将数据提交到 Excel。

20 该试验的结果概述于下表 3。

表 3: Cripto 信号传导试验: 用抗-Cripto 单克隆抗体抑制

经转染的 cDNA	抗-Cripto 抗体	相对发光单位
(N ₂) ₇ luc	无	123
(N ₂) ₇ luc, FAST	无	259
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	无	3091
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A27F6.1 10µg/ml	1507
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A27F6.1 2µg/ml	2297
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A40G12.8 10µg/ml	1213
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A40G12.8 2µg/ml	2626
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A10B2.18 10µg/ml	3466
(N ₂) ₇ luc, FAST, Cripto	A10B2.18 2µg/ml	3103

实施例 4: 体外抑制肿瘤细胞生长的试验

Cripto 信号传导的抑制也可通过测量 GEO 细胞在软琼脂中的生长来测定。参见, 例如, Ciardiello 等, Oncogene. 1994 Jan;9(1): 291-8; Ciardiello 等, Cancer Res. 1991 Feb 1;51(3): 1051-4。

首先, 熔化 3% 细菌培养用琼脂。放置于 42 °C 水浴中。然后, 将 3
5 % 细菌培养用琼脂溶液与预热的完全培养基混合得到 0.6% 细菌培养用琼脂溶液, 42 °C 保温。向 6 cm 平皿内浇注 4 ml 该溶液, 冷却至少 30 分钟以形成底层琼脂。胰蛋白酶消化 GEO 细胞, 用完全培养基重悬至 10⁵ 个细胞/ml。向细胞悬液加入待分析抗体或对照, 从 20μg 到 1 μg 滴定抗体。GEO 细胞悬液与 0.6% 细菌培养用琼脂等体积混合, 在底层琼脂表面覆盖 2 ml。
10 冷却至少 1 小时。37 °C 下 CO₂ 孵箱中孵育 14 天。计数不需显微镜就可见的集落。与阴性对照相比未出现的集落, 表明测试抗体能够体外抑制肿瘤细胞的生长。

该试验产生抗体 A27F6.1 和 B6G7.10 的结果, 如表 4 所示, 二者都显示出削弱 GEO 细胞集落生长的能力。

15 表 4: 软琼脂试验中的生长结果

抗体		集落的平均数
无		109.0
无		104.3
A27.F6	20μg/ml	82.0
A27F6.1	10μg/ml	78.3
A27F6.1	5μg/ml	79.0
A27F6.1	1μg/ml	108.7
B6G7.10	20μg ml	102.3
B6G7.10	10μg/ml	71.7

实施例 5: 体内抑制肿瘤细胞生长的试验

为了测定肿瘤细胞生长被抑制的情况, 将人肿瘤细胞系皮下植入无胸腺裸鼠(athymic nude mice), 观察本发明所述抗体的作用效果, 加或不加对肿瘤抑制有协同或辅助作用的化疗。

20 替代地, 该试验可以使用不同肿瘤细胞系, 例如, GEO (一种良好分化的人结肠癌体外细胞系, 获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)), DU-4475 (一种乳腺癌体外细胞系, 获自 ATCC), NCCIT (一种睾丸肿瘤细胞系, 获自 ATCC), 或其它本领域已知的细胞系。这类试验的一个实例如下:

用耳朵打孔的方式单个标记动物。所述 GEO 细胞系体外或体内传代 1-4 代。将该 GEO 细胞在右侧腹区域皮下植入动物。可使用下列组的动物：

组#	治疗	小鼠#
5	1. 盐水对照, 0.2 ml/小鼠, i.p., 每周三次(一,三,五)	20
	2. mAb, 低剂量, i.p.	10
	3. mAb, 中剂量, i.p.	10
	4. mAb, 高剂量, i.p.	10
	5. 5-FU, 30 mg/kg/注射, 腹膜内, 3 Rx/wk (一,三,五)	10
10	6. 顺铂, 2 mg/kg/注射, 皮下, 3 Rx/wk (一,三,五)	10
	7. 阿霉素, 1.6 mg/kg/注射, 腹膜内, 3 Rx/wk (一,三,五)	10
	8. Irinotecan, 10 mg/kg/注射, 腹膜内, 5 Rx/wk (一-五)	10
	9. mAb, 低剂量, i.p. + 5-FU (中间剂量)	10
	10. mAb, 中剂量, i.p. + 5-FU (中间剂量)	10
15	11. mAb, 高剂量, i.p. + 5-FU (中间剂量)	10
	12. mAb, 低剂量, i.p. + 顺铂(中间剂量)	10
	13. mAb, 中剂量, i.p. + 顺铂(中间剂量)	10
	14. mAb, 高剂量, i.p. + 顺铂(中间剂量)	10
	15. mAb, 低剂量, i.p. + 阿霉素(中间剂量)	10
20	16. mAb, 中剂量, i.p. + 阿霉素(中间剂量)	10
	17. mAb, 高剂量, i.p. + 阿霉素(中间剂量)	10
	18. mAb, 低剂量, i.p. + Irinotecan (中间剂量)	10
	19. mAb, 中剂量, i.p. + Irinotecan (中间剂量)	10
	20. mAb, 高剂量, i.p. + Irinotecan (中间剂量)	10

25 第 0 天：植入肿瘤，记录动物的初始体重。

第 1 天：按照上述要求启动治疗。

第 5 天：开始测量肿瘤大小及体重，每周两次直至试验终止。

测量初始体重、肿瘤大小及体重，宰杀时的组织学，以及对肿瘤的免疫组化分析，以此来分析 Cripto 表达、肿瘤生长、及对生长的抑制。

30 实施例 6：体内种间肿瘤移植模型- 阻断富含 cys 的结构域的抗-Cripto 抗体

为了评估 NCCIT 的应答，将可结合 Cripto 富含 cys 的结构域的抗体皮下植入人睾丸肿瘤细胞系。试验方法如下。结果示于图 1。

方法和材料

- 动物： 使用无胸腺雄性裸鼠。用耳朵打孔的方式逐个编号动物。
- 5 肿瘤： NCCIT, 纵隔混合的生殖细胞，最初获自美国典型培养物保藏中心的人睾丸癌体外细胞系。细胞系用不加抗生素的 RPMI-1640/ 10 % FBS 体外传代 6 代。在动物右侧腹将 5×10^6 个细胞 / 0.2 ml matrigel 皮下植入动物。

组#	治疗	小鼠#
1	介质对照, (25 mM 磷酸钠, 100 mM 氯化钠, pH 7.2), 0.2 ml/小鼠, 腹膜内注射, Q14D 治疗从第-1 天开始	20
2.	A8G3.5, 1 mg/kg/腹膜内注射, Q14D 治疗从第-1 天开始	10
3.	A8G3.5, 3 mg/kg/腹膜内注射, Q14D 治疗从第-1 天开始	10
4.	A8G3.5, 10 mg/kg/腹膜内注射, Q14D 治疗从第-1 天开始	10
5.	顺铂, 2 mg/kg/皮下注射, 3 x/wk (M, W, F)共六次 治疗从第 1 天开始	10

10 测试方案

第-1 天：将小鼠随机分为对照和治疗组。记录动物初始体重。向抗体组施用第一次治疗。制备计量溶液。治疗对技术人员保密直至试验结束。

第 0 天：植入肿瘤。在植入小鼠的肿瘤上浇注细菌培养物。

第 1 天：向阳性化疗组施加第一次治疗。

- 15 第 4 天：在 matrigel 上记录初始肿瘤大小测量值作为肿瘤基线。继续记录小鼠的肿瘤大小及体重，每周 2 次。监测每日研究，记录动物的任何反常表现。

终点： 初始体重
肿瘤大小及体重测量值

实施例 7: 体内种间移植肿瘤模型— 阻断 EGF-样结构域的抗-Cripto 抗体

为了评估 NCCIT 的应答, 将可结合 Cripto 的 EGF-样结构域的抗体皮下植入人睾丸肿瘤细胞系。试验方法如下。结果示于图 2。

5 方法和材料

动物: 使用无胸腺雄性裸鼠。用耳朵打孔的方式逐个编号动物。

10 肿瘤: NCCIT, 纵隔混合的生殖细胞, 最初获自美国典型培养物保藏中心的人睾丸癌体外细胞系。细胞系用不加抗生素的 RPMI-1640/ 10% FBS 体外传代 6 代。在动物右侧腹将 5×10^6 个细胞 / 0.2 ml matrigel 皮下植入动物。

组#	治疗	小鼠#
1	介质对照, (25 mM 磷酸钠, 100 mM 氯化钠, pH 7.2), 0.2 ml/小鼠, 腹膜内注射, Q14D 治疗从第-1 天开始	18
2.	A27F6.1, 1 mg/kg/腹膜内注射, Q14D 治疗始于第-1 天, 荷载剂量 2.6 mg/kg/小鼠	10
3.	A27F6.1, 10 mg/kg/腹膜内注射, Q14D 治疗从第-1 天开始, 荷载剂量 21.2 mg/kg/小鼠	10
4.	顺铂, 2 mg/kg/皮下注射, 3 x/wk (M, W, F)共六次 治疗从第 1 天开始	10

测试方案

第-1 天: 将小鼠随机分为对照和治疗组。记录动物初始体重。向抗体组施用第一次治疗。制备计量溶液。治疗对技术人员保密直至试验结束。

15 第 0 天: 植入肿瘤。在植入小鼠的肿瘤上浇注细菌培养物。采样的 24 小时和 48 小时后, 细菌培养物为污染物阴性。

第 1 天: 向阳性化疗组施加第一次治疗。

20 第 4 天: 在 matrigel 上记录初始肿瘤大小测量值作为肿瘤基线。继续记录小鼠的肿瘤大小及体重, 每周 2 次。监测每日研究, 记录动物的任何反常表现。

终点: 初始体重

肿瘤大小及体重测量值

实施例 8: 阻断 ALK4 结合的 Cripto mabs

为了评估 Cripto-特异性单克隆抗体能否干扰 Cripto 结合活化素 I 型受体 Alk4 的能力,我们在流式细胞计量术中使用了稳定表达 Alk4 的 293 细胞系。

- 5 为了制备该细胞系,用表达 C 末端加了 HA 表位的 Alk4 的质粒和表达药物嘌呤霉素的质粒按 10: 1 的比例共转染 293 细胞。然后用嘌呤霉素筛选转染后的细胞直至集落形成。然后,挑取集落,扩增,然后用 HA 的 western 印迹试验分析 Alk4 的表达。发现与对照用的未转染 293 细胞相比,克隆 21 (293-Alk4-21)表达高水平的 Alk4。

- 10 为了用流式细胞计量术分析 Cripto-Alk4 结合,使用一种与人 IgG Fc 部分(CrdelC-Fc)融合的可溶型 Cripto (第 1-169 位氨基酸)。取约 5 μ g/ml CrdelC-Fc 或对照用 Fc 蛋白,在总体积 50 μ l 的 FACS 缓冲液(PBS 加 0.1 % BSA)中与 3 $\times 10^5$ 个 293-Alk4-21 细胞冰上孵育 30 分钟。对于含有抗- Cripto 抗体的试样而言,加细胞前,5 μ g/ml CrdelC-Fc 与 50 μ g/ml 的每一种 Cripto
- 15 抗体 (A10.B2.18, A40.G12.8, A27.F6.1, A8.H3.1, A19.A10.30, A6.F8.6, A8.G3.5, A6.C12.11)冰上预孵育。然后用 FACS 缓冲液洗涤细胞,通过用购自 Jackson Immunologics 的 R-藻红蛋白-偶联的山羊抗-人 IgG (Fc 片段特异性) 孵育细胞来检测结合后的 Fc 蛋白。然后再次洗涤样本,用含 1 % 多聚甲醛的 PBS 固定,用常规流式细胞计量方法分析。FACS 的结果图示于图 3。

- 20 上述本发明的一些实施方案下文概述,包括但不限于下述实施方案。本领域技术人员可以理解的是,在不脱离本发明实质的前题下可以对本发明的各种实施方案作出多种多样的改动和修饰。无疑所有这些修改后的实施方案都落入本发明的范围之内。

因此本申请中引述的每一出版物作为一个整体在此引入作为参考。

- <110> 比奥根公司 (Biogen, Inc.)
 米歇尔·萨尼科拉-内德尔 (Sanicola-Nadel, Michele)
 凯文·威廉斯 (Williams, Kevin)
 苏珊·希弗 (Schiffer, Susan)
 保罗·雷霍恩 (Rayhorn, Paul)
- <120> Cripto 阻断抗体及其用途
- <130> A117 PCT
- <140> 待定
 <141> 2002-04-16
- <150> 60/286,782
 <151> 2001-04-26
- <150> 60/293,020
 <151> 2001-05-17
- <150> 60/301,091
 <151> 2001-06-26
- <150> 60/367,002
 <151> 2002-03-22
- <160> 2
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo Sapien)
- <400> 1
 Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1 5 10 15
 Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
 20 25 30
 His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
 35 40 45
 Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
 50 55 60
 Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
 65 70 75 80
 Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
 85 90 95
 Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
 100 105 110
 Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys

```

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

```

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> 人 (Homo Sapien)

<400> 2

```

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

```

CR-1 的 188 个氨基酸的序列如下[SEQ ID NO: 1]:

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS
FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
GLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGICLSIQSYY

CR-3 的 188 个氨基酸的序列如下[SEQ ID NO: 2]:

MDCRKMVRFSYSVIWIMAISKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS
IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLESFCACPPSF
YGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGL
VMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLAGICLSIQSYY

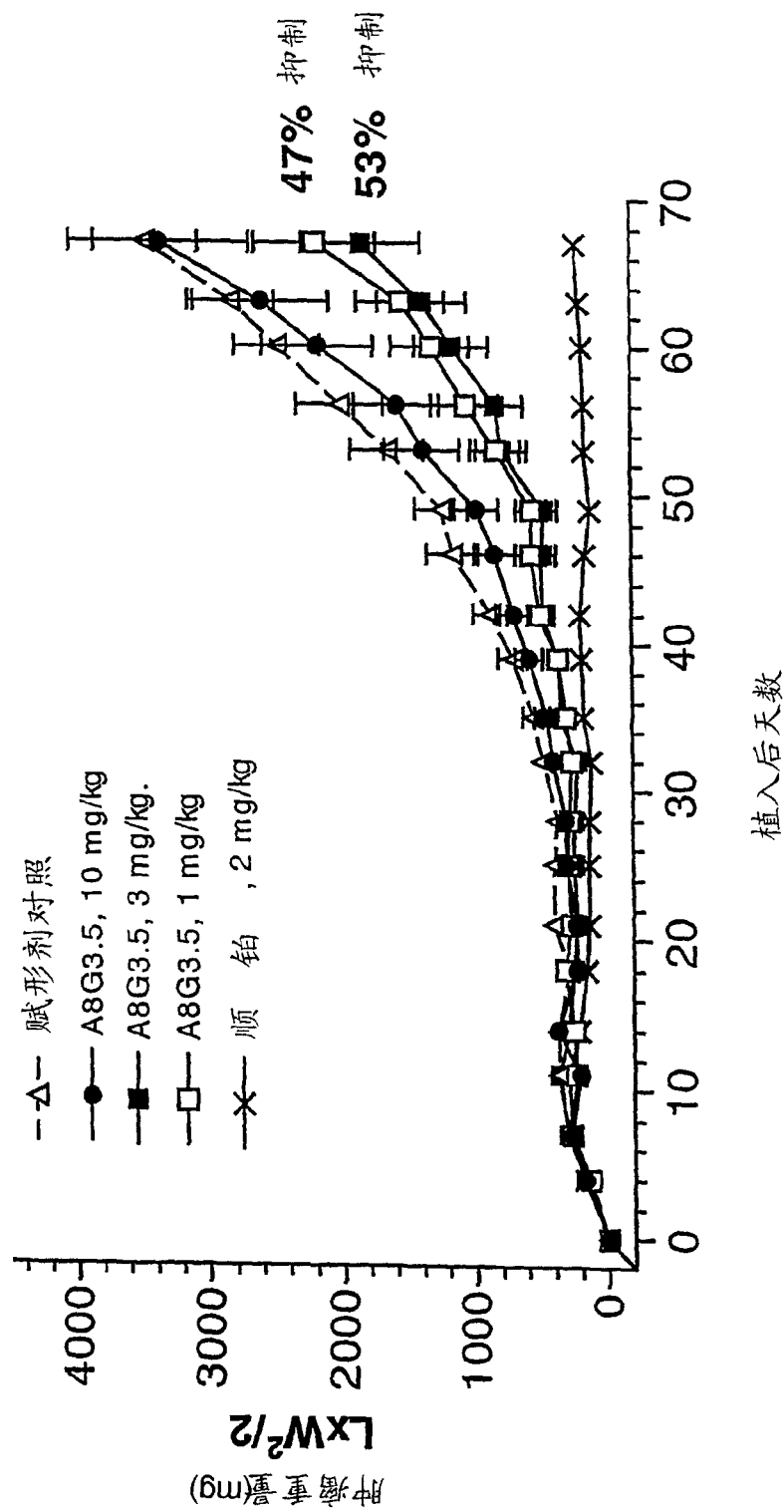


图 1 人睾丸癌细胞系NCCIT对抗-CFC阻断Cripto mAb A8G 3.5的应答

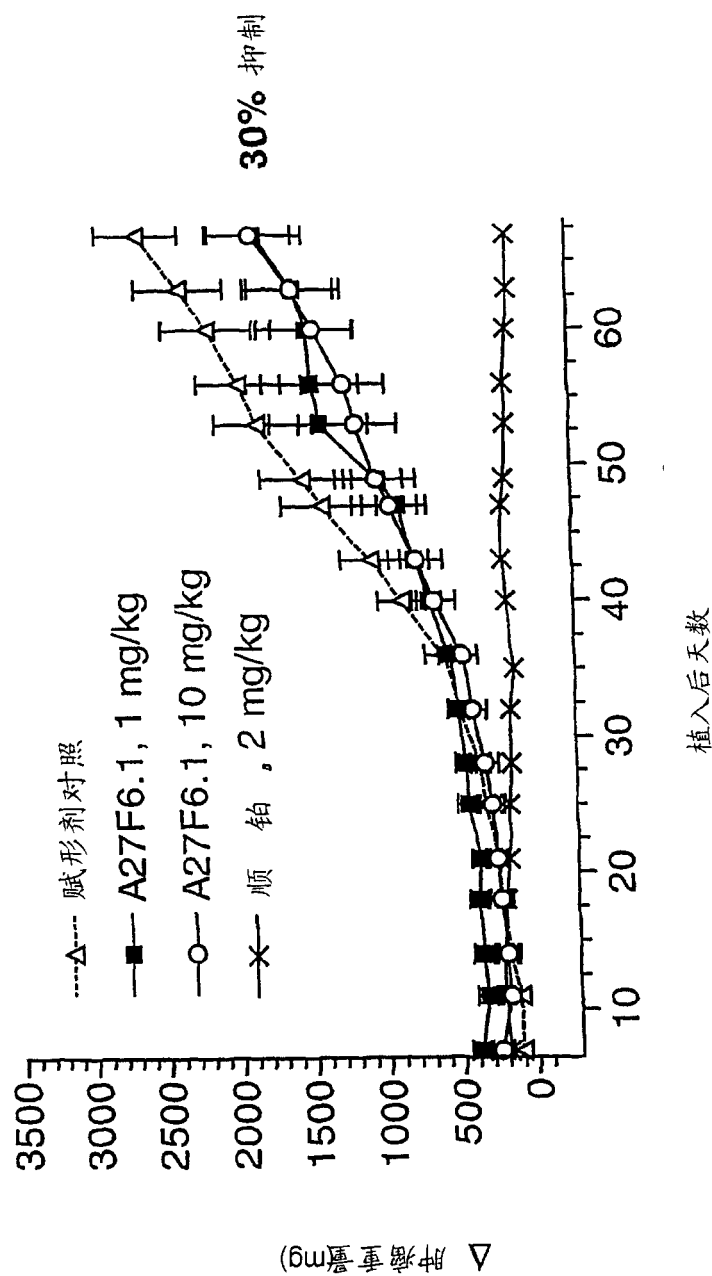


图 2 人睾丸癌细胞系NCCIT对抗-EGF阻断CripTo mAb A27F6.1的应答

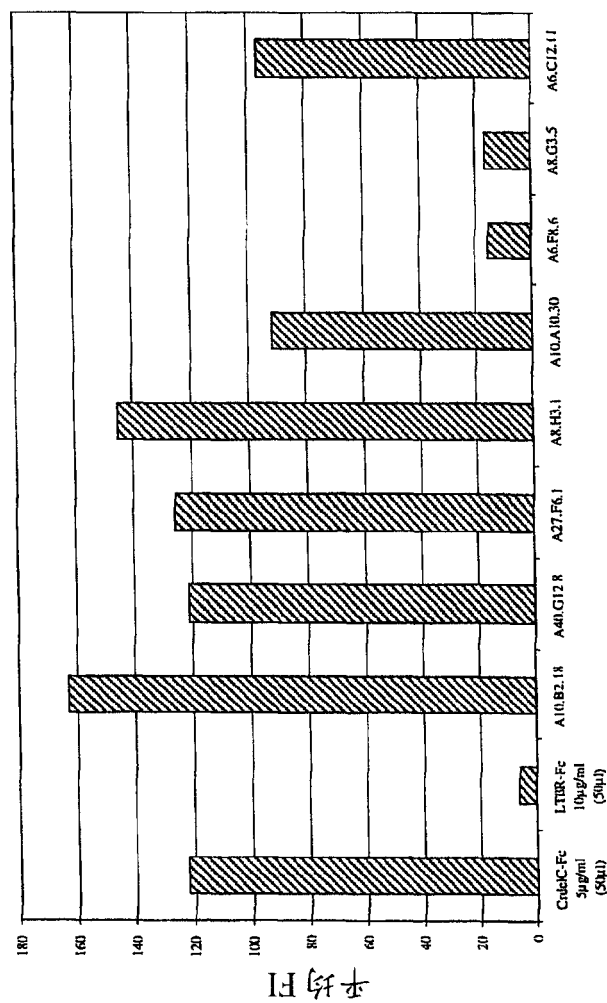


图 3 FACS: 293/ALK4细胞结合CR-Fc

专利名称(译)	CRIPTO阻断抗体及其用途		
公开(公告)号	CN1606453A	公开(公告)日	2005-04-13
申请号	CN02812887.7	申请日	2002-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	拜奥根有限公司		
申请(专利权)人(译)	比奥根公司		
当前申请(专利权)人(译)	比奥根公司		
[标]发明人	凯文·威廉斯 苏珊·希弗 保罗·霍恩		
发明人	米歇尔·萨尼科拉-内德尔 凯文·威廉斯 苏珊·希弗 保罗·霍恩		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/06 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 C07K2317/34 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2319/00 C07K2319/30		
优先权	60/286782 2001-04-26 US 60/293020 2001-05-17 US 60/301091 2001-06-26 US 60/367002 2002-03-22 US		
其他公开文献	CN100352501C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了Cripto阻断抗体，或其生物功能片段。本发明提供了可结合Cripto且能调控Cripto信号传导的抗体。本发明提供了可结合Cripto且能阻断Cripto和ALK4间相互作用的抗体。本发明提供了可结合Cripto且能调控肿瘤生长的抗体。本发明提供了可结合Cripto，调控信号传导，且能调控肿瘤生长的抗体。本发明提供了可结合Cripto，阻断Cripto和ALK4间相互作用，且能调控肿瘤生长的抗体。本发明还提供了使用这些抗体进行治疗、诊断和研究的方法。

