

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-504081

(P2010-504081A)

(43) 公表日 平成22年2月12日 (2010. 2. 12)

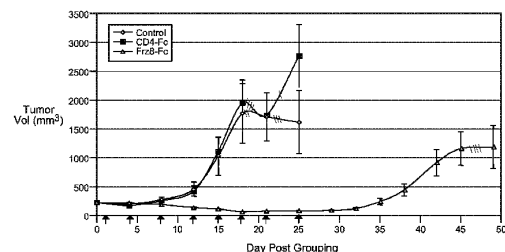
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/705 (2006. 01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/00 (2006. 01)	C 0 7 K 16/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-527577 (P2009-527577)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成19年9月7日 (2007. 9. 7)		ジェネンテック インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年4月16日 (2009. 4. 16)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/077845		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87) 国際公開番号	W02008/031009		ウェイ 1
(87) 国際公開日	平成20年3月13日 (2008. 3. 13)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/825, 063		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成18年9月8日 (2006. 9. 8)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/951, 175	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成19年7月20日 (2007. 7. 20)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アーンスト, ジェームズ エー.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
			17, サンフランシスコ, クレイトン
			ストリート 758
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 WNT拮抗抗体ならびにWNT媒介障害の診断および処置におけるWNT拮抗抗体の使用

(57) 【要約】

本発明は細胞増殖の調節に関する。より具体的には、本発明はWnt経路の阻害剤、並びにWnt経路シグナル伝達の活性化を特徴とする障害の診断および治療におけるその使用、並びにWnt経路シグナル伝達により媒介される細胞事象の調節に関する。本発明はFrizzled蛋白質、分泌Frizzled関連蛋白質又はRor蛋白質から誘導されたFrzドメイン成分、及び、Fc免疫グロブリン成分を含むキメラWnt拮抗抗体、ならびに、癌を包含する細胞性Wntシグナル伝達障害及びWnt媒介障害の治療及び診断的検出におけるその使用を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記成分：

(a) F r i z z l e d ドメイン成分、及び、

(b) F c ドメイン、

を含む W n t 拮抗体であって、

該 F r i z z l e d ドメイン成分が (i) F r i z z l e d (F r z) 蛋白質、(i i) 分泌 F r i z z l e d 関連蛋白質 (s F R P)、及び (i i i) R o r 蛋白質よりなる群から選択される蛋白質由来のポリペプチドを含み、そして、

更に W n t 拮抗体が少なくとも 1 時間インビボで活性である W n t 拮抗体。

10

【請求項 2】

前記 W n t 拮抗体が少なくとも 5 時間インビボで活性である請求項 1 記載の W n t 拮抗体。

【請求項 3】

(a) F r i z z l e d ドメイン成分、及び、

(b) F c ドメイン、

を含む W n t 拮抗体であって、

該 F r i z z l e d ドメイン成分が (i) F r i z z l e d (F r z) 蛋白質、(i i) 分泌 F r i z z l e d 関連蛋白質 (s F R P)、及び (i i i) R o r 蛋白質よりなる群から選択される蛋白質由来のポリペプチドを含み、そして、

20

更に該 W n t 拮抗体が少なくとも 1 日のインビボ半減期を有する W n t 拮抗体。

【請求項 4】

前記 W n t 拮抗体が少なくとも 2 日のインビボ半減期を有する請求項 3 記載の W n t 拮抗体。

【請求項 5】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が h F r z 1 (配列番号 18)、h F r z 2 (配列番号 19)、h F r z 3 (配列番号 20)、h F r z 4 (配列番号 21)、h F r z 5 (配列番号 22)、h F r z 6 (配列番号 23)、h F r z 7 (配列番号 24)、h F r z 8 (配列番号 25)、h F r z 9 (配列番号 26)、及び h F r z 10 (配列番号 27)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される F r z ポリペプチド由来の最小 C R D (E C D) ドメインを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

30

【請求項 6】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が s F R P 1 (配列番号 28)、s F R P 2 (配列番号 29)、s F R P 3 (配列番号 30)、s F R P 4 (配列番号 31)、及び s F R P 5 (配列番号 32)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される s F R P ポリペプチド由来の最小 C R D (E C D) ドメインを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

【請求項 7】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が h R o r 1 (配列番号 33)、及び h R o r 2 (配列番号 34)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される R o r ポリペプチド由来の最小 C R D (E C D) ドメインを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

40

【請求項 8】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が h F r z 1 (配列番号 50)、h F r z 2 (配列番号 51)、h F r z 3 (配列番号 52)、h F r z 4 (配列番号 53)、h F r z 5 (配列番号 54)、h F r z 6 (配列番号 55)、h F r z 7 (配列番号 56)、h F r z 8 (配列番号 57)、h F r z 9 (配列番号 58)、及び h F r z 10 (配列番号 59)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟 F r z ポリペプチドを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

【請求項 9】

50

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が s F R P 1 (配列番号 60)、s F R P 2 (配列番号 61)、s F R P 3 (配列番号 62)、s F R P 4 (配列番号 63)、及び s F R P 5 (配列番号 64)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟 s F r p ポリペプチドを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

【請求項 10】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が h R o r 1 (配列番号 65)、及び h R o r 2 (配列番号 66)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟 R o r ポリペプチドを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

【請求項 11】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が h F r z 1 (配列番号 35)、h F r z 2 (配列番号 36)、h F r z 3 (配列番号 37)、h F r z 4 (配列番号 38)、h F r z 5 (配列番号 39)、h F r z 6 (配列番号 40)、h F r z 7 (配列番号 41)、h F r z 8 (配列番号 42)、h F r z 9 (配列番号 43)、及び h F r z 10 (配列番号 44)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロ F r z ポリペプチドを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

10

【請求項 12】

前記 F r i z z l e d ドメイン成分が s F R P 1 (配列番号 45)、s F R P 2 (配列番号 46)、s F R P 3 (配列番号 47)、s F R P 4 (配列番号 48)、及び s F R P 5 (配列番号 49)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロ s F r p ポリペプチドを含む請求項 1～4 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

20

【請求項 13】

F c 成分が I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 よりなる群から選択される免疫グロブリンに由来する請求項 1～12 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

【請求項 14】

F c が I g G 1 免疫グロブリンに由来する請求項 13 に記載の W n t 拮抗体。

【請求項 15】

前記 F c が配列番号 67 又は配列番号 68 に示す F c 配列を含む請求項 14 に記載の W n t 拮抗体。

【請求項 16】

F r i z z l e d ドメイン成分を F c ドメインに連結するリンカーを更に含む請求項 1～15 の何れかに記載の W n t 拮抗体。

30

【請求項 17】

前記リンカーが E S G G G G V T (配列番号 69)、L E S G G G G V T (配列番号 70)、G R A Q V T (配列番号 71)、W R A Q V T (配列番号 72)、及び A R G R A Q V T (配列番号 73) よりなる群から選択されるペプチドを含む請求項 16 に記載の W n t 拮抗体。

【請求項 18】

【化 33】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88).

40

よりなる群から選択されるポリペプチドを含む W n t 拮抗体。

【請求項 19】

少なくとも 1 つの製薬上許容しうる担体又は賦形剤及び請求項 1～18 の何れかに記載の W n t 拮抗体の何れかを含む組成物。

【請求項 20】

50

請求項 1 ～ 1 8 に記載の W n t 拮抗体の何れかをコードする核酸配列。

【請求項 2 1】

核酸が作動可能に連結している制御配列を含有するベクターを更に含む請求項 2 0 に記載の核酸。

【請求項 2 2】

宿主細胞を更に含む請求項 2 1 に記載のベクター。

【請求項 2 3】

哺乳動物、昆虫、大腸菌及び酵母細胞よりなる群から選択される請求項 2 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 9 に記載の組成物及び容器を含む製造物品であって、W n t 拮抗体は容器内に含有され、そして該容器は更に (a) 該容器に固定されたラベル、又は (b) W n t 媒介障害の治療処置又は診断検出のための組成物の使用を指示する W n t 拮抗体の使用に言及した該容器内の添付文書 (パッケージインサート) を含む製造物品。

【請求項 2 5】

有効量の請求項 1 ～ 1 8 に記載の W n t 拮抗体の何れかに細胞を接触させることを含む細胞における W n t シグナル伝達を阻害する方法。

【請求項 2 6】

前記細胞が哺乳動物内に含有され、そして投与される量が治療有効量である請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 W n t シグナル伝達が体細胞突然変異を介した W n t シグナル伝達成分の活性化に起因する請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

W n t シグナル伝達の阻害は、細胞の増殖の阻害をもたらす請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記細胞が癌細胞である請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

W n t 媒介障害をそれに罹患した哺乳動物において治療する方法であって、治療有効量の請求項 1 ～ 1 8 の何れかに記載の W n t 拮抗体を哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 3 1】

前記障害が異常な W n t シグナル伝達活性に関連する細胞増殖性障害である請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記異常な W n t シグナル伝達活性が W n t 蛋白質の増大した発現に起因する請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記細胞増殖性障害が癌である請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記癌が結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、白血病、神経膠腫、及び髄芽細胞腫よりなる群から選択される請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 1 8 の何れかに記載の W n t 拮抗体に試料を接触させることを含む、W n t 蛋白質の存在を検出するための方法であって、(a) 複合体の存在、又は (b) F z / F c 拮抗体と W n t 蛋白質との間の結合レベルが W n t 蛋白質及び／又はシグナル伝達の存在を示す方法。

【請求項 3 6】

更に W n t シグナル伝達のレベルが異常であるかどうかを決定することを含み、更に試料中の結合レベルを生理学的に正常な W n t シグナル伝達を有することが分かっている第 2 の試料中のレベルと比較することを含み、試料中の結合のレベルが第 2 の試料中の結合

10

20

30

40

50

のレベルより高値又は低値であることが異常なW n t シグナル伝達を示すものである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記異常なW n t シグナル伝達が更にW n t 媒介障害の存在を示すものである請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記W n t 媒介障害が癌である請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

有効量の請求項 1 ～ 1 8 の何れかに記載のW n t 拮抗体に細胞を接触させることを含む、活性化された、又は過剰なW n t シグナル伝達を特徴とする細胞におけるW n t 標的遺伝子の発現を調節する方法。 10

【請求項 4 0】

治療有効量の請求項 1 ～ 1 8 の何れかに記載のW n t 拮抗体を投与することを含む、W n t 媒介癌を治療処置する方法であって、拮抗体の投与が、何れのその後の癌のサイズ増大又は重症度の進行を停止させる方法。

【請求項 4 1】

前記W n t 拮抗体の投与が癌のサイズ又は重症度の低減をもたらす請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記W n t 拮抗体の投与が癌の腫瘍負荷量を低減する請求項 4 0 に記載の方法。 20

【請求項 4 3】

前記W n t 拮抗体の投与が癌を殺傷する請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 4】

細胞増殖性障害の治療のための医薬の製造におけるW n t 拮抗体の使用であって、該W n t 拮抗体が：

(a) F r i z z l e d ドメイン成分、及び、

(b) F c ドメイン、

を含み、

該F r i z z l e d ドメイン成分が (i) F r i z z l e d (F r z) 蛋白質、(i i) 分泌F r i z z l e d 関連蛋白質 (s F R P)、及び (i i i) R o r 蛋白質よりなる群から選択される蛋白質に由来するポリペプチドを含み、そして、 30

更に該W n t 拮抗体が少なくとも 1 時間インビボで活性である使用。

【請求項 4 5】

前記W n t 拮抗体が少なくとも 5 時間インビボで活性である請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 4 6】

細胞増殖性障害の治療のための医薬の製造におけるW n t 拮抗体の使用であって、該W n t 拮抗体が：

(a) F r i z z l e d ドメイン成分、及び、

(b) F c ドメイン、

を含み、 40

該F r i z z l e d ドメイン成分が (i) F r i z z l e d (F r z) 蛋白質、(i i) 分泌F r i z z l e d 関連蛋白質 (s F R P)、及び (i i i) R o r 蛋白質よりなる群から選択される蛋白質に由来するポリペプチドを含み、そして、

更に該W n t 拮抗体が少なくとも 1 日のインビボ半減期を有する上記使用。

【請求項 4 7】

前記W n t 拮抗体が少なくとも 2 日のインビボ半減期を有する請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記F r i z z l e d ドメイン成分を前記F c ドメインに連結するリンカーを更に含む請求項 4 4 ～ 4 7 の何れかに記載の使用。 50

【請求項 49】

前記リンカーが E S G G G V T (配列番号 69)、L E S G G G V T (配列番号 70)、G R A Q V T (配列番号 71)、W R A Q V T (配列番号 72)、及び A R G R A Q V T (配列番号 73) よりなる群から選択されるペプチドである請求項 48 に記載の使用。

【請求項 50】

前記細胞増殖性障害が癌である請求項 44～49 の何れかに記載の使用。

【請求項 51】

前記癌が結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、白血病、神経膠腫、及び髄芽細胞腫よりなる群から選択される請求項 50 に記載の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願

本願は、2006年9月8日に出願された米国仮特許出願第60/825,063号および2007年7月20日に出願された同第60/951,175号に対する優先権および利益を主張する。米国仮特許出願第60/825,063号および同第60/951,175号の両方は、本明細書中にその全体が参考として援用される。

【0002】

発明の分野

20

本発明は概して細胞増殖の調節に関する。より具体的には、本発明はWnt経路の阻害剤、並びにWnt経路シグナル伝達の活性化を特徴とする障害の診断および治療におけるその使用、並びにWnt経路シグナル伝達により媒介される細胞事象の調節に関する。

【背景技術】

【0003】

Wntシグナル伝達経路の発癌との関連は特定のネズミ乳腺腫瘍における早期の観察及び実験の結果として開始された。Wnt-1プロトオンコジーンはウィルスDNA配列の挿入によりマウス乳腺腫瘍ウィルス(MMTV)により誘導される乳腺腫瘍から当初は見られている。非特許文献1。そのようなウィルス組み込みの結果は腫瘍の形成をもたらすInt-1の未調節発現であった。非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4。その後の配列分析によれば、Int-1は発生に関与することが示唆されていたショウジョウバエの遺伝子であるWingless(Wg)の哺乳動物相同体であったことが明らかにされ、そして用語はそこで組み合わせられ、この蛋白質ファミリーを識別するために「Wnt」が造語された。

30

【0004】

分泌リガンドのヒトWnt遺伝子ファミリーは現在では少なくとも19メンバーが計上されている(例えば

【0005】

【化1】

40

Wnt-1 (参照配列 NM_005430), Wnt-2 (参照配列 NM_003391), Wnt-2B (Wnt-13) (参照配列 NM_004185), Wnt-3 (ReSeq. : NM_030753), Wnt3a (参照配列 NM_033131), Wnt-4 (参照配列 NM_030761), Wnt-5A (参照配列 NM_003392), Wnt-5B (参照配列 NM_032642), Wnt-6 (参照配列 NM_006522), Wnt-7A (参照配列 NM_004625), Wnt-7B (参照配列 NM_058238), Wnt-8A (参照配列 NM_058244), Wnt-8B (参照配列

【0006】

NM_003393), Wnt-9A (Wnt-14) (参照配列 NM_003395), Wnt-9B (Wnt-15) (参照配列 NM_003396), Wnt-10A (参照配列 NM_025216), Wnt-10B (参照配列 NM_003394), Wnt-11 (参照配列 NM_004626), Wnt-16 (参照配列 NM_016087)

10

20

30

40

50

【0011】

潜在的なWnt拮抗体としての免疫グロブリンFcにカップリングさせた可溶性Frizzledドメインの使用が提案されている。非特許文献17；非特許文献18。しかしながら、本発明の前に、可溶性Frizzled受容体-Fc融合治療薬を創る試みは成功していない。例えば、Frz8CRD(Frz(173)-Fc、配列番号113)の残基1～173に基づいた1つのそのようなキメラは準最適な効能を有しており(図12)、そしてインビボでは不安定であった(図11)。更に、Frz(173)-Fcキメラは腫瘍体積の増大の速度を低減したのみであった(開始腫瘍体積の縮小とは逆)。更に、Fc融合物の創生は一般的には生じる構築物のインビボの安定性を向上させるための1つの手法として知られているが、効果的な治療用のFc構築物の作成は多くの問題、例えば新しい蛋白質構築物の不適切な蛋白質折り畳み及び標的に対する融合構築物の立体障害のために困難となる場合がある。

10

【0012】

即ち、Wntリガンド誘導細胞シグナル伝達を阻害するように作用する増大したインビボの安定性を有するWnt拮抗体治療薬が必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

- 【非特許文献1】Nusse等、Cell 1982；31：99-109
- 【非特許文献2】Vanooyen, A. 等、Cell 1984；39：233-240
- 【非特許文献3】Nusse, R. 等、Nature 1984；307：131-136
- 【非特許文献4】Tsukamoto等、Cell 1988；55：619-625
- 【非特許文献5】McMahon, AP等、Trends Genet. 1992；8：236-242
- 【非特許文献6】Miller, JR. Genome Biol. 2002；3(1)：3001. 1-3001. 15
- 【非特許文献7】Willert, K. 等、Nature 2003；423：448-52
- 【非特許文献8】Ingham, P. W. Trends Genet. 1996；12：382-384
- 【非特許文献9】Yang Snyder, J. 等、Curr. Biol. 1996；6：1320-1306
- 【非特許文献10】Bhanot, P. 等、Nature 1996；382：225-230
- 【非特許文献11】Huang等、Genome Biol. 2004；5：234. 1-234. 8
- 【非特許文献12】Peifer, M. 等、Development 1994；120：369-380
- 【非特許文献13】Papkoff, J. 等、Mol. Cell Biol. 1996；16：2128-2134
- 【非特許文献14】Veeman, M. T. 等、Dev. Cell 2003；5：367-377
- 【非特許文献15】Ilyas, M. J. Pathol. 2005；205：130-144
- 【非特許文献16】Dann等、Nature 412：86-90(2991)
- 【非特許文献17】Therapeutic Opportunities of the Wnt Signaling Pathway in Cancer, New York Academy of Sciences, Oct. 25, 2005
- 【非特許文献18】Hsieh, J-C. 等、PNAS, 96：3546-3551(1999)

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は組成物、及び癌などのWnt媒介障害を診断および治療する方法における、そして細胞性Wntシグナル伝達を阻害する場合におけるそれらの使用を提供する。具体的には、本発明はFrizzled (Frz) 蛋白質、Frizzled関連蛋白質 (sFRP) 又は他の蛋白質 (例えばRor-1、-2等)、及び免疫グロブリンFcドメインから誘導されるポリペプチドなどのFrizzledドメイン成分を含むキメラ分子であるWnt拮抗体、及びWnt媒介障害を診断及び治療する方法における、そして細胞性Wntシグナル伝達を阻害する場合におけるそれらの使用を提供する。

10

【0015】

本発明の1つの態様は、Frizzledドメイン成分及びFcドメインを含むWnt拮抗体を提供する。Wnt拮抗体のFrizzledドメイン成分はFrz蛋白質、FRP蛋白質、又はRor蛋白質から誘導されるポリペプチドを含む。1つの実施形態において、Wnt拮抗体は少なくとも1時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも5時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも1日のインビボ半減期を有する。更に別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも2日のインビボ半減期を有する。

【0016】

更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はhFrz1 (配列番号18)、hFrz2 (配列番号19)、hFrz3 (配列番号20)、hFrz4 (配列番号21)、hFrz5 (配列番号22)、hFrz6 (配列番号23)、hFrz7 (配列番号24)、hFrz8 (配列番号25)、hFrz9 (配列番号26)、及びhFrz10 (配列番号27)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるFrzポリペプチド由来の最小CRD (ECD) ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はsFRP1 (配列番号28)、sFRP2 (配列番号29)、sFRP3 (配列番号30)、sFRP4 (配列番号31)、及びsFRP5 (配列番号32)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるsFRPポリペプチド由来の最小CRD (ECD) ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はhRor1 (配列番号33)、及びhRor2 (配列番号34)、及びそれらの活性な変異体よりなる群から選択されるRorポリペプチド由来の最小CRD (ECD) ドメインを含む。

20

30

【0017】

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1 (配列番号50)、hFrz2 (配列番号51)、hFrz3 (配列番号52)、hFrz4 (配列番号53)、hFrz5 (配列番号54)、hFrz6 (配列番号55)、hFrz7 (配列番号56)、hFrz8 (配列番号57)、hFrz9 (配列番号58)、及びhFrz10 (配列番号59)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Frzポリペプチド、又はsFRP1 (配列番号60)、sFRP2 (配列番号61)、sFRP3 (配列番号62)、sFRP4 (配列番号63)、及びsFRP5 (配列番号64)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟sFrpポリペプチド、又はhRor1 (配列番号65)、及びhRor2 (配列番号66)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Rorポリペプチドを含む。

40

【0018】

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1 (配列番号35)、hFrz2 (配列番号36)、hFrz3 (配列番号37)、hFrz4 (配列番号38)、hFrz5 (配列番号39)、hFrz6 (配列番号40)、hFrz7 (配列番号41)、hFrz8 (配列番号42)、hFrz9 (配列番号43)、及びhFrz10 (配列番号44)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロFrzポリペプチド、又はsFRP1 (配列番号45)、sFRP2 (配列番号46)、s

50

FRP3 (配列番号47)、sFRP4 (配列番号48)、及びsFRP5 (配列番号49)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロsFrppポリペプチドを含む。

【0019】

1つの実施形態において、Wnt拮抗体はIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4よりなる群から選択される免疫グロブリンから誘導されるFc成分を含む。別の実施形態においては、FcはIgG1免疫グロブリンから誘導される。更に別の実施形態においては、Fc配列は配列番号67又は配列番号68に示すFc配列を含む。

【0020】

1つの実施形態において、Wnt拮抗体は更に、Frizzledドメイン成分をFcドメインに連結するリンカーを含む。1つのそのような実施形態において、リンカーはESGGGVVT (配列番号69)、LESGGGGVVT (配列番号70)、GRAQVT (配列番号71)、WRAQVT (配列番号72)、及びARGRAQVT (配列番号73)などのペプチドリリンカーである。

【0021】

特定の実施形態においては、Wnt拮抗体は

【0022】

【化3】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88).

よりなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0023】

本発明の別の態様は少なくとも1つの製薬上許容しうる担体又は賦形剤及び上記したWnt拮抗体を含む組成物を提供する。

【0024】

本発明の更に別の態様は上記したWnt拮抗体の何れかをコードする核酸配列を提供する。1つの実施形態において、Wnt拮抗体をコードする核酸は更に、核酸が作動可能に連結する制御配列を含有するベクターを含む。別の実施形態においては、ベクターは哺乳動物、昆虫、大腸菌、又は酵母細胞などの宿主細胞中に含有される。

【0025】

本発明の別の態様は少なくとも1つの製薬上許容しうる担体又は賦形剤、及び上記したWnt拮抗体を含む製造物品を提供し、該Wnt拮抗体は容器中に含有され、該容器は更に(a)容器に固定されたラベル、又は(b)Wnt媒介障害の治療処置又は診断検出のための組成物の使用を指示するWnt拮抗体の使用に言及した容器内部の添付文書(パッケージインサート)を含む。

【0026】

本発明の更に別の態様は、Frizzledドメイン成分及びFcドメインを含む有効量のWnt拮抗体に細胞を接触させることを含む、細胞におけるWntシグナル伝達を阻害する方法を提供する。Wnt拮抗体のFrizzledドメイン成分はFrz蛋白質、FRP蛋白質、又はRor蛋白質から誘導されるポリペプチドを含む。1つの実施形態において、Wnt拮抗体は少なくとも1時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも5時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも1日のインビボ半減期を有する。更に別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも2日のインビボ半減期を有する。

【0027】

この態様の更なる実施形態において、F r i z z l e dドメイン成分はh F r z 1（配列番号18）、h F r z 2（配列番号19）、h F r z 3（配列番号20）、h F r z 4（配列番号21）、h F r z 5（配列番号22）、h F r z 6（配列番号23）、h F r z 7（配列番号24）、h F r z 8（配列番号25）、h F r z 9（配列番号26）、及びh F r z 10（配列番号27）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるF r zポリペプチド由来の最小C R D（E C D）ドメインを含む。なお更なる実施形態において、F r i z z l e dドメイン成分はs F R P 1（配列番号28）、s F R P 2（配列番号29）、s F R P 3（配列番号30）、s F R P 4（配列番号31）、及びs F R P 5（配列番号32）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるs F R Pポリペプチド由来の最小C R D（E C D）ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、F r i z z l e dドメイン成分はh R o r 1（配列番号33）、及びh R o r 2（配列番号34）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるR o rポリペプチド由来の最小C R D（E C D）ドメインを含む。

10

【0028】

なお更なる実施形態においては、F r i z z l e dドメイン成分は（配列番号50）、h F r z 2（配列番号51）、h F r z 3（配列番号52）、h F r z 4（配列番号53）、h F r z 5（配列番号54）、h F r z 6（配列番号55）、h F r z 7（配列番号56）、h F r z 8（配列番号57）、h F r z 9（配列番号58）、及びh F r z 10（配列番号59）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟F r zポリペプチド、又はs F R P 1（配列番号60）、s F R P 2（配列番号61）、s F R P 3（配列番号62）、s F R P 4（配列番号63）、及びs F R P 5（配列番号64）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟s F r pポリペプチド、又はh R o r 1（配列番号65）、及びh R o r 2（配列番号66）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟R o rポリペプチドを含む。

20

【0029】

なお更なる実施形態において、F r i z z l e dドメイン成分はh F r z 1（配列番号35）、h F r z 2（配列番号36）、h F r z 3（配列番号37）、h F r z 4（配列番号38）、h F r z 5（配列番号39）、h F r z 6（配列番号40）、h F r z 7（配列番号41）、h F r z 8（配列番号42）、h F r z 9（配列番号43）、及びh F r z 10（配列番号44）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロF r zポリペプチド、又はs F R P 1（配列番号45）、s F R P 2（配列番号46）、s F R P 3（配列番号47）、s F R P 4（配列番号48）、及びs F R P 5（配列番号49）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロs F R Pポリペプチドを含む。

30

【0030】

1つの実施形態において、W n t拮抗体はI g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4よりなる群から選択される免疫グロブリンから誘導されるF c成分を含む。別の実施形態においては、F cはI g G 1免疫グロブリンから誘導される。更に別の実施形態においては、F c配列は配列番号67又は配列番号68に示される。

【0031】

1つの実施形態において、W n t拮抗体は更に、F r i z z l e dドメイン成分をF cドメインに連結するリンカーを含む。1つの実施形態において、リンカーはE S G G G V T（配列番号69）、L E S G G G G V T（配列番号70）、G R A Q V T（配列番号71）、W R A Q V T（配列番号72）、及びA R G R A Q V T（配列番号73）などのペプチドリinkerである。

40

【0032】

特定の実施形態においては、W n t拮抗体は

【0033】

【化 4】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88).

よりなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0034】

10

本方法の1つの実施形態において、細胞は哺乳動物内に含有され、そして投与される量は治療有効量である。別の実施形態においては、Wntシグナル伝達は体細胞突然変異を介したWntシグナル伝達成分の活性化に起因する。別の実施形態においては、Wntシグナル伝達の阻害は細胞の成長の阻害をもたらす。更に別の実施形態においては、細胞は癌細胞である。

【0035】

本発明の別の態様はWnt媒介障害をそれに罹患した哺乳動物において治療する方法であって、Frizzledドメイン成分及びFcドメインを含む治療有効量のWnt拮抗体を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。Wnt拮抗体のFrizzledドメイン成分はFrz蛋白質、FRP蛋白質、又はRor蛋白質から誘導されるポリペプチドを含む。1つの実施形態において、Wnt拮抗体は少なくとも1時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも5時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも1日のインビボ半減期を有する。更に別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも2日のインビボ半減期を有する。

20

【0036】

この態様の別の実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1 (配列番号18)、hFrz2 (配列番号19)、hFrz3 (配列番号20)、hFrz4 (配列番号21)、hFrz5 (配列番号22)、hFrz6 (配列番号23)、hFrz7 (配列番号24)、hFrz8 (配列番号25)、hFrz9 (配列番号26)、及びhFrz10 (配列番号27)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるFrzポリペプチド由来の最小CRD (ECD) ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はsFRP1 (配列番号28)、sFRP2 (配列番号29)、sFRP3 (配列番号30)、sFRP4 (配列番号31)、及びsFRP5 (配列番号32)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるsFRPポリペプチド由来の最小CRD (ECD) ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はhRor1 (配列番号33)、及びhRor2 (配列番号34)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるRorポリペプチド由来の最小CRD (ECD) ドメインを含む。

30

【0037】

40

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分は (配列番号50)、hFrz2 (配列番号51)、hFrz3 (配列番号52)、hFrz4 (配列番号53)、hFrz5 (配列番号54)、hFrz6 (配列番号55)、hFrz7 (配列番号56)、hFrz8 (配列番号57)、hFrz9 (配列番号58)、及びhFrz10 (配列番号59)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Frzポリペプチド、又はsFRP1 (配列番号60)、sFRP2 (配列番号61)、sFRP3 (配列番号62)、sFRP4 (配列番号63)、及びsFRP5 (配列番号64)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟sFrpポリペプチド、又はhRor1 (配列番号65)、及びhRor2 (配列番号66)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Rorポリペプチドを含む。

50

【0038】

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1（配列番号35）、hFrz2（配列番号36）、hFrz3（配列番号37）、hFrz4（配列番号38）、hFrz5（配列番号39）、hFrz6（配列番号40）、hFrz7（配列番号41）、hFrz8（配列番号42）、hFrz9（配列番号43）、及びhFrz10（配列番号44）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロFrzポリペプチド、又はsFRP1（配列番号45）、sFRP2（配列番号46）、sFRP3（配列番号47）、sFRP4（配列番号48）、及びsFRP5（配列番号49）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロsFrpポリペプチドを含む。

10

【0039】

1つの実施形態において、Wnt拮抗体はIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4よりなる群から選択される免疫グロブリンから誘導されるFc成分を含む。別の実施形態においては、FcはIgG1免疫グロブリンから誘導される。なお更なる実施形態においては、Fc配列は配列番号67又は配列番号68に示される。

【0040】

1つの実施形態において、Wnt拮抗体は更に、Frizzledドメイン成分をFcドメインに連結するリンカーを含む。1つの実施形態において、リンカーはESGGGVV（配列番号69）、LESGGGGVV（配列番号70）、GRAQVT（配列番号71）、WRAQVT（配列番号72）、及びARGRAQVT（配列番号73）などのペプチドリンカーである。

20

【0041】

特定の実施形態においては、Wnt拮抗体は

【0042】

【化5】

Frz8-Fc（配列番号 74）、Frz5-Fc（配列番号 75）、Frz1-Fc（配列番号 76）、Frz2-Fc（配列番号 77）、Frz3-Fc（配列番号 78）、Frz4-Fc（配列番号 79）、Frz6-Fc（配列番号 80）、Frz7-Fc（配列番号 81）、Frz9-Fc（配列番号 82）、Frz10-Fc（配列番号 83）、sFRP1-Fc（配列番号 84）、sFRP2（配列番号 85）、sFRP3-Fc（配列番号 86）、sFRP4-Fc（配列番号 87）、および sFRP5-Fc（配列番号 88）。

30

よりなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0043】

本方法の1つの実施形態において、障害は異常なWntシグナル伝達活性に関連する細胞増殖性障害である。別の実施形態においては、異常なWntシグナル伝達活性はWnt蛋白質の増大した発現に起因する。更に別の実施形態においては、細胞増殖性障害は癌、例えば結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、白血病、神経膠腫、及び髄芽細胞腫である。

【0044】

本発明のさらに別の態様は上記したWnt拮抗体に試料を接触させることを含む、Wnt蛋白質の存在を検出するための方法であって、複合体の存在、又はWnt拮抗体とWnt蛋白質との間の結合レベルが、Wnt蛋白質及び／又はシグナル伝達の存在を示す方法を提供する。1つの実施形態において、方法は更にWntシグナル伝達のレベルが異常であるかどうかを決定することを含み、方法は更に試料中の結合レベルを生理学的に正常なWntシグナル伝達を有することが分かっている第2の試料中のレベルと比較することを含む。試料中の結合のレベルが第2の試料中のものより高値又は低値であることは異常なWntシグナル伝達を示す。更に別の実施形態においては、異常なWntシグナル伝達は更にWnt媒介障害、例えば癌の存在を示す。

40

【0045】

本発明の別の態様は、有効量の上記Wnt拮抗体に細胞を接触させることを含む、活性

50

化された、又は過剰なWntシグナル伝達を特徴とする細胞におけるWnt標的遺伝子の発現を調節する方法を提供する。

【0046】

本発明の更に別の態様は、Frizzledドメイン成分及びFcドメインを含む、治療有効量のWnt拮抗体を投与することを含む、Wnt媒介癌を治療処置する方法を提供する。Wnt拮抗体のFrizzledドメイン成分はFrz蛋白質、FRP蛋白質、又はRor蛋白質から誘導されるポリペプチドを含む。1つの実施形態において、Wnt拮抗体は少なくとも1時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも5時間インビボで活性である。別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも1日のインビボ半減期を有する。更に別の実施形態においては、Wnt拮抗体は少なくとも2日のインビボ半減期を有する。

10

【0047】

この態様の更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1（配列番号18）、hFrz2（配列番号19）、hFrz3（配列番号20）、hFrz4（配列番号21）、hFrz5（配列番号22）、hFrz6（配列番号23）、hFrz7（配列番号24）、hFrz8（配列番号25）、hFrz9（配列番号26）、及びhFrz10（配列番号27）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるFrzポリペプチド由来の最小CRD（ECD）ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はsFRP1（配列番号28）、sFRP2（配列番号29）、sFRP3（配列番号30）、sFRP4（配列番号31）、及びsFRP5（配列番号32）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるsFRPポリペプチド由来の最小CRD（ECD）ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、Frizzledドメイン成分はhRor1（配列番号33）、及びhRor2（配列番号34）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるRorポリペプチド由来の最小CRD（ECD）ドメインを含む。

20

【0048】

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分は（配列番号50）、hFrz2（配列番号51）、hFrz3（配列番号52）、hFrz4（配列番号53）、hFrz5（配列番号54）、hFrz6（配列番号55）、hFrz7（配列番号56）、hFrz8（配列番号57）、hFrz9（配列番号58）、及びhFrz10（配列番号59）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Frzポリペプチド、又はsFRP1（配列番号60）、sFRP2（配列番号61）、sFRP3（配列番号62）、sFRP4（配列番号63）、及びsFRP5（配列番号64）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟sFrpポリペプチド、又はhRor1（配列番号65）、及びhRor2（配列番号66）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Rorポリペプチドを含む。

30

【0049】

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1（配列番号35）、hFrz2（配列番号36）、hFrz3（配列番号37）、hFrz4（配列番号38）、hFrz5（配列番号39）、hFrz6（配列番号40）、hFrz7（配列番号41）、hFrz8（配列番号42）、hFrz9（配列番号43）、及びhFrz10（配列番号44）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロFrzポリペプチド、又はsFRP1（配列番号45）、sFRP2（配列番号46）、sFRP3（配列番号47）、sFRP4（配列番号48）、及びsFRP5（配列番号49）、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロsFrpポリペプチドを含む。

40

【0050】

1つの実施形態において、Wnt拮抗体はIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4よりなる群から選択される免疫グロブリンから誘導されるFc成分を含む。別の実施形態においては、FcはIgG1免疫グロブリンから誘導される。更に別の実施形態において

50

は、F c 配列は配列番号 67 又は配列番号 68 に示される。

【0051】

1つの実施形態において、W n t 拮抗体は更に、F r i z z l e d ドメイン成分を F c ドメインに連結するリンカーを含む。1つの実施形態において、リンカーは E S G G G V T (配列番号 69)、L E S G G G V T (配列番号 70)、G R A Q V T (配列番号 71)、W R A Q V T (配列番号 72)、及び A R G R A Q V T (配列番号 73) などのペプチドリンカーである。

【0052】

特定の実施形態においては、W n t 拮抗体は

【0053】

【化 6】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88).

よりなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0054】

拮抗体の投与は何れかの後の癌のサイズ増大又は重症度進行を停止させる。1つの実施形態において、W n t 拮抗体の投与は癌のサイズ又は重症度の低減をもたらす。別の実施形態においては、W n t 拮抗体の投与は癌の腫瘍負荷を低減する。更に別の実施形態においては、W n t 拮抗体の投与は癌を殺傷する。

【0055】

本発明の別の態様は、細胞増殖性障害の治療のための医薬の製造における W n t 拮抗体の使用を提供する。W n t 拮抗体は F r i z z l e d ドメイン成分及び F c ドメインを含む。W n t 拮抗体の F r i z z l e d ドメイン成分は F r z 蛋白質、F R P 蛋白質、又は R o r 蛋白質から誘導されるポリペプチドを含む。1つの実施形態において、W n t 拮抗体は少なくとも 1 時間インビボで活性である。別の実施形態においては、W n t 拮抗体は少なくとも 5 時間インビボで活性である。別の実施形態においては、W n t 拮抗体は少なくとも 1 日のインビボ半減期を有する。更に別の実施形態においては、W n t 拮抗体は少なくとも 2 日のインビボ半減期を有する。

【0056】

この態様の更なる実施形態において、F r i z z l e d ドメイン成分は h F r z 1 (配列番号 18)、h F r z 2 (配列番号 19)、h F r z 3 (配列番号 20)、h F r z 4 (配列番号 21)、h F r z 5 (配列番号 22)、h F r z 6 (配列番号 23)、h F r z 7 (配列番号 24)、h F r z 8 (配列番号 25)、h F r z 9 (配列番号 26)、及び h F r z 10 (配列番号 27)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される F r z ポリペプチド由来の最小 C R D (E C D) ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、F r i z z l e d ドメイン成分は s F R P 1 (配列番号 28)、s F R P 2 (配列番号 29)、s F R P 3 (配列番号 30)、s F R P 4 (配列番号 31)、及び s F R P 5 (配列番号 32)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される s F R P ポリペプチド由来の最小 C R D (E C D) ドメインを含む。なお更なる実施形態においては、F r i z z l e d ドメイン成分は h R o r 1 (配列番号 33)、及び h R o r 2 (配列番号 34)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される R o r ポリペプチド由来の最小 C R D (E C D) ドメインを含む。

【0057】

なお更なる実施形態において、F r i z z l e d ドメイン成分は (配列番号 50)、h

10

20

30

40

50

Frz2 (配列番号51)、hFrz3 (配列番号52)、hFrz4 (配列番号53)、hFrz5 (配列番号54)、hFrz6 (配列番号55)、hFrz7 (配列番号56)、hFrz8 (配列番号57)、hFrz9 (配列番号58)、及びhFrz10 (配列番号59)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Frzポリペプチド、又はsFRP1 (配列番号60)、sFRP2 (配列番号61)、sFRP3 (配列番号62)、sFRP4 (配列番号63)、及びsFRP5 (配列番号64)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟sFrpポリペプチド、又はhRor1 (配列番号65)、及びhRor2 (配列番号66)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される成熟Rorポリペプチドを含む。

【0058】

10

なお更なる実施形態において、Frizzledドメイン成分はhFrz1 (配列番号35)、hFrz2 (配列番号36)、hFrz3 (配列番号37)、hFrz4 (配列番号38)、hFrz5 (配列番号39)、hFrz6 (配列番号40)、hFrz7 (配列番号41)、hFrz8 (配列番号42)、hFrz9 (配列番号43)、及びhFrz10 (配列番号44)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロFrzポリペプチド、又はsFRP1 (配列番号45)、sFRP2 (配列番号46)、sFRP3 (配列番号47)、sFRP4 (配列番号48)、及びsFRP5 (配列番号49)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択されるプロsFrpポリペプチドを含む。

【0059】

20

1つの実施形態において、Wnt拮抗体はIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4よりなる群から選択される免疫グロブリンから誘導されるFc成分を含む。別の実施形態においては、FcはIgG1免疫グロブリンから誘導される。更に別の実施形態においては、Fc配列は配列番号67又は配列番号68に示される。

【0060】

1つの実施形態において、Wnt拮抗体は更に、Frizzledドメイン成分をFcドメインに連結するリンカーを含む。1つの実施形態において、リンカーはESGGGVTVT (配列番号69)、LESGGGGVTVT (配列番号70)、GRAQVTVT (配列番号71)、WRAQVTVT (配列番号72)、及びARGRAQVTVT (配列番号73)などのペプチドリンカーである。

30

【0061】

特定の実施形態においては、Wnt拮抗体は

【0062】

【化7】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88).

40

よりなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0063】

1つの実施形態において、細胞増殖性障害は癌、例えば結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、白血病、神経膠腫、又は髄芽細胞腫である。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は「オフ」即ち不活性状態、並びに「オン」即ち活性状態の両方におけるカノニカルなWntシグナル伝達経路の省略された概要である。

【図2】図2はヒト免疫グロブリンドメインのFc領域に連結したFrizzled細胞

50

外ドメインを示す模式的ダイアグラムである。

【図3A】図3は17種の既知のFrizzled蛋白質細胞外ドメインのアライメントである。図3Aは10種のプロFrizzled蛋白質（配列番号35～44）及び5種のプロsFRP蛋白質（配列番号45～49）の細胞外ドメインのアライメントを示し、図3Bは10種の成熟Frizzled蛋白質（配列番号50～59）及び5種の成熟sFRP蛋白質（配列番号60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟Ror蛋白質（配列番号65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図3Bにおいて、最小CRD（ECD）ドメインは2つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号18～34）。

10

【図3A-1】図3は17種の既知のFrizzled蛋白質細胞外ドメインのアライメントである。図3Aは10種のプロFrizzled蛋白質（配列番号35～44）及び5種のプロsFRP蛋白質（配列番号45～49）の細胞外ドメインのアライメントを示し、図3Bは10種の成熟Frizzled蛋白質（配列番号50～59）及び5種の成熟sFRP蛋白質（配列番号60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟Ror蛋白質（配列番号65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図3Bにおいて、最小CRD（ECD）ドメインは2つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号18～34）。

【図3A-2】図3は17種の既知のFrizzled蛋白質細胞外ドメインのアライメントである。図3Aは10種のプロFrizzled蛋白質（配列番号35～44）及び5種のプロsFRP蛋白質（配列番号45～49）の細胞外ドメインのアライメントを示し、図3Bは10種の成熟Frizzled蛋白質（配列番号50～59）及び5種の成熟sFRP蛋白質（配列番号60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟Ror蛋白質（配列番号65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図3Bにおいて、最小CRD（ECD）ドメインは2つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号18～34）。

20

【図3B】図3は17種の既知のFrizzled蛋白質細胞外ドメインのアライメントである。図3Aは10種のプロFrizzled蛋白質（配列番号35～44）及び5種のプロsFRP蛋白質（配列番号45～49）の細胞外ドメインのアライメントを示し、図3Bは10種の成熟Frizzled蛋白質（配列番号50～59）及び5種の成熟sFRP蛋白質（配列番号60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟Ror蛋白質（配列番号65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図3Bにおいて、最小CRD（ECD）ドメインは2つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号18～34）。

30

【図3B-1】図3は17種の既知のFrizzled蛋白質細胞外ドメインのアライメントである。図3Aは10種のプロFrizzled蛋白質（配列番号35～44）及び5種のプロsFRP蛋白質（配列番号45～49）の細胞外ドメインのアライメントを示し、図3Bは10種の成熟Frizzled蛋白質（配列番号50～59）及び5種の成熟sFRP蛋白質（配列番号60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟Ror蛋白質（配列番号65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図3Bにおいて、最小CRD（ECD）ドメインは2つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号18～34）。

40

【図3B-2】図3は17種の既知のFrizzled蛋白質細胞外ドメインのアライメントである。図3Aは10種のプロFrizzled蛋白質（配列番号35～44）及び5種のプロsFRP蛋白質（配列番号45～49）の細胞外ドメインのアライメントを示し、図3Bは10種の成熟Frizzled蛋白質（配列番号50～59）及び5種の成熟sFRP蛋白質（配列番号60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟Ror蛋白質（配列番号65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図3Bにおいて、最小CRD（ECD）ドメインは2つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号18～34）。

50

成熟 sFRP 蛋白質（配列番号 60～64）の細胞外ドメインのアライメント、並びに成熟 Ror 蛋白質（配列番号 65～66）の細胞外ドメインを示す。同様の残基は灰色で囲んであり、同一の残基はアスタリスクで示している。同様の残基は、酸性、塩基性、極性及び非極性として分類している。図 3 B において、最小 CRD（ECD）ドメインは 2 つの囲まれた矢印の線の間に示す（配列番号 18～34）。

【図 4】図 4 は Frz（156）-Fc 及び Frz（173）-Fc キメラ構築物の配列を示す。図 4 A はより長い Frz（173）-Fc 配列（配列番号 113）を示す。太字で示してあるもの（即ち最初の 24 個の N 末端アミノ酸残基）はリーダースIGNAL配列である。残基 25～27 は成熟蛋白質中には存在しても不在でもよいアラニン残基である。箱で囲んだ文字で示すもの（即ち残基 157～173）はより短い（Frz156）キメラ構築物からより長い（Frz173）ものを区別する Frz8 受容体の追加配列である。リンカー配列（即ち残基 174～182）は下線を付し、Fc ドメイン配列は斜体で示す（即ち残基 183～409）。図 4 B はより短い Frz（156）-Fc（配列番号 74）を示す。太字で示してあるもの（即ち最初の 24 個の N 末端アミノ酸残基）はリーダースIGNAL配列である。残基 25～27 は成熟蛋白質中には存在しても不在でもよいアラニン残基である。リンカー配列（即ち残基 157～164）は下線を付し、Fc ドメイン配列は斜体で示す（即ち残基 165～391）。

【図 5 A】図 5 A～5 H は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す【化 8】

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。【図 5 B】図 5 A～5 H は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す【化 8】

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。【図 5 C】図 5 A～5 H は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す【化 8】

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。【図 5 D】図 5 A～5 H は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す

10

20

30

40

【化 8】

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。

【図 5 E】図 5 A～5 H は数種の W n t 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す
【化 8】 10

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。

【図 5 F】図 5 A～5 H は数種の W n t 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す
【化 8】 20

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。

【図 5 G】図 5 A～5 H は数種の W n t 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す
【化 8】 30

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。

【図 5 H】図 5 A～5 H は数種の W n t 拮抗体キメラ構築物をコードする核酸配列を示す
【化 8】 40

(Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), および sFRP5-Fc (配列番号 129)).

。

【図 6 A】図 6 A～6 E はヒト F r z、s F R P、及び R o r 蛋白質の全長アミノ酸配列 50

を示す。

【図 6 B】図 6 A～6 E はヒト Frz、sFRP、及び Ror 蛋白質の全長アミノ酸配列を示す。

【図 6 C】図 6 A～6 E はヒト Frz、sFRP、及び Ror 蛋白質の全長アミノ酸配列を示す。

【図 6 D】図 6 A～6 E はヒト Frz、sFRP、及び Ror 蛋白質の全長アミノ酸配列を示す。

【図 6 E】図 6 A～6 E はヒト Frz、sFRP、及び Ror 蛋白質の全長アミノ酸配列を示す。

【図 7 A】図 7 (A、B 及び C) は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物のアミノ酸配列を示す

10

【化 9】

(Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz8-Fc (配列番号 74), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2-Fc (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88)).

。太字による Frz1-Fc (最初の 28 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz2-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz3-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz4-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz5-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、及び sFRP-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基) は非ネイティブのリーダー配列を示す。リンカーは下線を付し、リンカーに続く Fc ドメインは斜体で示す。

20

【図 7 B】図 7 (A、B 及び C) は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物のアミノ酸配列を示す

【化 9】

(Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz8-Fc (配列番号 74), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2-Fc (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88)).

30

。太字による Frz1-Fc (最初の 28 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz2-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz3-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz4-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、Frz5-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基)、及び sFRP-Fc (最初の 31 個の N 末端アミノ酸残基) は非ネイティブのリーダー配列を示す。リンカーは下線を付し、リンカーに続く Fc ドメインは斜体で示す。

40

【図 7 C】図 7 (A、B 及び C) は数種の Wnt 拮抗体キメラ構築物のアミノ酸配列を示す

【化 9】

(Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz8-Fc (配列番号 74), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2-Fc (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88)).

。太字による **Frz1-Fc** (最初の28個のN末端アミノ酸残基)、**Frz2-Fc** (最初の31個のN末端アミノ酸残基)、**Frz3-Fc** (最初の31個のN末端アミノ酸残基)、**Frz4-Fc** (最初の31個のN末端アミノ酸残基)、**Frz5-Fc** (最初の31個のN末端アミノ酸残基)、及び**sFRP-Fc** (最初の31個のN末端アミノ酸残基)は非ネイティブのリーダー配列を示す。リンカーは下線を付し、リンカーに続くFcドメインは斜体で示す。 10

【図 8】図 8 は **Frizzled** 細胞外ドメインのアライメントを示し、ここで黒色は全受容体に渡って保存された残基を示し、灰色は相同な群に渡って保存された残基を示す。

【図 9】図 9 は全長及び細胞外ドメインの配列の実体の両方に基づいてファミリーに群分けされた **Frizzled** を示す。

【図 10】図 10 は CHO 細胞から発現及び精製された精製 **Frizzled Fc** 融合蛋白質の試料を示す。試料は非還元性 SDS-PAGE ゲルにて分離し、クーマシー染色により画像化した。 20

【図 11 A】図 11 は 2 種の異なる **Frz8-Fc** キメラ **Frz8 (173)-Fc** 及び **Frz ((156)-Fc** の血清中の安定性の比較を示す。図 11 A はキメラを注射した無胸腺ヌードマウスの血清中の漸増時点において存在しているキメラ蛋白質を検出するために使用されるヒト FC に関するイムノプロットである。図 11 B は相対的ルシフェラーゼ活性として Y 軸上に示す **TOPglow** 活性を計測することによりアッセイされるキメラ蛋白質の **Wnt** 阻害活性を示す。

【図 11 B】図 11 は 2 種の異なる **Frz8-Fc** キメラ **Frz8 (173)-Fc** 及び **Frz ((156)-Fc** の血清中の安定性の比較を示す。図 11 A はキメラを注射した無胸腺ヌードマウスの血清中の漸増時点において存在しているキメラ蛋白質を検出するために使用されるヒト FC に関するイムノプロットである。図 11 B は相対的ルシフェラーゼ活性として Y 軸上に示す **TOPglow** 活性を計測することによりアッセイされるキメラ蛋白質の **Wnt** 阻害活性を示す。 30

【図 12】図 12 は **Frz8 (173)-Fc** キメラを用いる治療から得られる経時的な腫瘍体積のグラフである。

【図 13 A】図 13 は単回用量の蛋白質の投与の後の **Frz8-Fc** に関する薬物動態 (PK) データを示す。図 13 A は 20 又は 5 mg/kg I. V. 又は 20 mg/kg I. P. の両方により得られる 7 日目以降における血清中の検出を示す **Frz8-Fc** で処置したマウス由来の未希釈血清のイムノプロットである。図 13 B 及び 13 C は薬物動態試験から求められた **Frz8-Fc** 血清中レベルのグラフによる総括である。図 13 D は **Frz8-Fc** の薬物動態の二相性モデルに関するパラメータの総括である。 40

【図 13 B】図 13 は単回用量の蛋白質の投与の後の **Frz8-Fc** に関する薬物動態 (PK) データを示す。図 13 A は 20 又は 5 mg/kg I. V. 又は 20 mg/kg I. P. の両方により得られる 7 日目以降における血清中の検出を示す **Frz8-Fc** で処置したマウス由来の未希釈血清のイムノプロットである。図 13 B 及び 13 C は薬物動態試験から求められた **Frz8-Fc** 血清中レベルのグラフによる総括である。図 13 D は **Frz8-Fc** の薬物動態の二相性モデルに関するパラメータの総括である。

【図 13 C】図 13 は単回用量の蛋白質の投与の後の **Frz8-Fc** に関する薬物動態 (PK) データを示す。図 13 A は 20 又は 5 mg/kg I. V. 又は 20 mg/kg I. P. の両方により得られる 7 日目以降における血清中の検出を示す **Frz8-Fc** で 50

処置したマウス由来の未希釈血清のイムノプロットである。図13B及び13Cは薬物動態試験から求められたFrz8-Fc血清中レベルのグラフによる総括である。図13DはFrz8-Fcの薬物動態の二相性モデルに関するパラメータの総括である。

【図13D】図13は単回用量の蛋白質の投与の後のFrz8-Fcに関する薬物動態(PK)データを示す。図13Aは20又は5mg/kg I.V.又は20mg/kg I.P.の両方により得られる7日目以降における血清中の検出を示すFrz8-Fcで処置したマウス由来の未希釈血清のイムノプロットである。図13B及び13Cは薬物動態試験から求められたFrz8-Fc血清中レベルのグラフによる総括である。図13DはFrz8-Fcの薬物動態の二相性モデルに関するパラメータの総括である。

【図14A】図14は二量体Fcドメインに連結された場合のWnt3aシグナル伝達を遮断するFrz8-ECDの増強された能力を示す。図14AはFrz8(156)-Fcの2つの異なる調製品のWnt3a阻害アッセイのIC₅₀のグラフである。図14Bは単離されたFrz8(156)CRD(ECD)の純度を確認するゲルである。示されているのは：(a)非還元Frz8ECD(レーン1)；(b)分子量マーカー(レーン2)；及び還元Frz8ECD(レーン3)である。

【図14B】図14は二量体Fcドメインに連結された場合のWnt3aシグナル伝達を遮断するFrz8-ECDの増強された能力を示す。図14AはFrz8(156)-Fcの2つの異なる調製品のWnt3a阻害アッセイのIC₅₀のグラフである。図14Bは単離されたFrz8(156)CRD(ECD)の純度を確認するゲルである。示されているのは：(a)非還元Frz8ECD(レーン1)；(b)分子量マーカー(レーン2)；及び還元Frz8ECD(レーン3)である。

【図15A】図15はFrz8-FcキメラへのWnt3aの直接結合を示す。図15Aは固定化されたFrz8-Fcへの精製された可溶性Wnt3aの結合を示すBIAcoreセンソグラムである。図15Bは固定化されたFrz8-Fcによる精製された可溶性Wnt3aの免疫沈降である。

【図15B】図15はFrz8-FcキメラへのWnt3aの直接結合を示す。図15Aは固定化されたFrz8-Fcへの精製された可溶性Wnt3aの結合を示すBIAcoreセンソグラムである。図15Bは固定化されたFrz8-Fcによる精製された可溶性Wnt3aの免疫沈降である。

【図16A】図16はOCTET(商標)システムを用いながら計測した場合のWntリガンドへの数種のFrz-Fcキメラの直接の結合を示す。図16AはFrz1-Frz10-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示し、図16BはsFRP-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示す。図16CはFrz1-Frz10-Fcキメラ及びsFRP-FcキメラへのWnt5aの結合から得られたデータを示す。

【図16B】図16はOCTET(商標)システムを用いながら計測した場合のWntリガンドへの数種のFrz-Fcキメラの直接の結合を示す。図16AはFrz1-Frz10-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示し、図16BはsFRP-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示す。図16CはFrz1-Frz10-Fcキメラ及びsFRP-FcキメラへのWnt5aの結合から得られたデータを示す。

【図16C】図16はOCTET(商標)システムを用いながら計測した場合のWntリガンドへの数種のFrz-Fcキメラの直接の結合を示す。図16AはFrz1-Frz10-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示し、図16BはsFRP-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示す。図16CはFrz1-Frz10-Fcキメラ及びsFRP-FcキメラへのWnt5aの結合から得られたデータを示す。

【図17A】図17はTOPglowルシフェラーゼTCFレポータープラスミドで一過性にトランスフェクトしたWnt刺激細胞に対するWnt拮抗体の作用を示す。図17AはWnt3aにより刺激された細胞を示し、図17BはWnt5aにより刺激された細胞

10

20

30

40

50

胞を示す。Wnt 5aで処置すべき細胞はレポーターに加えてFrz 4及びLrp 5でトランスフェクトした。239（ヒト腎）細胞を100 ng/mLのWnt 3a又は1 µg/mLのWnt 5aで活性化した。次に細胞を未処置のままとするか、PBS中、対照Fcで処置、又は精製されたFrz-Fc蛋白質で処置し、そしてルシフェラーゼ応答に関してアッセイした。

【図17B】図17はTOPglowルシフェラーゼTCFレポータープラスミドで一過性にトランスフェクトしたWnt刺激細胞に対するWnt拮抗体の作用を示す。図17AはWnt 3aにより刺激された細胞を示し、図17BはWnt-5aにより刺激された細胞を示す。Wnt 5aで処置すべき細胞はレポーターに加えてFrz 4及びLrp 5でトランスフェクトした。239（ヒト腎）細胞を100 ng/mLのWnt 3a又は1 µg/mLのWnt 5aで活性化した。次に細胞を未処置のままとするか、PBS中、対照Fcで処置、又は精製されたFrz-Fc蛋白質で処置し、そしてルシフェラーゼ応答に関してアッセイした。

【図18】図18はルシフェラーゼTCFレポータープラスミドで安定にトランスフェクトしたU2OS（ヒト骨肉腫）細胞におけるWnt拮抗体によるWntシグナル伝達の阻害を示す。細胞における初期Wntシグナル伝達はWnt 3a活性化により得た。

【図19A】図19は培養された奇形腫細胞及び腫瘍異種移植片におけるWnt標的遺伝子の発現に対するFrz 8-Fcの作用を示す。図19AはWnt 3a及びFrz 8-Fcで処置したPA-1細胞系におけるWnt標的遺伝子の発現を示す。Wnt 3a、Frz 8-Fc、又は対照Fc蛋白質で処置したPA-1細胞から単離したRNAをマイクロアレイ分析に供し、そして外から添加されたWnt 3a、Frz 8-Fc及び対照Fc蛋白質に応答した指定遺伝子の発現レベルの変化をプロットした。柱状グラフは3ウェルの平均発現レベル；棒グラフは標準誤差（S）を示す。図19BはPBS対照と相対比較した場合の、PBS、CD4-Fc又はFrz 8-Fcを与えたマウスに由来するNTer a-2腫瘍におけるWnt標的遺伝子APCDD1、Gad-1、及びFzd 5の相対的発現を示す。データは指定数の腫瘍の平均発現レベルを示し、二度実施した少なくとも2つの独立したqRT-PCR実験の代表値である。相当する培養細胞への精製されたWnt 3aの添加による各遺伝子の発現の調節も示す。

【図19B】図19は培養された奇形腫細胞及び腫瘍異種移植片におけるWnt標的遺伝子の発現に対するFrz 8-Fcの作用を示す。図19AはWnt 3a及びFrz 8-Fcで処置したPA-1細胞系におけるWnt標的遺伝子の発現を示す。Wnt 3a、Frz 8-Fc、又は対照Fc蛋白質で処置したPA-1細胞から単離したRNAをマイクロアレイ分析に供し、そして外から添加されたWnt 3a、Frz 8-Fc及び対照Fc蛋白質に応答した指定遺伝子の発現レベルの変化をプロットした。柱状グラフは3ウェルの平均発現レベル；棒グラフは標準誤差（S）を示す。図19BはPBS対照と相対比較した場合の、PBS、CD4-Fc又はFrz 8-Fcを与えたマウスに由来するNTer a-2腫瘍におけるWnt標的遺伝子APCDD1、Gad-1、及びFzd 5の相対的発現を示す。データは指定数の腫瘍の平均発現レベルを示し、二度実施した少なくとも2つの独立したqRT-PCR実験の代表値である。相当する培養細胞への精製されたWnt 3aの添加による各遺伝子の発現の調節も示す。

【図20】図20は図19に示す遺伝子発現のリアルタイム定量的PCR分析のために使用したプライマー及びプローブのアクセッション番号及び配列を示す（実施例9）。

【図21】図21はWnt動物モデルを作成するためにトランスフェクションにおいて使用したベクター構築物を記載する直線的な模式図である。

【図22A】図22は腹腔内（IP）投与による無胸腺ヌードマウスにおけるMMTV-Wnt腫瘍移植片に対するFrz 8-Fcの効能を示す。図22Aは週2回腹腔内注射によりPBS、CD4-Fc（10 mg/kg/日）又はFrz 8-Fc（10 mg/kg/日）を投与されたMMTV-Wnt腫瘍移植片を保有するヌードマウスから得たデータを示すグラフである。平均の腫瘍体積を経時的にプロットし、投与日をX軸上矢印で示す。図22Bは4投与群における経時的な平均腫瘍体積及び平均変化率（%）の表による集

10

20

30

40

50

計である。

【図22B】図22は腹腔内（IP）投与による無胸腺ヌードマウスにおけるMMTV-Wnt腫瘍移植片に対するFrz8-Fcの効能を示す。図22Aは週2回腹腔内注射によりPBS、CD4-Fc（10mg/kg/日）又はFrz8-Fc（10mg/kg/日）を投与されたMMTV-Wnt腫瘍移植片を保有するヌードマウスから得たデータを示すグラフである。平均の腫瘍体積を経時的にプロットし、投与日をX軸上矢印で示す。図22Bは4投与群における経時的な平均腫瘍体積及び平均変化率（%）の表による集計である。

【図23A】図23は静脈内（IV）投与による無胸腺ヌードマウスにおけるMMTV-Wnt腫瘍移植片に対するFrz8-Fcの効能を示す。図23Aは週3回静脈内注射によりPBS、CD4-Fc（10mg/kg/日）又はFrz8-Fc（10mg/kg/日）を投与されたMMTV-Wnt腫瘍移植片を保有するヌードマウスから得たデータを示すグラフである。平均の腫瘍体積を経時的にプロットし、投与日をX軸上矢印で示す。図23Bは4投与群における経時的な平均腫瘍体積及び平均変化率（%）の表による集計である。

【図23B】図23は静脈内（IV）投与による無胸腺ヌードマウスにおけるMMTV-Wnt腫瘍移植片に対するFrz8-Fcの効能を示す。図23Aは週3回静脈内注射によりPBS、CD4-Fc（10mg/kg/日）又はFrz8-Fc（10mg/kg/日）を投与されたMMTV-Wnt腫瘍移植片を保有するヌードマウスから得たデータを示すグラフである。平均の腫瘍体積を経時的にプロットし、投与日をX軸上矢印で示す。図23Bは4投与群における経時的な平均腫瘍体積及び平均変化率（%）の表による集計である。

【図24A】図24はMMTVWnt腫瘍試験から単離された血清中の種々のWnt拮抗体のTOPglowアッセイにおけるWntシグナル伝達拮抗体活性を示す棒グラフである。X軸の試料は投与、マウス試験番号及び希釈に応じて群A～E（図24A）又はA～F（図24B）に示す。TOPGLOW遺伝子レポーターアッセイにおける相対的ルシフェラーゼ活性をY軸に示す。NA（対照）を除き、全試料を約40ng/mLの精製されたWnt3aで処置する。全ての他の蛋白質対照は5μg/mLで培地中に存在させる。図24AはIP処置マウスから単離した血清の試験結果を示し、IV投与のものは図24Bに示した。

【図24B】図24はMMTVWnt腫瘍試験から単離された血清中の種々のWnt拮抗体のTOPglowアッセイにおけるWntシグナル伝達拮抗体活性を示す棒グラフである。X軸の試料は投与、マウス試験番号及び希釈に応じて群A～E（図24A）又はA～F（図24B）に示す。TOPGLOW遺伝子レポーターアッセイにおける相対的ルシフェラーゼ活性をY軸に示す。NA（対照）を除き、全試料を約40ng/mLの精製されたWnt3aで処置する。全ての他の蛋白質対照は5μg/mLで培地中に存在させる。図24AはIP処置マウスから単離した血清の試験結果を示し、IV投与のものは図24Bに示した。

【図25】図25は外から添加したWnt3aの不在下（図25A）又は存在下（図25B）における指定した奇形腫瘍細胞系における種々のWnt拮抗体のTOPglowアッセイにおけるWntシグナル伝達拮抗体活性を示す。各細胞系について、活性は何れの処置も不在（NA）で観察されたものに対して表され；少なくとも2つの独立した実験の代表値とした。相対的ルシフェラーゼ活性（Y軸）はWnt阻害剤の存在下又は不在下における種々の癌細胞系によるTOPglowアッセイから測定した。

【図26A】図26は無胸腺ヌードマウスにおけるNTERA2腫瘍異種移植片の成長に対するFrz8（156）-Fc処置の抗腫瘍作用を示す。図26Aは手順のフローチャートであり、図26Bは経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、投与日はX軸上で矢印により示す。図26Cは試験の第20日における群中の全動物の屠殺時における平均腫瘍重量をプロットしたグラフである。図26D及び26Eはそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率（%）の表による集計である。

【図 2 6 B】図 2 6 は無胸腺ヌードマウスにおける N T e r a 2 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍作用を示す。図 2 6 A は手順のフローチャートであり、図 2 6 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、投与日は X 軸上で矢印により示す。図 2 6 C は試験の第 2 0 日における群中の全動物の屠殺時における平均腫瘍重量をプロットしたグラフである。図 2 6 D 及び 2 6 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 6 C】図 2 6 は無胸腺ヌードマウスにおける N T e r a 2 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍作用を示す。図 2 6 A は手順のフローチャートであり、図 2 6 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、投与日は X 軸上で矢印により示す。図 2 6 C は試験の第 2 0 日における群中の全動物の屠殺時における平均腫瘍重量をプロットしたグラフである。図 2 6 D 及び 2 6 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 6 D】図 2 6 は無胸腺ヌードマウスにおける N T e r a 2 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍作用を示す。図 2 6 A は手順のフローチャートであり、図 2 6 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、投与日は X 軸上で矢印により示す。図 2 6 C は試験の第 2 0 日における群中の全動物の屠殺時における平均腫瘍重量をプロットしたグラフである。図 2 6 D 及び 2 6 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 6 E】図 2 6 は無胸腺ヌードマウスにおける N T e r a 2 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍作用を示す。図 2 6 A は手順のフローチャートであり、図 2 6 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、投与日は X 軸上で矢印により示す。図 2 6 C は試験の第 2 0 日における群中の全動物の屠殺時における平均腫瘍重量をプロットしたグラフである。図 2 6 D 及び 2 6 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 7】図 2 7 は T O P g l o w アッセイにより測定した場合の N T e r a 2 腫瘍試験における種々の動物から単離した血清の W n t シグナル伝達拮抗体活性を示す棒グラフである。Y 軸は対照及び F r z 8 - F c W n t 拮抗体に関する T O P g l o w アッセイによる相対的ルシフェラーゼ活性 (Y 軸) を示す。追加的な精製された W n t 又は W n t コンディショニング培地は細胞には添加しなかった。

【図 2 8 A】図 2 8 は無胸腺ヌードマウスにおける P A - 1 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍効能を示す。図 2 8 A は手順のフローチャートであり、図 2 8 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフである。図 2 8 C は屠殺時における平均腫瘍重量のグラフである。平均腫瘍重量 $\pm$ S E M は群の関数としてプロットする。図 2 8 D 及び 2 8 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 8 B】図 2 8 は無胸腺ヌードマウスにおける P A - 1 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍効能を示す。図 2 8 A は手順のフローチャートであり、図 2 8 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフである。図 2 8 C は屠殺時における平均腫瘍重量のグラフである。平均腫瘍重量 $\pm$ S E M は群の関数としてプロットする。図 2 8 D 及び 2 8 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 8 C】図 2 8 は無胸腺ヌードマウスにおける P A - 1 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍効能を示す。図 2 8 A は手順のフローチャートであり、図 2 8 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフである。図 2 8 C は屠殺時における平均腫瘍重量のグラフである。平均腫瘍重量 $\pm$ S E M は群の関数としてプロットする。図 2 8 D 及び 2 8 E はそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。

【図 2 8 D】図 2 8 は無胸腺ヌードマウスにおける P A - 1 腫瘍異種移植片の成長に対する F r z 8 (1 5 6) - F c 処置の抗腫瘍効能を示す。図 2 8 A は手順のフローチャートであり、図 2 8 B は経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフである。図 2 8 C は屠殺

10

20

30

40

50

時における平均腫瘍重量のグラフである。平均腫瘍重量±S E Mは群の関数としてプロットする。図28D及び28Eはそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率(%)の表による集計である。

【図28E】図28は無胸腺ヌードマウスにおけるP A-1腫瘍異種移植片の成長に対するF r z 8 (156)-F c処置の抗腫瘍効能を示す。図28Aは手順のフローチャートであり、図28Bは経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフである。図28Cは屠殺時における平均腫瘍重量のグラフである。平均腫瘍重量±S E Mは群の関数としてプロットする。図28D及び28Eはそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率(%)の表による集計である。

【図29】図29はT O P g l o wアッセイにより測定した場合のF r z 8-F c又はF r z 5-F zで処置したマウスにおけるW n tシグナル伝達阻害を示す。Y軸は対照及びF r z 8-F c及びF r z 5-F z W n t拮抗体に関するT O P g l o wアッセイによる相対的ルシフェラーゼ活性(Y軸)を示す。

【図30】図30はF r z 8-F c及びF r z 5-F z処置腫瘍における低減されたA x i n 2発現を示し、図30AはG A P D Hの発現に対して規格化された発現を示し、図30Bはr p l 1 9の発現に対して規格化された発現を示す。

【図31A】図31はβ-カテニンの免疫組織化学的(I H C)染色に関するI H C光学顕微鏡写真を示し、腸及び皮膚などの再生性組織に対するF r z 8-F c処置が正常であることを示している。図31AはP B S (A-1)、対照蛋白質(A-2)及びF r z 8-F c (A-3)処置マウスの小腸におけるβ-カテニンに関するI H Cを示す。図31BはP B S (B-1)、対照蛋白質(B-2)及びF r z 8-F c (B-3)処置マウスの皮膚におけるβ-カテニンに関するI H Cを示す。

【図31B】図31はβ-カテニンの免疫組織化学的(I H C)染色に関するI H C光学顕微鏡写真を示し、腸及び皮膚などの再生性組織に対するF r z 8-F c処置が正常であることを示している。図31AはP B S (A-1)、対照蛋白質(A-2)及びF r z 8-F c (A-3)処置マウスの小腸におけるβ-カテニンに関するI H Cを示す。図31BはP B S (B-1)、対照蛋白質(B-2)及びF r z 8-F c (B-3)処置マウスの皮膚におけるβ-カテニンに関するI H Cを示す。

【図32A】図32はヒト乳癌における活性W n tシグナル伝達を説明している。図32AはW o n g等、J. P a t h o l. 196:145(2002)において最初に報告された正常(A-1)、低悪性度(A-2)及び高悪性度(A-3)のヒト乳腺腫瘍におけるW n t発現(インビトロハイブリダイゼーションにより示す)を示す。

【図32B1】図32はヒト乳癌における活性W n tシグナル伝達を説明している。図32Bは乳癌患者におけるβ-カテニンの核(B-1)及び細胞質(B-2)局在化(I H Cにより示す)を示す。示したβ-カテニン発現パターンと相関している患者生存確率を示すK a p l a n-M e i e r生存区画(B-3)も同様に示す。このデータはL i n等、P. N. A. S. (U S A) 97(8)4262-66(2000)において最初に報告されている。

【図32B2】図32はヒト乳癌における活性W n tシグナル伝達を説明している。図32Bは乳癌患者におけるβ-カテニンの核(B-1)及び細胞質(B-2)局在化(I H Cにより示す)を示す。示したβ-カテニン発現パターンと相関している患者生存確率を示すK a p l a n-M e i e r生存区画(B-3)も同様に示す。このデータはL i n等、P. N. A. S. (U S A) 97(8)4262-66(2000)において最初に報告されている。

【図32B3】図32はヒト乳癌における活性W n tシグナル伝達を説明している。図32Bは乳癌患者におけるβ-カテニンの核(B-1)及び細胞質(B-2)局在化(I H Cにより示す)を示す。示したβ-カテニン発現パターンと相関している患者生存確率を示すK a p l a n-M e i e r生存区画(B-3)も同様に示す。このデータはL i n等、P. N. A. S. (U S A) 97(8)4262-66(2000)において最初に報告されている。

10

20

30

40

50

【図 3 2 C】図 3 2 はヒト乳癌における活性 W n t シグナル伝達を説明している。図 3 2 C は浸潤性の腺管癌腫、h e r - 2 陰性の患者から単離した組織と比較した場合の癌を有さない患者に由来する正常乳房における W n t - 1 の発現のマイクロアレイ分析である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 5 】

I. 定義

「W n t 蛋白質」とは W n t シグナル伝達を活性化させるように F r i z z l e d 受容体に結合する W n t シグナル伝達経路成分のリガンドである。W n t 蛋白質の具体例は少なくとも 1 9 メンバー、例えば

【 0 0 6 6 】

【化 1 0 】

Wnt-1 (参照配列 NM_005430), Wnt-2 (参照配列 NM_003391), Wnt-2B (Wnt-13) (参照配列 NM_004185), Wnt-3 (参照配列 NM_030753), Wnt3a (参照配列 NM_033131), Wnt-4 (参照配列 NM_030761), Wnt-5A (参照配列 NM_003392), Wnt-5B (参照配列 NM_032642), Wnt-6 (参照配列 NM_006522), Wnt-7A (参照配列 NM_004625), Wnt-7B (参照配列 NM_058238), Wnt-8A

【 0 0 6 7 】

【化 1 1 】

(参照配列 NM_058244), Wnt-8B (参照配列 NM_003393), Wnt-9A (Wnt-14) (参照配列 NM_003395), Wnt-9B (Wnt-15) (参照配列 NM_003396), Wnt-10A (参照配列 NM_025216), Wnt-10B (参照配列 NM_003394), Wnt-11 (参照配列 NM_004626), Wnt-16 (参照配列 NM_016087)).

を包含する。各メンバーが種々の程度の配列同一性を有しているが、各々は高度に保存されたスペーシングを示す 2 3 ~ 2 4 の保存システイン残基を含有する。McMahon, A P 等、Trends Genet. 8 : 2 3 6 - 2 4 2 (1 9 9 2) ; Miller, J R. Genome Biol. 3 (1) : 3 0 0 1 . 1 - 3 0 0 1 . 1 5 (2 0 0 2) 。本発明の目的のためには、W n t 蛋白質及びその活性な変異体は F r i z z l e d E C D 又はそのような F r z E C D の C R D 成分に結合する蛋白質である。

【 0 0 6 8 】

「F r i z z l e d」(F r z) 蛋白質は W n t 蛋白質に結合し、そして更に他の膜関連 W n t シグナル伝達成分と複合体を形成して W n t シグナル伝達を下流の細胞内成分に伝達する 7 通過膜貫通受容体である W n t シグナル伝達経路成分である。F r z 蛋白質は F r z 1、F r z 2、F r z 3、F r z 4、F r z 5、F r z 6、F r z 7、F r z 8、F r z 9、及び F r z 1 0 を包含する。ヒト全長 F r z 蛋白質の例は

【 0 0 6 9 】

【化 1 2 】

hFrz1

(NP_003496) (配列番号 1), hFrz2 (NP_001457) (配列番号 2), hFrz3 (NP_059108) (配列番号 3), hFrz4 (NP_036325) (配列番号 4), hFrz5 (NP_003459) (配列番号 5), hFrz6 (NP_003497) (SEQ ID NO: 6), hFrz7 (NP_003498) (配列番号 7), hFrz8 (NP_114072) (配列番号 8), hFrz9 (NP_003499) (配列番号 9), および hFrz10 (NP_009128) (配列番号 10)

を包含する (図 6 A ~ 6 C) 。

【0070】

「分泌Frizzled関連蛋白質」(sFRP)はWnt蛋白質に結合する分泌細胞外ポリペプチドであるWntシグナル伝達経路成分である。sFRP蛋白質はsFRP1、sFRP2、sFRP3、sFRP4、及びsFRP5を包含する。ヒト全長sFRP蛋白質の例はsFRP1(NP__003003)(配列番号11)、sFRP2(NP__003004)(配列番号12)、sFRP3(NP__001454)(配列番号13)、sFRP4(NP__003005)(配列番号14)、及びsFRP5(NP__003006)(配列番号15)を包含する(図6C~6D)。

【0071】

「Ror」蛋白質は哺乳動物相同体Ror1及びRor2を包含し、これらは細胞外のFrizzled様システインリッチドメイン(CRD)並びに膜近位クリングルドメインを特徴とする。Ror蛋白質は発生形態形成において重要な役割を果たしており、そして細胞骨格の異なる種々の成分に関連している。Ror1はストレス繊維に沿ったF-アクチンと共局在化しており、Ror2は部分的に微小管と共局在化している。Ror1及びRor2は約58%の全体的配列同一性を共有している。Rorには黒色腫関連抗原(MAGE)ファミリー蛋白質Dlx1-1に関連しており、そしてその細胞内分布を調節する。Ror1蛋白質はRor1及びRor2を包含する。ヒト全長Ror蛋白質の例はhRor1(NP__005003)(配列番号16)及びhRor2(NP__004551)(配列番号17)である(図6D~6E)。

【0072】

「Frzドメイン成分」とはFrz蛋白質、sFRP蛋白質、Ror蛋白質、又はWnt蛋白質と結合できる他の蛋白質から誘導されたポリペプチドである。蛋白質「から誘導される」ポリペプチドとはレファレンス蛋白質配列内、又は蛋白質の活性な変異体の配列内に存在し得るアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。Frzドメイン成分の例は、Frz1、Frz2、Frz3、Frz4、Frz5、Frz6、Frz7、Frz8、Frz9、Frz10、sFRP1、sFRP2、sFRP3、sFRP4、sFRP5、Ror1、又はRor2及びそれらの活性変異体などの、Frz蛋白質、sFRP蛋白質、又はRor蛋白質の細胞外ドメインの最少システインリッチドメイン(CRD)「CRD(ECD)」を包含する。CRD(ECD)は100~250アミノ酸の保存された構造的モチーフであり、そして10個の高度に保存されたシステインにより定義される。ヒトCRD(ECD)の特定の例は図3Bにおける箱で囲まれた文字において示されており、そして以下の配列番号、即ち

【0073】

【化13】

hFrz1 (配列番号 18),

hFrz2 (配列番号 19), hFrz3 (配列番号 20), hFrz4 (配列番号 21), hFrz5 (配列番号 22), hFrz6 (配列番号 23), hFrz7 (配列番号 24), hFrz8 (配列番号 25), hFrz9 (配列番号 26), hFrz10 (配列番号 27), sFRP1 (配列番号 28), sFRP2 (配列番号 29), sFRP3 (配列番号 30), sFRP4 (配列番号 31), sFRP5 (配列番号 32), hRor1 (配列番号 33), および hRor2 (配列番号 34).

で表される。

【0074】

Frzドメイン成分の更なる例はFrz1、Frz2、Frz3、Frz4、Frz5、Frz6、Frz7、Frz8、Frz9、Frz10、sFRP1、sFRP2、sFRP3、sFRP4、又はsFRP5及びそれらの活性変異体などのプロFrz又はプロsFRPから誘導されるプロFrzドメインを包含する。ヒトプロFrzドメインの特定の例は図3Aに記載されており、以下の配列番号、即ち

【0075】

【化 1 4】

hFrz1 (配列番号 35), hFrz2 (配列番号 36), hFrz3 (配列番号 37),
hFrz4 (配列番号 38), hFrz5 (配列番号 39), hFrz6 (配列番号 40), hFrz7 (配列番号
41), hFrz8 (配列番号 42), hFrz9 (配列番号 43), hFrz10 (配列番号 44),
sFRP1 (配列番号 45), sFRP2 (配列番号 46), sFRP3 (配列番号 47), sFRP4 (配列番号 48), および sFRP5 (配列番号 49).

で表される。

【0076】

10

F r z ドメイン成分の更なる例は F r z 1、F r z 2、F r z 3、F r z 4、F r z 5、F r z 6、F r z 7、F r z 8、F r z 9、F r z 10、s F R P 1、s F R P 2、s F R P 3、s F R P 4、s F R P 5、R o r 1 又は R o r 2 及びそれらの活性変異体などの成熟 F r z、s F R P 又は R o r 蛋白質から誘導される成熟 F r z ドメインを包含する。ヒト成熟 F r z ドメインの特定の例は図 3 B に記載されており、以下の配列番号、即ち

【0077】

【化 1 5】

hFrz1 (配列番号 50), hFrz2 (配列番号 51), hFrz3 (配列番号 52), hFrz4 (配列番号 53), hFrz5 (配列番号 54), hFrz6 (配列番号

20

【0078】

【化 1 6】

55), hFrz7 (配列番号 56), hFrz8 (配列番号 57), hFrz9 (配列番号 58), hFrz10 (配列番号 59), sFRP1 (配列番号 60), sFRP2 (配列番号 61), sFRP3 (配列番号 62), sFRP4 (配列番号 63), sFRP5 (配列番号 64), hRor1 (配列番号 65), および hRor2 (配列番号 66).

で表される。

30

【0079】

「W n t 拮抗体」とは W n t 蛋白質に結合し、そして細胞性 W n t シグナル伝達又はそれから生じる生理学的症状を減衰させることにより活性となる F r z ドメイン成分及び免疫グロブリン F c ドメインを含むキメラポリペプチドである。

【0080】

特定の実施形態においては、F c ドメインは I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 F c ドメインである。1つの実施形態において、F c ドメインはヒト I g G 1 F c ドメインである。F c ドメインの具体例は図 4、5 及び図 7、配列番号 67 及び配列番号 68 に示す。

【0081】

40

一部の実施形態においては F r z ドメイン成分及び F c ドメインはリンカーにより融合される。「リンカー」という用語は F c ドメインに F r z ドメイン成分を係留させる成分を指す。本発明における使用に適するリンカーは W n t 拮抗体分子の蛋白質ドメインの発現、分泌及び折り畳みの妨害が最小限又は皆無であり、そして立体的又は他の手段を介した F c ドメインのエフェクタ機能又は F r z ドメインの W n t 蛋白質相互作用機能（例えば、W n t 蛋白質への結合）の何れの妨害も最小限又は皆無である。特定の実施形態においては、リンカーは短鎖ペプチド配列である。リンカー配列は、活性のために必要な最小限の残基以外の F r z ドメイン成分又は F c ドメインの何れかに由来する追加的アミノ酸残基を包含してもよい。好ましいリンカーは良好な血清安定性を与えることになり、そしてプロテアーゼ切断に対して抵抗性である。有用なリンカーの具体例は図 4、図 5 及び図

50

7に示す通りであり、配列ESGGGV T（配列番号69）、LESGGGGV T（配列番号70）、GRAQV T（配列番号71）、WRAQV T（配列番号72）、及びARGRAQV T（配列番号73）を包含する。上記した通り、これらのリンカーは活性のために必要な最小限の残基以外のFrzドメイン成分又はFcドメインの何れかに由来する追加的アミノ酸残基を包含してよい。これらのリンカーは、Frzドメイン成分又はFcドメイン成分に由来するもの以外の追加的アミノ酸残基を含んでいてもよい。

【0082】

「Wntシグナル伝達経路成分」はWnt蛋白質及びFrz受容体の間の相互作用に起因するシグナルを伝導する成分である。Wntシグナル伝達経路は複雑であり、広範なフィードバック調節が関与しているため、Wntシグナル伝達経路の多数かつ恐らくは未発見のメンバーが存在する。例示されるWntシグナル伝達経路成分は、膜関連蛋白質LRP5及びLRP6、アキシン（Axin）、及びディシェヴェルド（Dishevelled）、細胞外Wnt相互作用蛋白質sFRP、WIF-1、LRP不活性化蛋白質Dkk及びKrm、細胞質蛋白質β-カテニン、β-カテニン「分解複合体」のメンバーAPC、GSK3β、CKIα、及びPP2A、核輸送蛋白質APC、pygopus及びbcl9/legless、及び転写因子TCF/LEF、Groucho及び種々のヒストンアセチラーゼ、例えばCBP/p300及びPrgl-1を包含する。

【0083】

「Wnt媒介障害」とは、異常なWntシグナル伝達を特徴とする障害、状態、又は疾患である。特定の態様において、異常なWntシグナル伝達は同様の非疾患の細胞又は組織におけるWntシグナル伝達のレベルを超過する疾患であることが疑われる細胞又は組織におけるWntシグナル伝達のレベルである。特定の態様において、Wnt媒介障害は癌を包含する

「癌」という用語は未調節の細胞成長／増殖を典型的には特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指す。癌の例は、限定しないが、癌腫、リンパ腫、芽腫、及び白血病を包含する。癌のより特定の例は、限定しないが、慢性リンパ性白血病（CLL）、肺、例えば非小細胞（NSCLC）、乳腺、卵巣、子宮頸部、子宮内膜、前立腺、結腸直腸、腸のカルチノイド、膀胱、胃、膵臓、肝臓（肝細胞）、肝臓の芽腫、食道、肺の腺癌、中皮腫、滑膜肉腫、骨肉腫、頭部頸部扁平上皮細胞癌、若年性鼻咽頭血管線維腫、脂肪肉腫、甲状腺、黒色腫、基底細胞癌腫（BCC）、髓芽細胞腫、及び類腱腫を包含する。

【0084】

「制御配列」という用語は特定の宿主生物において作動可能に連結したコード配列の発現のために必要なDNA配列を指す。原核生物に適する制御配列は例えば、プロモータ、場合によりオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を包含する。真核生物の細胞はプロモータ、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサを利用することが分かっている。

【0085】

核酸はそれが別の核酸配列と機能的な関係となるように配置されている場合に「作動可能に連結」している。例えば、プレ配列又は分泌リーダーに関するDNAはそれがポリペプチドの分泌に参与するプレ蛋白質として発現されるとそのポリペプチドに関するDNAに作動可能に連結しており；プロモータ又はエンハンサはそれがコード配列の転写に影響するとその配列に作動可能に連結しており；或いは、リボソーム結合部位はそれが翻訳を促進するように位置づけられているとコード配列に作動可能に連結している。一般的に、「作動可能に連結」とは連結されるべきDNA配列が隣接しており、そして分泌リーダーの場合は、隣接し、そして読み取り相内にあることを意味する。しかしながら、エンハンサは隣接する必要はない。連結は好都合な制限部位におけるライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを従来の慣行に従って使用する。

【0086】

「活性な」ポリペプチド、変異体ポリペプチド、又はそのフラグメントは活性なポリペプチドのネイティブ又は天然に存在する成分の生物学的活性を保持している。生物学的活

10

20

30

40

50

性とは活性なポリペプチドのネイティブ又は天然に存在する対応物により媒介される機能を指す。例えば、結合又は蛋白質-蛋白質相互作用は生物学的活性を構成する。特定の意味においては、活性なWntシグナル伝達経路の成分は他のWntシグナル伝達経路の成分との相互作用を介してシグナルを効果的に伝導することができるものである。別の意味においては、活性なWnt拮抗体はWnt拮抗体の投与の前のレベルと比較して、Wntシグナル伝達又はそれから生じる生理学的状態を検出可能に減衰させるものである。

【0087】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は当業者が容易に決定できるものであり、そして一般的にプローブの長さ、洗浄温度、及び塩濃度に応じた経験的な計算である。一般的により長いプローブは適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、より短いプローブはより低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは一般的に、相補鎖がそれらの融点未満の環境に存在する場合に変性したDNAが再度アニーリングする能力に依存している。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高値であるほど、使用できる相対温度が高値となる。結果として、より高い相対温度は反応条件をよりストリンジェントとするのに対し、より低い温度はその傾向が小さい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに関する追加の詳細及び説明は、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照できる。

【0088】

「高ストリンジェンシー条件」とは、本明細書においては、(1)洗浄のために低いイオン強度及び高い温度、例えば、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを50℃で使用するもの；(2)ハイブリダイゼーションの間に変性剤、例えばホルムアミド、例えば50%(v/v)ホルムアミド+0.1%ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH6.5+750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを42℃で使用するもの；或いは(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl, 0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×Denhardt溶液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%デキストランサルフェートを42℃で使用する溶液中の一夜ハイブリダイゼーション+42℃における0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の10分間洗浄、次いで55℃におけるEDTA含有0.1×SSCよりなる10分間の高ストリンジェンシーの洗浄により識別してよい。

【0089】

「中ストリンジェンシー条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように識別してよく、そして上記したものよりも低ストリンジェントの洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば温度、イオン強度、及び%SDS)の使用を包含する。中ストリンジェント条件の例は20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl, 15mMクエン酸3ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%デキストランサルフェート、及び20mg/mL変性剪断処理サケ精子DNAを含む溶液中37℃での一夜インキュベート、次いで約37~50℃での1×SSC中のフィルタの洗浄である。プローブ長等の因子に適合するために必要に応じて温度、イオン強度等を調節する方法は当業者の知る通りである。

【0090】

「エピトープタグ化」という用語は「タグポリペプチド」に融合されたポリペプチドを指す。タグポリペプチドは対する抗体を作成できるエピトープを与えるために十分な残基を有するが、それが融合されるポリペプチドの活性を妨害しない程度に十分に短いもので

ある。タグポリペプチドは好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に架橋しないよう
にかなり独特でもある。適当なタグポリペプチドは一般的に少なくとも6アミノ酸残基、
通常は約8～50アミノ酸残基（好ましくは約10～20アミノ酸残基）を有する。例示
されるエピトープタグ配列はHA、GD、c-myc、ポリHis及びFLAGを包含す
る。

【0091】

「治療する」又は「治療」又は「軽減」とは治療的な処置及び予防的又は防止的な手段
の両方をさし、ここで、目的は標的化された病理学的な疾患又は状態又は障害を防止又は
緩徐化（減少）させることである。治療を必要とする者は、既に障害を有する者、並びに
障害を有し易いもの、又は障害を防止（予防）すべき者を包含する。Wnt 媒介障害が癌
である場合、対象又は哺乳動物は、本発明の方法によって有効量のWnt 拮抗体を投与され
た後に患者が以下の1つ以上における観察及び／又は計測可能な低減又はこれらの不在
、即ち、癌細胞の数の低減、又は癌細胞の不在；腫瘍サイズの低減；軟組織又は骨内への
癌の拡張を包含する周辺臓器内への癌細胞の浸潤の阻害（即ちある程度まで緩徐化、及び
好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（即ちある程度まで緩徐化、及び好ましくは停止）；
腫瘍成長のある程度までの阻害；及び／又は特定の癌に関連する1つ以上の症状のある程
度までの緩解；低減した罹患率及び死亡率、及びクオリティオブライフ問題の改善を示す
場合に良好に「治療された」、又は低減された腫瘍負荷を示すとされる。Wnt 拮抗体は
、既存の癌細胞を成長抑制及び／又は殺傷することができる範囲で、細胞成長阻害性及び
／又は細胞毒性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は患者により実感されてもよい
。

【0092】

障害の良好な治療及び改善を評価するための上記パラメータは医師の良く知る常套的な
手順により容易に計測できる。癌療法のために、効能は例えば疾患の進行までの時間（T
DP）を評価すること及び／又は応答速度（RR）を測定することにより計測することが
できる。転移は病期決定試験によるか、又は骨スキャン並びにカルシウムレベル及び骨へ
の拡張を測定する他の酵素に関する試験により測定できる。CTスキャンも、骨盤及びそ
の領域のリンパ節への拡張を検討するために実施できる。既知方法による胸部X線及び肝
酵素レベルの測定を用いてそれぞれ肺及び肝臓への転移を検討する。疾患をモニタリング
するための他の常套的な方法は経直腸超音波測定（TRUS）及び経直腸針生検（TRN
B）を包含する。

【0093】

「慢性」投与とは、延長された時間に渡り初期の治療作用（活性）が維持できるように
急性の様式とは逆の連続的な様式における薬剤の投与を指す。「間欠」投与は連続又は継
続的とは逆に、周期的であるか、定期的な中断に付される治療である。

【0094】

「哺乳動物」とは哺乳動物に分類される何れかの動物、例えばヒト、家畜及び牧畜、及
び、動物園、競技用、又は愛玩用の動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ
、ヤギ、ウサギ等を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0095】

別の治療薬1つ以上「と組み合わせた」投与は、同時及び何れかの順序における連続し
た投与を包含する。

【0096】

「担体」とは本明細書においては、使用される用量及び濃度で曝露される細胞又は哺乳
動物に対して非毒性である製薬上許容しうる担体、賦形剤、又は安定化剤を包含する。頻
繁には生理学的に許容しうる担体は水性のpH緩衝された溶液である。生理学的に許容さ
れる担体の例は緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；抗酸化剤、例え
ばアスコルビン酸；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；蛋白質、例えば血清アル
ブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性重合体、例えばポリビニルピロリドン；
アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、又はリジン；単糖

類、二糖類、及び他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、又はデキストリン；キレート形成剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えばマンニトール又はソルビトール；塩形成性の対イオン、例えばナトリウム；及び／又はノニオン系界面活性剤、例えばTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）を包含する。

【0097】

Wnt拮抗体の「有効量」とは、具体的に記載した目的を実行するために十分な量である。「有効量」は記載した目的との関連において実験的に、そして常套的な様相において決定してよい。

【0098】

「治療有効量」という用語は対象又は哺乳動物においてWnt媒介障害を「治療」するために有効なWnt拮抗体の量を指す。癌の場合は、治療有効量の薬品は、癌細胞の数を低減；腫瘍サイズを低減；周辺臓器内への癌細胞浸潤を阻害（即ちある程度まで緩徐化、及び好ましくは停止）；腫瘍転移を阻害（即ちある程度まで緩徐化、及び好ましくは停止）；腫瘍成長をある程度までの阻害；及び／又は1つ以上の癌関連症状をある程度まで緩解してよい。「治療」の本明細書における定義を参照できる。薬品は、既存の癌細胞の成長抑制及び／又は殺傷を行う範囲で、細胞増殖抑制性及び／又は細胞毒性であり得る。

【0099】

Wnt拮抗体の「成長阻害量」とはインビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長を阻害することができる量である。新生物性細胞成長を阻害する目的の、Wnt拮抗体の「成長阻害量」は実験的に、そして常套的な様相において決定してよい。

【0100】

Wnt拮抗体の「細胞毒性量」とはインビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の破壊を誘発することができる量である。新生物性細胞成長を阻害する目的のためのWnt拮抗体の「細胞毒性量」は実験的に、そして常套的な様相において決定してよい。

【0101】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は互換的に、そして最も広範な意味において使用され、例えばモノクローナル抗体（例えば全長又は未損傷のモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば所望の生物学的活性を示す二重特異性抗体）を包含し、そして特定の抗体フラグメントも本明細書においてより詳しく説明する通り包含してよい。抗体はキメラ、ヒト、ヒト化又は親和性成熟のものであることができる。

【0102】

何れかの脊椎動物種に由来する軽鎖はその定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの明確に異なる型の一方に割り当てられ得る。その重鎖の定常ドメイン（ C_H ）のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラス又はアイソタイプに割り当てられ得る。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが存在し、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と記載される重鎖を有している。 γ 及び α のクラスは更に、 C_H の配列及び機能における比較的小さい相違点に基づいてサブクラスに分割され、例えばヒトは以下のサブクラス、即ちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を発現する。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元配置はよく知られており、そして一般的に例えばAbbas等、Cellular and Molecular Biology, 4th Ed.（2000）に記載されている。抗体は1つ以上の他の蛋白質又はペプチドとの抗体の共有結合又は非共有結合により形成されるより大型の融合分子の部分であってよい。

【0103】

「抗体フラグメント」は未損傷の抗体の一部、好ましくは未損傷の抗体の抗原結合又

10

20

30

40

50

は可変領域を含む。抗体フラグメントの例はF a b、F a b'、F (a b')₂ 及びF vフラグメント；ダイアボディ；線状抗体（米国特許5, 641, 870）；Z a p a t a等、P r o t e i n E n g. 8 (10) : 1057-1062 (1995)；単鎖抗体分子；及び抗体フラグメントから形成した多重特異性抗体を包含する。

【0104】

抗体のパパイン消化は2つの同一の抗原結合フラグメント、即ち「F a b」フラグメント、及び残余の「F c」フラグメントを生じさせ、容易に結晶化する能力を反映した表記である。F a bフラグメントは重鎖の可変領域ドメイン (V_H) 及び1つの重鎖の第1の定常ドメイン (C_H1) に沿った全軽鎖よりなる。各F a bフラグメントは抗原結合に関して一価であり、即ち、それは単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は単一の大型のF (a b')₂ フラグメントを生じさせ、これは二価の抗原結合活性を有する2つのジスルフィド連結F a bフラグメントに概ね相当し、そしてなお抗原に交差結合できる。F a b'フラグメントは抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを包含するC H 1ドメインのカルボキシ末端における追加的な残基を殆ど有さないことによりF a bフラグメントとは異なっている。F a b' - S Hは定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているF a b'に関する本明細書における表記である。F (a b')₂ 抗体フラグメントは、元は、間にヒンジシステインを有するF a b'フラグメントの対として製造された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも知られている。

【0105】

F cフラグメントはジスルフィドにより共に保持された両方の重鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクタ機能はF c領域における配列により決定され、この領域は細胞の特定の型において見出されるF c受容体 (F c R) により認識される部分でもある。

【0106】

「F v」は完全な抗原認識及び結合部位を含有する最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは堅固な非共有結合的会合における1つの重鎖及び1つの軽鎖の可変領域ドメインよりなる。

【0107】

「モノクローナル抗体」という用語は本明細書においては、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち、少量で存在する場合がある可能な天然に存在する突然変異を除き、集団を含む個々の抗体が同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一抗原に対して指向されている。種々の異なる決定基 (エピトープ) に対して指向された種々の異なる抗体を典型的には包含するポリクローナル抗体調製品とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向されている。

【0108】

特にモノクローナル抗体の定義に包含される「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が特定の種から誘導されるか、特定の抗体クラス又はサブクラスに帰属する抗体における相当配列に同一又は相同であるが、鎖の残余は別の種から誘導されるか、特定の抗体クラス又はサブクラスに帰属する相当配列に同一又は相同である抗体、並びにそのような抗体のフラグメントを意味するが、ただしこれは、それらが所望の生物学的活性を呈する限りにおいてそのような意味を有するものとする。米国特許4, 816, 567；及びM o r r i s o n等、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 81 : 6851-6855 (1984)。

【0109】

非ヒト (例えばげっ歯類) 抗体の「ヒト化」型とは非ヒト抗体から誘導される最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望の抗体特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などの非ヒト種 (レシピエント抗体) の超可変領域由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) である。一部の例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域 (F R) の残基は相当する非ヒト残基により置き換えられている。更に、ヒト化抗体はレシピエント抗体内にもドナー抗体内にも存

在しない残基を含んでよい。このような修飾は抗体の性能を更に精鋭化させるために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのそれに相当し、そしてFRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになる。ヒト化抗体は場合により、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部分を含むことにもなる。詳細についてはJones等、Nature 321:522-525(1986); Riechmann等、Nature 332:323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照できる。更に又、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115(1998); Harris, Biochem. Soc. Trans. 23:1035-1038(1995); Hurler and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433(1994)を参照できる。

10

20

30

40

50

【0110】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」とは、本明細書においては互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドの重合体を指し、例えば限定しないがDNA及びRNAを包含する。ヌクレオチドはデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド又は塩基、及び／又は、その類縁体、又はDNA又はRNAポリメラーゼにより、又は合成反応により重合体に取り込まれ得る何れかの基質であり得る。ポリヌクレオチドは修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びその類縁体を含んでよい。存在する場合は、ヌクレオチド構造に対する修飾は重合体の組み立ての前又は後に付与してよい。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されていてよい。ポリヌクレオチドは合成後に更に例えば標識とのコンジュゲーションにより修飾されていてよい。他の型の修飾は、例えば類縁体による1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの「キャップ」置換、ヌクレオチド間修飾、例えば末荷電連結(例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カーバメート等)、及び荷電連結(例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)、懸垂部分、例えば蛋白質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジン等)、インターカレータ(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート形成剤(例えば金属、放射活性金属、ホウ素、酸化性金属等)、アルキル化剤、修飾連結部(例えばアルファアノマー核酸等)を包含する。更に、糖に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホネート基、ホスフェート基により置き換えられているか、標準的な保護基により保護されているか、又は、別のヌクレオチドへの追加的連結部を作成するために活性化されていてよく、或いは、固体又は半固体の支持体にコンジュゲートされていてよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化され得るか、又は、アミンもしくは炭素原子1~20個の有機キャッピング基部分により置換され得る。他のヒドロキシルはまた標準的な保護基に誘導体化されていてよい。ポリヌクレオチドはまた当該分野で一般的に知られたリボース又はデオキシリボース糖の類縁体形態、例えば2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環糖類縁体、アルファアノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース又はリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状類縁体及び非塩基性ヌクレオチド類縁体、例えばメチルリボシドを含有してよい。1つ以上のホスホジエステル連結部は別の連結基により置き換えられていてよい。これらの代替的連結基は、例えばホスフェートがP(O)-S-(チオエート)、P(S)-S-(ジチオエート)、(O)NR₂-(アミデート)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂-(ホルムアセタール)で置き換えられている実施形態を包含し、ここで各R又はR'は独立して、H又は場合によりエーテル結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルキル連結部を含有する置換又は未置換のC₁~₂₀アルキルである。ポリヌクレオチド中の全連結部が同一である必要はない。前期はRNA及びDNAを包含する本明細書に記載する全てのポリヌクレオチドに適用する。

【0111】

「ペプチド」という用語は一般的にペプチド結合により連結されたアミノ酸の隣接する比較的短い配列を指す。必然ではないが典型的には、ペプチドは約2～50アミノ酸、4～40アミノ酸、又は10～30アミノ酸の長さを有する。「蛋白質」という用語は一般的に「ポリペプチド」のより長い形態を指すが、2つの用語は本明細書における一部の文脈においては互換的であってよく、また、互換的に使用され、そして一般的により長い、恐らくはより複雑なアミノ酸配列を指す（例えば多重配列、二次及び高次の構造）

ポリペプチドの「領域」とは2つ以上のアミノ酸残基の隣接配列である。別の実施形態においては、領域は少なくとも約3、5、10、15又はそれより多い隣接アミノ酸残基である。

10

【0112】

「C末端領域」、「C末端配列」及びその変形は本明細書においてはC末端（一般的に3'）の端部に位置するか、それに近接しているアミノ酸配列を指す。一般的に、配列は遊離カルボキシル基を有するアミノ酸を包含する。1つの実施形態において、C末端領域又は配列はC末端に最も近接して位置する約1～15残基を包含するポリペプチドの領域を指す。

【0113】

「N末端領域」、「N末端配列」及びその変形は本明細書においてはN末端（概して5'）の端部に位置するか、それに近接しているアミノ酸配列を指す。概して、配列は遊離アミノ基を有するアミノ酸を包含する。1つの実施形態において、N末端領域又は配列はポリペプチドのN末端に最も近接して位置する約1～15残基を包含するポリペプチドの領域を指す。

20

【0114】

「内部領域」、「内部配列」及びその変形は、ポリペプチド内に位置するアミノ酸配列であって、その配列の部分ではない1つ以上のアミノ酸によりそのNおよびC末端の両方においてフランキングされているものを指す。概して、配列は遊離のカルボキシル又はアミノ基の何れかを有するアミノ酸を包含しない。

【0115】

「リガンド」とは、蛋白質又は別の分子、例えば受容体における特定の部位と結合相互作用することができる天然に存在する、又は合成の分子又は部分を指す。WntリガンドはFrizzled受容体と特異的に相互作用する分子である。「受容体」は細胞表面又は膜に位置する場合が多いが、必須ではない。

30

【0116】

「融合蛋白質」とは共に共有結合的に連結している2つの部分を有するポリペプチドを指し、ここで、各部分は異なる蛋白質から誘導されている。2つの部分は単一のペプチド結合により直接、又は1つ以上のアミノ酸残基を含有するペプチドリinkerを介して連結されていてよい。一般的に、2つの部分及びリンカーは相互に読み枠内にあることになり、そして組み換え手法を用いて製造される。

【0117】

「腫瘍細胞の成長を阻害する」Wnt拮抗剤又は「成長阻害性の」Wnt拮抗剤は異常なWntシグナル伝達活性を有する腫瘍細胞の計測可能な成長阻害をもたらすものである。好ましい成長阻害性のWnt拮抗剤は、適切な対照と比較した場合に、異常なWntシグナル伝達活性を有する腫瘍細胞の成長を20%超、好ましくは約20～約50%、そしてさらに好ましくは50%超（例えば約50～約100%）阻害し、ここで対照とは典型的には試験すべきWnt拮抗剤分子で処置されていない癌細胞である。1つの実施形態において、成長阻害は細胞培養物中約0.1～30μg/ml又は約0.5nM～200nMのWnt拮抗剤濃度において計測することができ、その場合成長阻害はWnt拮抗剤への腫瘍細胞の曝露後1～10日に測定する。インビボの腫瘍細胞の成長阻害は後述する実験実施例のセクションにおいて説明するように種々のやり方で測定できる。Wnt拮抗剤は約1μg/kg～約100mg/kg体重のWnt拮抗剤の投与が抗体の初回投与から

40

50

約5日間～3か月以内に、好ましくは約5～30日以内に腫瘍サイズ又は細胞増殖における低減をもたらす場合にインビボで成長阻害性である。特定の態様においては、腫瘍サイズは治療開始時のそのサイズに対して低減される。

【0118】

「細胞増殖性障害」及び「増殖性障害」という用語はある程度の異常な細胞増殖を伴う障害を指す。1つの実施形態において、細胞増殖性障害は癌である。

【0119】

「腫瘍」とは、本明細書においては、悪性又は良性に関わらず、全ての新生物性の細胞の成育及び増殖、及び、全ての前癌性及び癌性の細胞及び組織を指す。

【0120】

「細胞死を誘導する」Wnt拮抗体分子は生存細胞を非生存性にするものである。細胞は同じ組織型の正常な細胞と比較して異常なWntシグナル伝達活性を有するものである。好ましくは、細胞は本明細書において定義する通り癌細胞である。インビトロの細胞死は抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)又は補体依存性細胞毒性(CDC)により誘導される細胞死と区別するために補体及び免疫エフェクタ細胞の不在下で測定してよい。即ち、細胞死に関するアッセイは熱不活性化血清を用いて(即ち補体不在下において)そして免疫エフェクタ細胞の不在下において実施してよい。Wnt拮抗体が細胞死を誘導するかどうかを調べるためには、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンプルー(More等、Cytotechnology 17:1-11(1995)参照)又は7AADの取り込みにより評価される膜の完全性の喪失を未処置細胞に対して評価することができる。好ましい細胞死誘導抗体、オリゴペプチド又は他の有機性の分子はBT474細胞におけるPI取り込みアッセイにおいてPI取り込みを誘導するものである。

【0121】

「標識」という単語は本明細書においては、直接又は間接的に抗体、オリゴペプチド又は他の有機性の分子にコンジュゲートすることにより「標識された」抗体、オリゴペプチド又は他の有機性の分子を形成する検出可能な化合物又は組成物を指す。標識はそれ自体検出可能であってよく(例えば放射性同位体標識又は蛍光標識)、或いは、酵素標識の場合は、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変化を触媒してよい。

【0122】

「細胞毒性剤」という用語は本明細書においては、細胞の機能を阻害又は抑制、及び／又は細胞の破壊を引き起こす物質を指す。用語は放射性同位体(例えば At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及びLuの放射性同位体)、化学療法剤、酵素及びそのフラグメント、例えば核溶解酵素、抗生物質及び毒素、例えば小分子毒素又は細菌、カビ、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素並びにそのフラグメント及び／又は変異体、及び、以下に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を包含する。他の細胞毒性剤は以下に記載する。殺腫瘍剤は腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0123】

「化学療法剤」とは癌の治療において有用な化学物質である。化学療法剤の例はアルキル化剤類、例えばチオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミド;アルキルスルホネート類、例えばブスルファン、イムプロスルファン及びピボスルファン;アジリジン類、例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ及びウレドパ;エチレンイミン類及びメチラメラミン類、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド及びトリメチロロメラミン;アセトゲニン類(特にブラタシン及びブラタシノン);デルター9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標));ベーターラパコン;ラパコール;コルヒチン類;ベツリン酸;カンプトテシン(例えば合成類縁体トポテカン(HYCAMTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン及び9-アミノカンプトテシン);ブリオスタチン;カリスタチン;CC-1065(例えばアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシ

10

20

30

40

50

ン合成類縁体) ; ポドフィロトキシン ; ポドフィリン酸 ; テミボシド ; クリプトフィシン類 (特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (例えば合成類縁体、KW-2189及びCB1-TM1) ; エレウテロビン ; パンクラチスタチン ; サルコジクチン ; スポンジスタチン ; 窒素マスタード類、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、塩酸酸化メクロレタミン、メルファラン、ノベンビチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード ; ニトロソ尿素類、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムヌスチン ; 抗生物質、例えばエネジン抗生物質 (例えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマII及びカリケアマイシンオメガII (例えばAgnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) 参照) ; ジネマイシン、例えばジネマイシンA ; エスペラマイシン ; 並びにネオカルジノスタチン発色団及び関連の色素蛋白質エネジン抗生物質発色団) 、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オーソラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN (登録商標) ドキソルビシン (例えばモルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、2-ピロリノードキソルビシン及びデオキシドキソルビシン) 、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、例えばマイトマイシンC、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン ; 代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル (5-FU) ; 葉酸類縁体、例えばデノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセート ; プリン類縁体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン ; ピリミジン類縁体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、デキシフルリジン、エノシタビン、フロクスリジン ; アンドロゲン類、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン ; 抗アドレナル類、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン ; 葉酸補給剤、例えばフロリン酸 ; アセグラトン ; アルドホスファミドグリコシド ; アミノレブリン酸 ; エニルラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル ; ビスアントレン ; エダトラキセート ; デホファミン ; デメコルシン ; ジアジクオン ; エルホミチン ; 酢酸エリブチニウム ; エポチロン ; エトグシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン ; マイタンシノイド類、例えばマイタンシン及びアンサミトシン類 ; マイトグアゾン ; マイトキサトロン ; モピダンモル ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメト ; ピアルビシン ; ロソキサントロン ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; PSK (登録商標) 多糖類複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピログエルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジコン ; 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA及びアングイジン) ; ウレタン ; ビンデシン (ELDISINE (登録商標) 、FILDESIN (登録商標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; マイトプロニトール ; ピボプロマン ; ガシトシン ; アラビノシド (Ara-C) ; チオテバ ; タキソイド類、例えばTAXOL (登録商標) パクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 、AVRAXANETM Cremophor-非含有、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 及びTAXOTERE (登録商標) ドキセタキセル (Rhoene-Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランブシル ; ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標)) ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキセート ; 白金類縁体、例えばシスプ

10

20

30

40

50

ラチン及びカルボプラチン；ビンブラスチン（VELBAN（登録商標））；白金；エトポシド（VP-16）；イフォスファミド；マイトキサントロン；ビンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボシン；ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））；ノヴァントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチロルニチン（DMFO）；レチノイド類、例えばレチン酸；カペシタラビン（XELODA（登録商標））；上記物質の何れかの製薬上許容しうる塩、酸又は誘導体；並びに上記物質の二種以上の組み合わせ、例えばCHOP、即ちシクロホスファミド、ドキシソルビン、ビンクリスチン及びプレドニソロンの併用療法の略称、及びFOLFOX、即ち5-FU及びロイコボシンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXATINTM）を用いた治療レジメンの略称等を包含する。

10

【0124】

この定義に同様に包含されるものは癌の成長を促進することが可能であるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害する作用を有し、そして、全身投与又は身体全体投与の形態となる場合が多い抗ホルモン剤である。それらはそれら自体がホルモンであってよい。例として、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ（SERM）、例えばタモキシフェン（例えばNOLVADEX（登録商標）タモキシフェン）、EVISTA（登録商標）ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン及びFARESTON（登録商標）トレミフェン；抗プロゲステロン類；エストロゲン受容体ダウンレギュレート剤（ERD）；卵巣を抑制又はシャットダウンする機能を有する薬剤、例えば黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）作動薬、例えばLUPRON（登録商標）及びELIGARD（登録商標）酢酸ロイプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン；他の抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びビカルタミド；及び副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4（5）-イミダゾール類、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）酢酸メゲステロール、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタニー、ファドゾロール、RIVISOR（登録商標）ボロゾール、FEMARA（登録商標）レトロゾール及びARIMIDEX（登録商標）アラストロゾールを包含する。更に、化学療法剤のこのような定義にはビスホスホネート類、例えばクロドロネート（例えばBONEFOS（登録商標）又はOSTAC（登録商標））、DIDROCAL（登録商標）エチロロネート、NE-58095、ZOMETHA（登録商標）ゾレドロネート、FOSAMAX（登録商標）アレンドロネート、AREDIA（登録商標）パミドロネート、SKELID（登録商標）チルドロネート又はACTONEL（登録商標）リセドロネート；並びにトロキサシタビン（1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類縁体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えばPKC-α、Raf、HERas及び表皮成長因子受容体（EGFR）などの異常な細胞増殖に参与するとされるシグナル伝達経路内の遺伝子の発現を阻害するもの；ワクチン類、例えばTHERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子療法ワクチン類、例えばALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン及びVAXID（登録商標）ワクチン；LUPTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼI阻害剤；ABARELIX（登録商標）rmRH；ラパチニブジトシレート（ErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤、GW572016としても既知）；及び上記物質の何れかの製薬上許容しうる塩、酸又は誘導体も包含される。

20

30

40

【0125】

「成長阻害剤」とは、本明細書において使用する場合は、インビトロ又はインビボの何れかにおいて細胞、特にWntシグナル伝達活性を有する癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指す。即ち、成長阻害剤はS期における細胞の割合を有意に低減するものであってよい。成長抑制剤の例は細胞周期の進行を（S期以外の位置において）妨げる薬剤、例えばG1停止及びM期停止を誘導する薬剤を包含する。伝統的なM期遮断剤はビンカ

50

類（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン類及びトポイソメラーゼⅡ阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシンエトポシド及びブレオマイシンを包含する。G1を停止させる薬剤はまたS期停止にまで作用を波及させるものがあり、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル及びara-Cが挙げられる。更に詳細な説明はThe Molecular Basis of cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1の表題「Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drug」、Nyrajanu等(WB Saunders: Philadelphia 1995), p. 13に記載されている。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は共にイチイの木から誘導される抗癌剤である。ヨーロッパイチイから誘導されたドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）はパクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Meyer Squibb）の半合成類縁体である。パクリタキセル及びドセタキセルはチューブリン二量体からの微小管の組み立てを促進し、そして脱重合を抑制することにより微小管を安定化させ、これが細胞における有糸分裂を阻害する。

【0126】

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの全化学名は（8S-シス）-10-〔（3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ- α -L-リキソ-ヘキサピラノシル）オキシ]-7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-8-（ヒドロキシアセチル）-1-メトキシ-5, 12-ナフタセンジオンである。

【0127】

「添付文書（パッケージインサート）」という用語は、治療用製品の市販品パッケージ内に慣用的に包含されている説明書を指し、それはそのような治療用製品の使用に関わる適応症、用途、用量、投与、禁忌、及び／又は警告に関する情報を含有する。

II. 特定の実施形態の説明

本明細書に記載したWnt拮抗剤はインビトロでWntリガンドに結合することができ、そしてWnt刺激細胞シグナル伝達を阻害又は抑制させることができる。更に、Wnt拮抗剤は長いインビボ半減期を有し、そしてインビボで抗腫瘍活性を呈し、マウスMMTV乳腺腫瘍モデルにおいてWnt-1駆動腫瘍の成長を阻害する。Wnt拮抗剤は又ヒト奇形腫瘍細胞系から誘導される腫瘍異種移植片のマウスでの成長を阻害することができる。Wnt拮抗剤で処置したマウスから採取した再生組織は生理学的な基準内にあると考えられた。Wnt拮抗剤はインビトロのヒト腫瘍細胞系におけるオートクリンWntシグナル伝達を阻害することもできる。

【0128】

Frizzled受容体蛋白質は全長及び細胞外のドメイン配列の実態に基づいてファミリーに分類することができる。この分類は図8及び9に示すアライメントとして説明される。この図における下線を付した残基は全てのFrz受容体に渡って保存されており、斜線を付した残基は相同な分類に渡って保存されている。Frz蛋白質は以下のファミリー、即ち1) 全長配列に関して68~77%及びECDに関して90%の共有相同性を有するFrz1、Frz2、及びFrz7；2) 全長配列に関して57%及びECDに関して80%の共有相同性を有するFrz5及びFrz8；3) 全長配列に関して61%及びECDに関して74%の共有相同性を有するFrz9及びFrz10；4) 全長配列に関して49%及びECDに関して50%の共有相同性を有するFrz3及びFrz6；及び、5) Frz4（Frz10に対し、全長配列に関して46%及びECDに関して48%の共有相同性を有する）に分類できる。Frz1、Frz2、及びFrz7のファミリーはまたショウジョウバエFrz1と多大な相同性を有し、そしてFrz5及びFrz8のファミリーはショウジョウバエFrz2と多大な相同性を有し、それぞれ平板細胞の極性及びWntシグナル伝達を担っている。

【0129】

WntリガンドFrizzled結合挙動はFrizzledファミリー内に集約されていると考えられる。Wnt3a及びWnt5aの両方は他のFrz蛋白質に対して最も速くFrz5、Frz8及びFrz4に結合するのに対し、Wnt3aはより緩徐な速度でFrz1、Frz2、及びFrz7に結合する。Wnt5aの結合挙動の幅及び直線性は、OCTET（商標）結合アッセイで調べると、Wnt3a結合に対してより低い結合親和性を示す。高親和性及び低親和性受容体両方の存在は、急性期及び長期のシグナル伝達のための能力を付与し得る。

【0130】

Wntリガンド誘導シグナル伝達を阻害するWnt拮抗体の能力も、Frizzledファミリー内に集約されていると考えられる。Frz5及びFrz8の両方はWnt3aシグナルの完全な阻害及びWnt5aシグナルの多大な阻害を細胞系アッセイで示している（実施例7）。Frz4、Frz2及びFrz7はWnt3aシグナルの多大な阻害を示す。この所見はdFrz2（Frz5及びFrz8と相同性を有する）がWnt経路を強力に活性化し、そしてdFrz1（Frz1、Frz2及びFrz7と相同性を有する）がWnt経路を微弱に活性化できるというショウジョウバエにおける観察結果を反映している。

【0131】

作用の特定の理論に制約されないが、本明細書に提示したデータは、Wnt拮抗体を使用して作成した細胞系Wntシグナル伝達阻害データがWnt拮抗体へのWntリガンドの直接の結合を計測することにより得られるデータと相関していることを示しており、これはWnt拮抗体がWntリガンドに直接結合し、これによりそれらが細胞上の全長Frizzled受容体に結合することを妨げていることを示している。本明細書に提示したデータは更に、Wnt拮抗体のインビボのWntシグナル伝達遮断活性を予測するためにインビトロの活性を使用できることを確認するものである。

【0132】

実施例において記載するFrz8-Fcを用いた試験において示される通り、Frizzledドメイン及び免疫グロブリンFcドメインの両方を含むWnt拮抗体は驚くべきことにFrizzledドメイン単独を超えたWntリガンドへの増大した結合親和性を示している。例えば図14はFzECDドメインをFz(156)-Fc構築物に変換した場合に結合親和性が2桁を超えて増大していることを示している。Fcへのコンジュゲーションが結合親和性の2桁上昇をもたらした安定で高度に有効なWntシグナル伝達阻害剤としてのFz(156)-Fc構築物の発見は、多いに予測不能で非自明であった。

A. 本発明の組成物及び方法

1. ポリペプチド

本発明は癌を包含するWnt媒介障害の治療のため、及び細胞性Wntシグナル伝達の阻害のための組成物及び方法に関する。本発明の1つの態様はFrizzled（Frz）ドメイン成分及び免疫グロブリンFcドメインを含むキメラ分子であるWnt拮抗体を提供する。この態様の特定の実施形態においては、Frzドメイン成分及びFcドメインはリンカーを介して融合される。別の態様は、細胞性Wntシグナル伝達を阻害するため、及び癌などのWnt媒介障害の治療のためのこれらのWnt拮抗体の使用を提供する。

【0133】

1つの態様において、本発明は細胞外ドメインの最少システインリッチドメイン（CRD）、即ち「CRD（ECD）」を含むFrzドメイン成分を有するキメラ分子であるWnt拮抗体を提供する。CRD（ECD）は100～250アミノ酸の保存された構造的モチーフであり、そして10個の高度に保存されたシステインにより定義される。この蛋白質ドメインはWntシグナル伝達ファミリーの2つのクラス、即ちFrizzledとして知られる内在性の膜Wnt受容体蛋白質、及びFrizzled関連蛋白質（sFrp）として知られる分泌細胞外蛋白質において観察される。

【0134】

1つの態様において、本発明はFrz1、Frz2、Frz3、Frz4、Frz5、Frz6、Frz7、Frz8、Frz9、又はFrz10などのFrizzled蛋白質のCRD(ECD)を含むFrzドメイン成分を有するキメラ分子であるWnt拮抗体を提供する。そのようなCRD(ECD)の例は図3Bに示す通りである。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分はhFrz1(配列番号18)、hFrz2(配列番号19)、hFrz3(配列番号20)、hFrz4(配列番号21)、hFrz5(配列番号22)、hFrz6(配列番号23)、hFrz7(配列番号24)、hFrz8(配列番号25)、hFrz9(配列番号26)、及びhFrz10(配列番号27)、並びにそれらの活性変異体よりなる群から選択される。

【0135】

10

或いは、Frzドメイン成分は、例えば、sFRP1、sFRP2、sFRP3、sFRP4、又はsFRP5などの分泌Frizzled関連蛋白質(sFRP)に由来するCRD(ECD)を含む。そのようなCRD(ECD)の例は図3Bに示す通りである。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分はsFRP1(配列番号28)、sFRP2(配列番号29)、sFRP3(配列番号30)、sFRP4(配列番号31)、sFRP5(配列番号32)、及びそれらの活性変異体のCRD(ECD)よりなる群から選択される。

【0136】

或いは、Frzドメイン成分は、例えば、受容体チロシンキナーゼRor1及びRor2のCRD(ECD)を含む。そのようなCRD(ECD)の例は図3Bに示す通りである。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分はhRor1(配列番号33)及びhRor2(配列番号34)、並びにそれらの活性変異体のCRD(ECD)よりなる群から選択される。

20

【0137】

別の態様において、Frzドメイン成分はプロFrz又はプロsFrz配列であり、その例は図3Aに示す通りである。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分は

【0138】

【化17】

hFrz1(配列番号 35), hFrz2(配列番号
36), hFrz3(配列番号 37), hFrz4(配列番号 38), hFrz5(配列番号 39), hFrz6
(配列番号 40), hFrz7(配列番号 41), hFrz8(配列番号 42), hFrz9(配列番号
43), hFrz10(配列番号 44), sFRP1(配列番号 45), sFRP2(配列番号 46), sFRP3

30

【0139】

【化18】

(配列番号 47), sFRP4(配列番号 48), および sFRP5(配列番号 49),

、及びそれらの活性変異体よりなる群から選択される。

【0140】

40

更に別の態様において、Frzドメイン成分は成熟Frz、sFRP又はhRor配列から誘導され、その例は図3Bに示す通りである。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分は

【0141】

【化 19】

hFrz1 (配列番号 50),
 hFrz2 (配列番号 51), hFrz3 (配列番号 52), hFrz4 (配列番号 53), hFrz5 (配列番号
 54), hFrz6 (配列番号 55), hFrz7 (配列番号 56), hFrz8 (配列番号 57), hFrz9
 (配列番号 58), hFrz10 (配列番号 59), sFRP1 (配列番号 60), sFRP2 (配列番号
 61), sFRP3 (配列番号 62), sFRP4 (配列番号 63), sFRP5 (配列番号 64),
 hRor1 (配列番号 65), および hRor2 (配列番号 66),
 、及びそれらの活性変異体よりなる群から選択される。

10

【0142】

特定の実施形態において、キメラWnt拮抗抗体分子のFrzドメイン成分及び免疫グロブリンFcドメインはリンカーを介して融合される。1つの実施形態において、リンカーはペプチドリinkerである。別の実施形態においては、リンカーはESGGGVVT (配列番号69)、LESGGGGVVT (配列番号70)、GRAQVT (配列番号71)、WRAQVT (配列番号72)、及びARGRAQVT (配列番号73)よりなる群から選択される。場合により、リンカーは活性のために必要な最小限の残基以外のFrzドメイン成分又はFcドメインの何れかに由来する追加的アミノ酸残基を包含してよい。これらのリンカーは、Frzドメイン成分又はFcドメイン成分由来のもの以外の追加的アミノ酸残基を含んでよい。

20

【0143】

1つの実施形態において、Wnt拮抗抗体はFrz8CRD (ECD) 及びFcドメインを含むFrz8-Fcキメラである。一部の実施形態においては、Frz8-Fcキメラは更にペプチドリinkerなどのリンカーを含む。別の実施形態において、Frz8-Fcは更にリーダー配列を含む。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分はFrz8蛋白質のアミノ酸1~156を含む (配列番号8)。別の実施形態においては、Fc成分はヒトFcである。別の実施形態においては、Fc成分はヒトIgGFcである。更に別の実施形態においては、Frz8-FcはヒトIgGFcにリンカーとともに融合されたFrz8蛋白質のアミノ酸1~156を含むFrzドメイン成分を有する。更に別の実施形態においては、Frz8-Fcは図4Bに示すアミノ酸配列を有するキメラである (配列番号74)。実施例及び添付図面において使用する場合、特段の記載が無い限り、「Frz8-Fc」とは図4Bに示すキメラを指す (配列番号74)。

30

【0144】

更なる実施形態において、Wnt拮抗抗体はFrz5CRD (ECD) 及びFcドメインを含むFrz5-Fcキメラである。一部の実施形態においては、Frz5-Fcキメラは更にペプチドリinkerなどのリンカーを含む。別の実施形態において、Frz5-Fcは更にリーダー配列を含む。特定の実施形態においては、Frzドメイン成分はFrz5蛋白質のアミノ酸27~155を含む (配列番号5)。別の実施形態においては、Fc成分はヒトFcである。別の実施形態においては、Fc成分はヒトIgGFcである。なお更なる実施形態においては、Frz5-Fcはリーダー配列及びヒトIgGFcにリンカーによって融合した成熟Frz5蛋白質のアミノ酸27~155を含むFrzドメイン成分を有する。更なる実施形態においては、Frz5-Fcは図7Aに示すアミノ酸配列を有するキメラである (配列番号75)。実施例及び添付図面において使用する場合、特段の記載が無い限り、「Frz5-Fc」とは図7Aに示すキメラを指す (配列番号75)。

40

【0145】

同様に、別の実施形態は各々該当するFrz又はsFRP蛋白質に由来するFrzCRD (ECD) を含むFrzドメイン成分及びFc成分を含むFrz1-Fc、Frz2-Fc、Frz3-Fc、Frz4-Fc、Frz6-Fc、Frz7-Fc、Frz9-Fc、Frz10-Fc、sFRP1-Fc、sFRP2-Fc、sFRP3-Fc、s

50

FRP4-Fc、及びsFRP5-Fcキメラを包含する。一部の実施形態においては、Frz-Fcキメラは更にペプチドリンカーなどのリンカーを含む。別の実施形態においては、これらのキメラはリーダー配列を含む。一部の実施形態においては、Fc成分はヒトFcである。別の実施形態においては、Fc成分はヒトIgGFcである。別の実施形態においては、これらのキメラはリーダー配列及びヒトIgGFcにリンカーによって融合したFrzCRD(ECD)を有する。更なる実施形態においては、これらのキメラは図7A、7B及び7Cに示すアミノ酸配列を有する(配列番号76~88)。実施例及び添付図面において使用する場合、特段の記載が無い限り、「Frz1-Fc、Frz2-Fc、Frz3-Fc、Frz4-Fc、Frz6-Fc、Frz7-Fc、Frz9-Fc、Frz10-Fc、sFRP1-Fc、sFRP2-Fc、及びsFRP4-Fc」とは図7A、7B及び7Cに示す各々のキメラを指す(配列番号76~85、及び87)。

【0146】

Wnt拮抗剤はインビボで安定である。Fc成分に付着したFrizzledドメインを利用した以前の構築物はインビボで急速に分解され、治療用化合物としての使用に不適当であった(Hsieh, J-C. 等、PNAS、96:3546-3551(1999))。本明細書に記載したWnt拮抗剤は従来の構築物よりも実質的により長い時間インビボで安定なまま残存する。実施例4(図13)に示す通り、Frz8-FcWnt拮抗剤は約4日間のインビボ半減期を示している。従って、本発明は哺乳動物に投与された後少なくとも1日、2日、3日、又は4日のインビボ半減期を有するWnt拮抗剤を可能にする。

【0147】

更に、実施例3(図11)に示す通り、Wnt拮抗剤は従来の構築物よりも実質的により長い間インビボの活性を保持している。1つの実施形態において、Wnt拮抗剤は哺乳動物に投与された後、少なくとも30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、30時間、36時間、40時間、44時間、48時間、52時間、56時間、60時間、64時間、68時間、72時間、80時間、90時間、又は100時間、活性である。活性は例えば実施例3及び11に記載する通りWntシグナル伝達を阻害する能力に関してWnt拮抗剤投与哺乳動物の血清を試験することによるか、又は当該分野で知られた方法を用いるかにより計測する。

2. 核酸

本発明の1つの態様は本明細書に記載したWnt拮抗剤をコードする核酸を提供する。特定の実施形態においては、核酸は

【0148】

【化20】

hFrz1(配列番号 18), hFrz2(配列番号 19), hFrz3(配列番号 20), hFrz4(配列番号 21), hFrz5(配列番号 22), hFrz6(配列番号 23), hFrz7(配列番号 24), hFrz8(配列番号 25), hFrz9(配列番号 26), hFrz10(配列番号 27), sFRP1(配列番号 28), sFRP2(配列番号 29), sFRP3(配列番号 30), sFRP4(配列番号 31), sFRP5(配列番号 32), hRor1(配列番号 33), または hRor2(配列番号 34).

のCRD(ECD)を含むWnt拮抗剤をコードする。

【0149】

別の実施形態においては、核酸は

【0150】

【化 2 1】

hFrz1 (配列番号 35), hFrz2 (配列番号 36), hFrz3 (配列番号 37), hFrz4 (配列番号 38), hFrz5 (配列番号 39), hFrz6 (配列番号 40), hFrz7 (配列番号 41), hFrz8 (配列番号 42), hFrz9 (配列番号 43), hFrz10 (配列番号 44), sFRP1 (配列番号 45), sFRP2 (配列番号 46), sFRP3 (配列番号 47), sFRP4 (配列番号 48), および sFRP5 (配列番号 49).

から選択されたプロ F r z 又はプロ s F R P 蛋白質を含む W n t 拮抗体をコードする。

【0 1 5 1】

更に別の実施形態において、核酸は

【0 1 5 2】

【化 2 2】

hFrz1 (配列番号 50), hFrz2 (配列番号 51), hFrz3 (配列番号 52), hFrz4 (配列番号 53), hFrz5 (配列番号 54), hFrz6 (配列番号 55), hFrz7 (配列番号 56), hFrz8 (配列番号 57), hFrz9 (配列番号 58), hFrz10 (配列番号 59), sFRP1 (配列番号 60), sFRP2 (配列番号 61), sFRP3 (配列番号 62), sFRP4 (配列番号 63), sFRP5 (配列番号 64), hRor1 (配列番号 65), および hRor2 (配列番号 66).

から選択された成熟 F r z、s F R P 又は h R o r 蛋白質を含む W n t 拮抗体をコードする。

【0 1 5 3】

更に別の実施形態において、核酸は

【0 1 5 4】

【化 2 3】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号 83),

【0 1 5 5】

【化 2 4】

sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), または sFRP5-Fc (配列番号 88).

を含む W n t 拮抗体をコードする。

【0 1 5 6】

1つの特定の実施形態において、核酸は F r z 8 - F c をコードし、そして配列番号 1 2 2 に示す核酸配列を含む (図 5 D)。別の実施形態において、核酸は F r z 5 - F c をコードし、そして配列番号 1 1 9 に示す核酸配列を含む (図 5 C)。更に別の実施形態において、核酸は F r z 1 - F c、F r z 2 - F c、F r z 3 - F c、F r z 4 - F c、F r z 6 - F c、F r z 7 - F c、F r z 9 - F c、F r z 1 0 - F c、s F R P 1 - F c、s F R P 2 - F c、s F R P 3 - F c、s F R P 4 - F c、又は F R P 5 - F c をコードし、そして、図 5 に示す核酸配列を含む (A-H)。例えば、核酸は

【0 1 5 7】

10

20

30

40

【化 2 5】

Frz1-Fc (配列番号 115), Frz2-Fc (配列番号 116), Frz3-Fc (配列番号 117), Frz4-Fc (配列番号 118), Frz5-Fc (配列番号 119), Frz6-Fc (配列番号 120), Frz7-Fc (配列番号 121), Frz8-Fc (配列番号 122), Frz9-Fc (配列番号 123), Frz10-Fc (配列番号 124), sFRP1-Fc (配列番号 125), sFRP2-Fc (配列番号 126), sFRP3-Fc (配列番号 127), sFRP4-Fc (配列番号 128), or sFRP5-Fc (配列番号 129).
を含む。

10

【0158】

本発明の別の態様は上記した核酸に高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。

3. W n t 拮抗体変異体

本明細書に記載したW n t 拮抗体ポリペプチドに加えて、W n t 拮抗体変異体を製造することも意図している。そのような変異体は、コードDNA内に適切なヌクレオチド変化を導入することによるか、及び／又は所望の変異体の合成により製造できる。アミノ酸変化はW n t 拮抗体の翻訳後のプロセスを改変する可能性があることは当業者の知る通りであり、例えばグリコシル化部位の数又は位置の変化、又は膜アンカリング特性の改変が挙げられる。

20

【0159】

W n t 拮抗体変異体は例えば1つ以上のドメイン中のアミノ酸残基における突然変異又はアミノ酸変異体であって、依然として生物学的活性を保持しているものを包含する。W n t 拮抗体変異体は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失又は付加を有するが、依然として生物学的活性を保持しているW n t 拮抗体も包含する。アミノ酸残基の付加又は欠失は特に、F r z ドメイン成分及びF c ドメインが連結されているアミノ酸配列を包囲する領域において、そのような領域がリンカーを含有するか否かに関わらず、生じる場合がある。W n t 拮抗体変異体はレファレンスW n t 拮抗体ポリペプチド配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有する。一般的にそのような変異体は実質的にはレファレンス配列よりもW n t 蛋白質に対して同じかそれより大きい、例えば当該分野で受け入れられている結合アッセイの定量単位／尺度に基づいて、少なくとも0.75X、0.8X、0.9X、1.0X、1.25X、1.5Xの結合親和性を呈する。

30

【0160】

特定の実施形態においては、W n t 拮抗体変異体は

【化 C 2 6】

hFrz1 (配列番号 18), hFrz2 (配列番号 19), hFrz3 (配列番号 20), hFrz4 (配列番号 21), hFrz5 (配列番号 22), hFrz6 (配列番号 23), hFrz7 (配列番号 24), hFrz8 (配列番号 25), hFrz9 (配列番号 26), hFrz10 (配列番号 27), sFRP1 (配列番号 28), sFRP2 (配列番号 29), sFRP3 (配列番号 NO: 30), sFRP4 (配列番号 31), sFRP5 (配列番号 32), hRor1 (配列番号 33), または hRor2 (配列番号 34).

40

【0161】

のC R D (E C D) と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するF r z ドメイン成分を含むキメラ分子である。

50

【0162】

別の実施形態においては、W n t 拮抗体変異体は

【0163】

【化27】

hFrz1 (配列番号 35), hFrz2 (配列番号 36), hFrz3 (配列番号 37), hFrz4 (配列番号 38), hFrz5 (配列番号 39), hFrz6 (配列番号 40), hFrz7 (配列番号 41), hFrz8 (配列番号 42), hFrz9 (配列番号 43), hFrz10 (配列番号 44), sFRP1 (配列番号 45), sFRP2 (配列番号 46), sFRP3 (配列番号 47), sFRP4 (配列番号 48), および sFRP5 (配列番号 49).

10

から選択されたプロ F r z 又はプロ s F R P 蛋白質と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸配列同一性を有する F r z ドメイン成分を含むキメラ分子である。

【0164】

更に別の実施形態においては、W n t 拮抗体変異体は

【0165】

【化28】

hFrz1 (配列番号 50), hFrz2 (配列番号 51), hFrz3 (配列番号 52), hFrz4 (配列番号 53), hFrz5 (配列番号 54), hFrz6 (配列番号 55), hFrz7 (配列番号 56), hFrz8 (配列番号 57), hFrz9 (配列番号 58), hFrz10 (配列番号 59), sFRP1 (配列番号 60), sFRP2 (配列番号 61), sFRP3 (配列番号 62), sFRP4 (配列番号 63), sFRP5 (配列番号 64), hRor1 (配列番号 65), および hRor2 (配列番号 66).

20

から選択された成熟 F r z、s F R P 又は h R o r 蛋白質と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸配列同一性を有する F r z ドメイン成分を含むキメラ分子である。

30

【0166】

更に別の実施形態においては、W n t 拮抗体変異体は

【0167】

【化29】

Frz8-Fc (配列番号 74), Frz5-Fc (配列番号 75), Frz1-Fc (配列番号 76), Frz2-Fc (配列番号 77), Frz3-Fc (配列番号 78), Frz4-Fc (配列番号 79), Frz6-Fc (配列番号 80), Frz7-Fc (配列番号 81), Frz9-Fc (配列番号 82), Frz10-Fc (配列番号

40

【0168】

【化30】

83), sFRP1-Fc (配列番号 84), sFRP2 (配列番号 85), sFRP3-Fc (配列番号 86), sFRP4-Fc (配列番号 87), および sFRP5-Fc (配列番号 88).

と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸配列同一性を有する F r z ドメイン成分を含むキメラ分子である。

【0169】

「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」とは 2 つの配列を整列させる場合にレファレ

50

ンス（親）ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一であるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。％アミノ酸同一性を決定するためには、配列を整列させ、そして必要に応じてギャップを導入することにより最大％配列同一性を達成し；保存的置換は配列同一性の部分とはみなさない。パーセント同一性を決定するためのアミノ酸配列アライメント手順は当該分野で良く知られている。頻繁には公的に入手できるコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST2、ALIGN2又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアを用いることによりペプチド配列を整列させる。比較すべき配列の全長に渡る最大アライメントを達成するために必要ないずれかのアルゴリズムを包含するアライメントを計測するための適切なパラメータは当業者が決定できる。

【0170】

アミノ酸配列を整列させる場合、所定のアミノ酸配列Aの、所定のアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性（代替的には、所定のアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する特定の％アミノ酸配列同一性を有するか含む所定のアミノ酸配列Aとして表現することもできる）は以下の通り計算できる。

【0171】

％アミノ酸配列同一性 = $X / Y \times 100$

式中、

XはA及びBの配列アライメントプログラム又はアルゴリズムのアライメントにより完全一致と採点されたアミノ酸残基の数であり、

そして、

YはBにおけるアミノ酸残基の総数である。

【0172】

「単離された」又は「精製された」ペプチド、ポリペプチド、蛋白質又は生物学的に活性なフラグメントは、その天然の環境の成分から分離及び／又は回収されている。夾雑成分としては、ポリペプチドの診断上又は治療上の使用を典型的には妨害すると考えられる物質を包含し、そして酵素、ホルモン、及び他の蛋白質性又は非蛋白質性の物質を包含してよい。好ましくは30乾燥重量％未満の望ましくない夾雑物質（夾雑物）、好ましくは20％、10％未満、そして好ましくは5％未満の夾雑物を有する調製品が実質的に単離されたとみなされる。単離された、組み換え産生されたペプチド／ポリペプチド、又はその生物学的に活性な部分は好ましくは実質的に培地不含であり、即ち培地はペプチド／ポリペプチド調製品の体積の好ましくは20％未満、好ましくは約10％未満、そして好ましくは約5％未満に相当する。夾雑物の例は細胞破碎物、培地、及びペプチド／ポリペプチドのインビトロ合成の間に使用及び生成された物質を包含する。

【0173】

本明細書に記載するWnt拮抗体における変異は、例えば米国特許第5,364,934号に記載された保存的及び非保存的突然変異に関する手法及び指針の何れかをいながら行うことができる。変異はネイティブの配列の抗体又はポリペプチドと比較した場合にアミノ酸配列における変化をもたらす抗体又はポリペプチドをコードする1つ以上のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合により、変異は、1つ以上のWnt拮抗体ドメインにおける少なくとも1つのアミノ酸の何れかの他のアミノ酸による置換による。どのアミノ酸残基を所望の活性に悪影響を及ぼさずに挿入、置換又は欠失させ得るかを決定する場合の手掛かりは、Wnt拮抗体の配列を相同な既知の蛋白質分子のものと比較すること、及び、高相同性の領域において生じたアミノ酸配列変化の数を最小限にすることにより発見してよい。アミノ酸置換は1つのアミノ酸を同様の構造及び／又は化学的特性を有する別のアミノ酸により置き換えること、例えばロイシンのセリンによる置き換え、即ち保存的なアミノ酸の置き換える結果であることができる。挿入、欠失又は置換は場合により約1～5アミノ酸の範囲内であってよい。許容される変異は、配列内のアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成すること、及び、生じた変異体を全長又は成熟ネイティブ配列により呈される活性に関して試験することにより決定してよい。

【0174】

W n t 拮抗体は多くの従来の手法の何れかにより製造してよい。所望のペプチドフラグメントは化学合成してよい。代替法においては、例えば特定のアミノ酸残基により定義される部位において蛋白質を切断することが知られている酵素で蛋白質を処理することによるか、又は適当な制限酵素でDNAを消化して所望のフラグメントを単離することによる酵素的消化によって、抗体又はポリペプチドのフラグメントを形成する。更に別の適当な手法では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により所望の抗体又はポリペプチドのフラグメントをコードするDNAフラグメントを単離して増幅することを含む。DNAフラグメントの所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドはPCRにおいては5'及び3'プライマーにおいて使用される。

【0175】

特定の実施形態においては、目的の保存的置換は好ましい置換という見出しで表Aに示す。そのような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、次に、表Aにおいて命じた例示的置換とされているか、又はアミノ酸クラスに言及しながら後に説明される、より実質的な変化を導入し、そして生成物をスクリーニングする。

【表A】

表A

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

【0176】

W n t 拮抗体の機能又は免疫学的実体における実質的な修飾は、（a）例えばシート又は螺旋状のコンホーメーションとしての置換域におけるポリペプチド骨格の構造、（b）

標的部位における分子の電荷又は疎水性、又は（c）側鎖の嵩の維持に対するその作用が有意に異なる置換を選択することにより達成される。天然に存在する残基は共通の側鎖の特性に基づいて以下の通り分割される。

- (1) 疎水性：N o l r o i s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l u；
- (3) 酸性：A s p、G l u；
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎖の方向に影響する残基：G l y、P r o；及び、
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを他のクラスと交換することを必然的に課する。そのように置換された残基は、保存的置換の部位内に、又は、より好ましくは、残余の（非保存の）部位内に導入されてもよい。

【0177】

変異は当該分野で知られた方法、例えばオリゴヌクレオチド媒介（部位指向性）突然変異誘発、アラニンスキャニング、及びPCR突然変異誘発を用いて実施できる。部位指向性突然変異誘発 [C a r t e r 等、N u c l . A c i d s R e s . , 13:4331 (1986) ; Z o l l e r 等、N u c l . A c i d s R e s . , 10:6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [W e l l s 等、G e n e , 34:315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 [W e l l s 等、P h i l o s . T r a n s . R . S o c . L o n d o n S e r A , 317:415 (1986)] 又は他の既知の手法をクローニングされたDNAに対して実施することにより本発明のW n t 拮抗体を製造することができる。

【0178】

スキャニングアミノ酸分析もまた隣接配列に沿った1つ以上のアミノ酸を発見するために使用できる。好ましいスキャニングアミノ酸は相対的に小型の中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸はアラニン、グリシン、セリン及びシステインを包含する。アラニンは典型的にはそれがベータ炭素を超えて側鎖を排除し、そして変異体の主鎖のコンホメーションを改変する可能性が低いことから、このグループ内では好ましいスキャニングアミノ酸である [C u n n i n g h a m a n d W e l l s , S c i e n c e , 244:1081-1085 (1989)]。また、アラニンは典型的には、それが最も一般的なアミノ酸であることから好ましい。更に、それは埋没及び曝露された位置の両方において頻繁に存在する [C r e i g h t o n , T h e p r o t e i n s , (W . H . F r e e m a n & C o . , N Y) ; C h o t h i a , J . M o l . B i o l . , 150:1 (1976)]。アラニン置換が十分量の変異体を与えない場合は、アイソテリックアミノ酸を使用できる。

【0179】

W n t 拮抗体の適切なコンホメーションを維持することに関与しない何れかのシステイン残基も、一般的にセリンで置換されることにより、分子の酸化安定性を向上させ、そして異常な架橋を抑制することができる。逆に、システイン結合をW n t 拮抗体に添加することによりその安定性を向上させてよい（特に抗体がF vフラグメントなどの抗体フラグメントの場合）。

【0180】

置換変異体の特に好ましい型においては、親抗体（例えばヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基を置換する。一般的に、その後の開発のために選択される得られた変異体はそれらの作成元となった親抗体に対して向上した生物学的特性を有することになる。そのような置換変異体を形成するための好都合な方法では、ファージ提示法を用いた親和性突然変異を行う。概すれば、数種の超可変領域部位（例えば6～7部位）を突然変異させることにより各部位において全ての可能なアミノ酸置換を発生させる。このようにして発生した抗体変異体は、フィラメントファージ粒子から一価の様相において、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物への融合物として提示される。次に

ファージ提示された変異体を本明細書に開示する通りそれらの生物学的活性（例えば結合親和性）に関してスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域を発見するためには、アラニンスキャニング突然変異誘発を実施することにより抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を発見できる。代替的に、又は追加的に、Wnt拮抗体とWnt蛋白質との間の接点を識別するために抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することも有利な場合がある。そのような接触残基及び近隣残基は本明細書において精査している手法に従った置換の候補となる。そのような変異体を形成したのち、変異体のパネルを本明細書に記載するスクリーニングに付し、そして1つ以上の該当するアッセイにおいて優れた特性を有する抗体をその後の開発のために選択してよい。

【0181】

Wnt拮抗体の共有結合修飾は本発明の範囲に包含される。共有結合修飾の1つの型はWnt拮抗体の標的化されたアミノ酸残基をWnt拮抗体の選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応することができる有機性の誘導体化剤に反応させることを包含する。二官能性物質を用いた誘導体化は、例えば、Wnt拮抗体を精製するための方法における使用のための水溶性の支持体マトリクス又は表面にWnt拮抗体を架橋させる場合に有用である。一般的に使用されている架橋剤は、例えば1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルアラニン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル、例えばジスクシンイミジルエステル、例えば3, 3'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）、二官能性マレイミド、例えばビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン及びメチル-3-〔（p-アジドフェニル）ジチオ〕プロピオイミデートなどの物質を包含する。

【0182】

他の修飾はグルタミル及びアスパラギン残基からそれぞれ相当するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基のヒドロキシル基のホスホリル化、リジン、アルギニン、及びヒスチジンの側鎖のα-アミノ基のメチル化〔T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)〕、N末端アミンのアセチル化、及び何れかのC末端カルボキシル基のアミド化を包含する。

【0183】

本発明の範囲内に包含されるWnt拮抗体の共有結合修飾の別の型はWnt拮抗体のFrz、Wnt又はsFRPポリペプチドドメインのネイティブのグリコシル化パターンを改変することを含む。「ネイティブのグリコシル化パターンを改変する」とは成分ドメインのネイティブの配列に存在する1つ以上の炭水化物部分を欠失させること（伏在するグリコシル化部位を除去することによるか、又は化学的及び／又は酵素的手段によりグリコシル化を欠失させることによる）、及び／又は、ネイティブ配列の成分ドメインには存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加させることとして定義される。更に、この句には存在する種々の炭水化物部分の性質及び比率の変化が関与するネイティブ蛋白質のグリコシル化における定性的変化も包含される。

【0184】

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN連結又はO連結である。N連結とはアスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。Xがプロリン以外の何れかのアミノ酸であるトリペプチド配列、即ちアスパラギン-X-セリン、及びアスパラギン-X-スレオニンは、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。即ちポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在することは、潜在的なグリコシル化部位を生じさせる。O連結グリコシル化は、糖の1つであるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも使用してよい。

【0185】

Wnt拮抗体へのグリコシル化部位の付加は、好都合には、アミノ酸配列をそれが1つ以上の上記トリペプチド配列を含有するように改変することにより達成される（N連結グリコシル化部位の場合）。改変は、元の（即ち前変異体の）Wnt拮抗体の配列の配列への1つ以上のセリン又はスレオニン残基の付加又は置換により行ってもよい。この配列は場合により、DNAレベルにおける変化を介して、特に、所望のアミノ酸に翻訳することになるコドンが形成されるように予め選択された塩基における配列をコードするDNAを突然変異させることにより改変してもよい。

【0186】

Wnt拮抗体上の炭水化物部分の数を増やす別の手段はポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的なカップリングによる。そのような方法は当該分野で知られており、例えば1987年9月11日に公開されたWO87/05330及びAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0187】

Wnt拮抗体上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、又はグリコシル化の標的として作用するアミノ酸残基に関してコードしているコドンの突然変異的置換により達成してもよい。化学的な脱グリコシル化手法は当該分野で知られており、そして、例えばHakimuddin等、Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)及びEdge等、Anal. Biochem., 118:131 (1981)に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断はThotakura等、Meth. Enzymol., 138:350 (1987)により記載されている通り種々のエンドー及びエキソグリコシダーゼの使用により達成できる。

【0188】

Wnt拮抗体の共有結合修飾の別の型は、米国特許4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192又は4,179,337に記載の様式において、種々の非蛋白質性の重合体の1つ、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンに配列を連結することを含む。抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション手法によるか又は界面重合により（例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）により製造されたマイクロカプセル中、コロイド状薬物送達システム（例えばリボソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に捕獲してもよい。そのような手法はRemington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Gennaro, A. 編（2000）に開示されている。

【0189】

本発明のWnt拮抗体は、別の非相同ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したWnt拮抗体を含む別のキメラ（即ちFrz-、sFRP-又はRor-Fcキメラ）の性質を有する分子を形成するやり方で修飾してもよい。

【0190】

1つの実施形態において、そのようなキメラ分子は抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを与えるタグポリペプチドとのWnt拮抗体の融合物を含む。エピトープタグは一般的にWnt拮抗体のアミノ又はカルボキシル末端に位置する。Wnt拮抗体のこのようなエピトープタグ化形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出できる。更に、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体を用いたアフィニティ精製、又はエピトープタグに結合するアフィニティマトリクスの別の型によりWnt拮抗体を容易に精製可能にする。種々のタグポリペプチド及びその各々抗体は当該分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（ポリ-his-gly）タグ；インフルエンザHAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等、Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；

10

20

30

40

50

c-myc タグ及びそれに対する 8F9、3C7、6E10、G4、B7 及び 9E10 抗体 [Evan 等、Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)] ; 及び単純疱疹ウィルス糖蛋白質 D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky 等、Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)] が包含される。他のタグポリペプチドは Flag-ペプチド [Hopp 等、BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)] ; KT3 エピトープペプチド [Martin 等、Science, 255: 192-194 (1992)] ; アルファチュブリンエピトープペプチド [Skinner 等、J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)] ; 及び T7 遺伝子 10 蛋白質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)] を包含する。 10

【0191】

代替実施形態において、Wnt 拮抗抗体は変異体 Fc 成分を含む。例えば Fc 領域はヒンジシステインの位置を包含する 1 つ以上のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾（例えば置換）を含んでいるヒト Fc 領域配列（例えばヒト IgG1、IgG2、IgG3、又は IgG4 Fc 領域）を含んでよい。1 つの実施形態においてそのような変異体はレファレンス Fc ポリペプチド配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% のアミノ酸配列同一性を有する。

【0192】

1 つの実施形態において、Fc 領域変異体は改変された新生児 Fc 受容体 (FcRn) 結合活性を呈する場合がある。そのような変異体 Fc 領域は、Fc 領域のアミノ酸位置 238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439 又は 447 の何れか 1 つ以上においてアミノ酸修飾を含んでよく、Fc 領域における残基のナンバリングは、Kabata における EU インデックスのナンバリングである。FcRn に対する低減された結合を有する Fc 領域変異体は、Fc 領域のアミノ酸位置 252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439 又は 447 の何れか 1 つ以上においてアミノ酸修飾を含んでよい (EU インデックス/Kabata ナンバリング)。或いは、FcRn に対して増大した結合を示す変異体は Fc 領域のアミノ酸位置 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 又は 434 の何れか 1 つ以上においてアミノ酸修飾を含んでよい (EU インデックス/Kabata ナンバリング)。 30

【0193】

他の実施形態においては、Fc 領域変異体は FcγR に対する低減した結合を示してよく、Fc 領域の位置 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438 又は 439 においてアミノ酸修飾を含む (EU インデックス/Kabata ナンバリング)。 40

【0194】

更に別の実施形態において、Fc 領域変異体は FcγRII に対する低減した結合を示してよく、Fc 領域のアミノ酸位置 238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438 又は 439 の何れか 1 つ以上においてアミノ酸修飾を含む (EU インデックス/Kabata ナンバリング)。 50

【0195】

更なる実施形態において、Fc領域変異体はFcγRIIに対する増強された結合を示してよく、Fc領域のアミノ酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、338、373、376、414、416、419、435、438又は439の何れか1つ以上においてアミノ酸修飾を含む（EUインデックス/Kabatナンバリング）。

【0196】

なお更なる実施形態においては、目的のFc領域変異体はFcγRIIIに対する低減された結合を示してよく、Fc領域のアミノ酸位置238、239、249、252、254、265、268、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435、又は437の1つ以上においてアミノ酸修飾を含む（EUインデックス/Kabatナンバリング）。

【0197】

なお更なる実施形態において、改変された（即ち向上又は軽減された）C1q結合及び／又は補体依存性細胞毒性（CDC）を有するFc領域変異体がWO99/51642に記載されている。そのような変異体は、Fc領域のアミノ酸位置270、322、326、327、329、331、333又は334の1つ以上においてアミノ酸置換を含んでよい。また、Fc領域変異体に関してはDuncan and Winter, Nature 322: 738-40 (1988)；米国特許5,648,260；米国特許5,624,821及びWO94/29351を参照できる。

B. Wnt拮抗体の製造

以下の説明は主にWnt拮抗体ポリペプチドコード核酸を含有するベクターで形質転換又はトランスフェクトされた細胞を培養することによるWnt拮抗体ポリペプチドの製造に関する。当然ながら当該分野で良く知られている代替法もそのようなWnt拮抗体を製造するために使用してよいことを意図している。例えば適切なアミノ酸配列又はその部分は固相技術を用いながら直接ペプチド合成により製造してよい〔例えばStewart等、Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)； Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) 参照〕。インビトロでの蛋白質合成は手動法を用いるか、又は自動により行ってよい。自動合成は例えばApplied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA)を用いながら製造元の取扱説明書を使用して達成してよい。Wnt拮抗体ポリペプチドの種々の部分を別個に化学合成し、そして化学的又は酵素的な方法を用いて組み合わせることにより所望の配列を製造してよい。

1. Wnt拮抗体ポリペプチドをコードするDNAの単離

拮抗体の配列又はWnt拮抗体の何れかの所望の成分ドメイン、例えばFrz又はsFRPをコードするDNAは、そのような配列を保有し、そして検出可能なレベルでそれを発現すると考えられている組織から製造したcDNAライブラリから得てよい。従って、ヒトFrz又はsFRP配列DNAはヒト組織から製造したcDNAライブラリから好都合に得ることができる。所望のDNA配列遺伝子は、ゲノムライブラリから、又は既知の合成手順（例えば自動核酸合成）により得てもよい。

【0198】

ライブラリは目的の遺伝子又はそれによりコードされる蛋白質を識別するように設計されたプローブ（例えば少なくとも約20～80塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を用いながら実施してよい。Wnt拮抗体ポリペプチド及びその成分をコードする遺伝子

を単離するための代替的手段はPCR法を使用することである〔Sambrook等、上出；Dieffenbach等、PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)〕。

【0199】

cDNAライブラリをスクリーニングするための手法は当該分野で良く知られている。プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は偽陽性が最小限となるように十分な長さのものであり、そして十分に明確である必要がある。オリゴヌクレオチドは好ましくはそれがスクリーニングされているライブラリ中のDNAへのハイブリダイゼーション時に検出されることができるよう標識される。標識方法は当該分野で良く知られており、³²P-標識ATPのような放射性標識の使用、ビオチニル化、又は酵素標識を包含する。ハイブリダイゼーション条件、例えば中ストリンジェンシー及び高ストリンジェンシー等は上記Sambrook等に記載されている。

【0200】

そのようなライブラリスクリーニング法において識別された配列はGenBankなどの公的なデータベース又は他の私的な配列データベースに寄託されそこから入手できる他の既知配列と比較し、そして整列させることができる。分子の指定領域内、又は全長配列に渡る配列同一性（アミノ酸又はヌクレオチドレベルの何れかにおける）は当該分野で知られた方法を用いながら、そして本明細書に記載する通り、決定することができる。

【0201】

Fc免疫グロブリンDメインをコードするDNA配列は所望のFcサブタイプのmAbを分泌するハイブリドーマ細胞から誘導してよい。

【0202】

蛋白質コード配列を有する核酸は本明細書において最初に開示された推定アミノ酸配列を用いて選択されたcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすること、そして必要に応じて、cDNAに逆転写されていないと考えられるmRNAの前駆体及びプロセシング中間体を検出するための上記Sambrook等において記載されている従来のプライマー伸長手順を用いることにより得てよい。

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞はWnt拮抗抗体ポリペプチド産生に関して本明細書に記載した発現ベクター又はクローニングベクターを用いてトランスフェクト又は形質転換し、そしてプロモータの誘導、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜変性された従来の栄養培地中で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pHなどは予定外の実験を行うことなく当業者が選択できる。一般的に、細胞培養の生産性を最大限にするための原理、プロトコル及び実際の手法はMammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, 編 (IRL Press, 1991) 及びSambrook等、上出に記載されている。

【0203】

真核生物細胞のトランスフェクション及び原核生物細胞の形質転換の方法は当該分野で知られる通りであり、例えばCaCl₂、CaPO₄、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションである。使用する宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適切である標準的手法を用いて実施する。上記Sambrook等に記載されている塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、又はエレクトロポレーションが一般的には原核生物に対して使用されている。Shaw等、Gene, 23: 315 (1983) 及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されている通り、特定の植物細胞の形質転換のためにはアグロバクテリウム・ツメファシエンシスによる感染が使用される。そのような細胞壁を有さない哺乳動物細胞に対しては、Graham and van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈澱方法を使用できる。哺乳動物細胞宿主系トランスフェクションの一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は典型的にはVan Solinge

n等、J. Bact., 130:946 (1977) 及びHsiao等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、細胞にDNAを導入するための他の方法、例えば核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、未損傷細胞との細菌プロトプラスト融合、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチンも使用してよい。哺乳動物細胞を形質転換するための種々手法に関してはKeown等、Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) and Mansour等、Nature, 336:348-352 (1988) を参照できる。

【0204】

本明細書に記載したベクターにおいてDNAをクローニング又は発現させるための適当な宿主細胞は、原核生物、酵母、又はより高次の真核生物の細胞を包含する。適当な原核生物は、例えば限定しないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性の生物、例えば腸内細菌科、例えば大腸菌を包含する。種々の大腸菌株が公的に入手可能であり、例えば大腸菌K12菌株MM294 (ATCC 31, 446) ; 大腸菌X1776 (ATCC 31, 537) ; 大腸菌株W3110 (ATCC 27, 325) 及びK5772 (ATCC 53, 635) が挙げられる。他の適当な原核生物宿主細胞は腸内細菌科、例えばエシェリシア、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウイニア、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばサルモネラ・チフィウム、セラチア、例えばセラチア・マルセスカンス、及びシゲラ、並びにバチルス、例えばB・サブチルス及びB・リシェニフォルミス (例えば1989年4月12日に公開されたDD266, 710に開示されているB・リシェニフォルミス41P)、シュドモナス、例えばP・アエルギノーサ、及びストレプトマイセスを包含する。これらの例は例示に過ぎず、限定するものではない。菌株W3110は組み換えDNA産物発酵のための共通した宿主菌株であることから、特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小限の量の蛋白質分解性酵素を分泌する。例えば菌株W3110は宿主にとって内因性である蛋白質をコードする遺伝子における遺伝子突然変異を起こすように修飾してよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110菌株1A2 ; 完全な遺伝子型tonAptr3を有する大腸菌W3110菌株9E4 ; 完全な遺伝子型tonAptr3phoAE15 (argF-lac) 169degPompTkant^rを有する大腸菌W3110菌株27C7 (ATCC 55, 244) ; 完全な遺伝子型tonAptr3phoAE15 (argF-lac) 169degPompTrbs7ilvGkant^rを有する大腸菌W3110菌株37D6 ; 非カナマイシン耐性degP欠失突然変異を有する菌株37D6である大腸菌W3110菌株40B4 ; 及び1990年8月7日発行の米国特許4, 946, 783に開示されている突然変異体ペリプラズムプロテアーゼを有する大腸菌株が包含される。或いは、クローニングのインビトロでの方法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が適当である。

【0205】

全長の抗体、抗体フラグメント、及び抗体融合蛋白質は、特にグリコシル化及びFcエフェクタ機能が必要でない場合、例えば治療用抗体が細胞毒性剤 (例えば毒素) にコンジュゲートされており、そしてイムノコンジュゲート自体が腫瘍細胞破壊において有効性を示す場合には、細菌中で生産することができる。全長の抗体は循環系中でより長い半減期を有する。大腸菌中での生産はより急速であり、そして経費効率的である。細菌中の抗体フラグメント及びポリペプチドの発現については、例えば米国特許5, 648, 237 (Carter等)、米国特許5, 789, 199 (Joly等)、及び米国特許5, 840, 523 (Simmons等) を参照することができ、これは翻訳開始領域 (TIR) 並びに発現及び分泌を最適化するためのシグナル配列を記載しており、これらの特許は参照により本明細書に組み込まれる。発現後、抗体を可溶性画分において大腸菌細胞ペーストから単離し、そしてアイソタイプに応じて例えばプロテインA又はGカラムを通過させて精製できる。最終精製は例えばCHO細胞において発現された抗体を精製するための過程と同様に実施できる。

10

20

30

40

50

【0206】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核生物の微生物もWnt拮抗抗体ポリペプチドコードベクターのためのクローニング又は発現宿主として適している。サッカロマイセス・セレピシアエは一般的に使用されている真核生物宿主微生物である。他にはスキゾサッカロマイセスポンベ (Beach and Nurse, Nature, 290:140 [1981]; 1985年5月2日公開のEP139, 383); クルイペロマイセス宿主 (米国特許第4, 943, 529号; Fleer等、Bio/Technology, 9:968-975 (1991))、例えばK・ラクチス (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等、J. Bacteriol., 154 (2):737-742 [1983])、K・フラジリス (ATCC12, 424)、K・ブルガリクス (ATCC16, 045)、K・ウイケラミ (ATCC24, 178)、K・ワルチ (ATCC56, 500)、K・ドロソフィラム (ATCC36, 906; Van den Berg等、Bio/Technology, 8:135 (1990))、K・サーモトレランス、及びK・マルキシアヌス; ヤロウイア (欧州特許402, 226); ピチア・パストリス (欧州特許183, 070; Sreekrishna等、J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマ・リーシア (EP244, 234); ニューロスボラ・クラッサ (Case等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス (1990年10月31日公開の欧州特許394, 538); 及び糸状真菌、例えばニューロスボラ、ペニシリウム、トリボクラジウム (1991年1月10日公開のWO91/00357) 及びアスペルギルス宿主、例えばA・ニズランス (Ballance等、Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn等、Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) 及びA・ニガー (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]) が包含される。メチロトロピックな酵母が本発明において適当であり、そして限定しないがハンセヌラ、カンジダ、クロエケラ、ピチア、サッカロマイセス、トルロプシス及びロドトルラよりなる属から選択したメタノールでの成長が可能な酵母を包含する。酵母のこのクラスの例である特定の種のリストはC. Anthony, The Biochemistry of Methylotherophs, 269 (1982) に記載されている。

【0207】

グリコシル化Wnt拮抗抗体ポリペプチドの発現のための適当な宿主細胞は多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例は昆虫細胞、例えばドロソフィリアS2及びスポドプテラSf9、並びに植物細胞、例えばメンカ、トウモロコシ、バレイショ、ダイズ、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養物を包含する。多くのバキュロウィルス菌株及び変異体及びスポドプテラ・フルギベルダ (イモムシ)、アエデス・アエギプチ (カ)、アエダス・アルドピクタス (カ)、ドロソフィリア・メラノガスター (ミバエ)、及びボンビックス・モリなどの宿主に由来する相当する許容性の昆虫宿主細胞が識別されている。トランスフェクションのための種々のウィルス株が公的に入手可能であり、例えばオートグラフ・カリフォルニカNPVのL-1変異体及びボンビックス・モリNPVのBm-5菌株が挙げられ、そしてそのようなウィルスは特にスポドプテラ・フルギベルダ細胞のトランスフェクションのために本発明に従ってここでウィルスとして使用してよい。

【0208】

しかしながら、脊椎動物細胞において最大の利益がもたらされており、そして培養物 (組織培養物) 中の脊椎動物細胞の増殖が常套的な手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞系の例はSV40で形質転換されたサル腎CV1系 (COS-7、ATCC CRL 1651); ヒト胚性腎細胞系 (293又は懸濁培養物中の成長のためにサブクローニングされた293細胞、Graham等、J. Gen Virol., 36:59 (1977)

)) ; ベビーハムスター腎細胞 (BHK, ATCC CCL10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)) ; マウスセルトリー細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ; サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL70) ; アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL2) ; イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL34) ; バッファローラット肝細胞 (BRL3A, ATCC CRL1442) ; ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL75) ; ヒト肝細胞 (HepG2, HB8065) ; マウス乳腺腫瘍 (MMT060562, ATCC CCL51) ; TRI細胞 (Mather等, Annals NY Acad. Sci. 383:44-68 (1982)) ; MRC5細胞 ; FS4細胞 ; 及びヒトヘパトーマ系統 (HepG2) である。

10

【0209】

宿主細胞はWnt拮抗体ポリペプチド生産用の上記発現又はクローニングベクターで形質転換し、そしてプロモータの誘導、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に変性された従来の栄養培地中で培養する。

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

本発明の1つの態様はクローニング (DNAの増幅) のため、又は発現のために複製可能なベクター内に挿入されたWnt拮抗体ポリペプチドをコードする核酸 (例えばcDNA又はゲノムDNA) を使用可能とする。種々のベクターが公的に入手できる。ベクターは例えばプラスミド、コスミド、ウィルス粒子、又はファージであってよい。適切な核酸配列を種々の手順によりベクター内に挿入してよい。一般的に、DNAは当該分野で知られた手法を用いて適切な制限エンドヌクレアーゼ部位内に挿入される。ベクター成分は一般的に1つ以上のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサエレメント、プロモータ、及び転写終止配列を包含するがこれらに限定されない。これらの成分の1つ以上を含有する適当なベクターの構築は当該分野で知られた標準的なライゲーション手法を用いる。

20

【0210】

Wnt拮抗体は直接的のみならず、成熟蛋白質又はポリペプチドのN末端における特定の切断部位を有するシグナル配列又は他のポリペプチドであってよい、非相同ポリペプチドとのポリペプチドの融合物として組み換え生産してよい。一般的にシグナル配列はベクターの成分であってよく、又はそれはベクター内に挿入されるWnt拮抗体ポリペプチドコードDNAの一部であってよい。シグナル配列は例えばアルカリホスファターゼ、ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーよりなる群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌のためには、シグナル配列は例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー (サッカロマイセス及びクルイベロマイセスの α -因子リーダーを包含し、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、C・アルビカンスグルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日公開の欧州特許362,179)、又は1990年11月15日公開のWO90/13646に記載されているシグナルであってよい。哺乳動物細胞発現においては、哺乳動物シグナル配列、例えば同じに関連する種の分泌ポリペプチドに由来するシグナル配列、並びにウィルス分泌リーダーを用いて蛋白質の分泌を指向してよい。

30

40

【0211】

発現及びクローニングベクターは両方とも1つ以上の選択された宿主細胞においてベクターを複製可能とする核酸配列を含有する。そのような配列は種々の細菌、酵母及びウィルスに関してよく知られている。プラスミドpBR322由来の複製起点が大部分のグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミド起点は酵母に適しており、そして種々のウィルス起点 (SV40、ポリオーマ、アデノウィルス、VSV又はPBV) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

50

【0212】

発現及びクローニングベクターは典型的には選択可能なマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は (a) 抗生物質又は他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート又はテトラサイクリンに対する耐性を付与し、(b) 栄養要求性の欠損を補償し、又は (c) 複合培地からは得られない重要な栄養を供給する蛋白質をコードしており、例えばバチルスのための D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0213】

哺乳動物細胞のための適当な選択可能なマーカーの例は、DHFR 又はチミジンキナーゼなどの、Wnt 拮抗剤コード核酸の取り込み能力を有する細胞の識別を可能にするものである。野生型 DHFR を使用する場合の適切な宿主細胞は Urlaub 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) に記載の通り製造及び増殖させた DHFR 活性欠損の CHO 細胞系である。酵母で使用するための適当な選択遺伝子は酵母プラスミド YRp7 中に存在する trp1 遺伝子である [Stinchcomb 等、Nature, 282:39 (1979); Kingsman 等、Gene, 7:141 (1979); Tschemper 等、Gene, 10:157 (1980)]。trp1 遺伝子はトリプトファン中で成長する能力を欠いた酵母の突然変異株、例えば ATCC 44076 又は PEP 4-1 のための選択マーカーを与える [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【0214】

発現及びクローニングベクターは通常は mRNA 合成を指向するために Wnt 拮抗剤コード核酸配列に作動可能に連結したプロモータを含む。種々の潜在的宿主細胞により認識されるプロモータはよく知られている。原核生物の宿主で使用するのに適するプロモータは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモータ系 [Chang 等、Nature, 275:615 (1978); Goeddel 等、Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモータ系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許 36, 776] 及びハイブリッドプロモータ、例えば tac プロモータ [de Boer 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] を包含する。細菌系における使用のためのプロモータもまた Wnt 拮抗剤ポリペプチドをコードする DNA に作動可能に連結した Shine-Dalgarno (S. D.) 配列を含む。

【0215】

酵母宿主と共に使用するための適当なプロモータ配列の例は 3-ホスホグセレートキナーゼ [Hitzenman 等、J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の解糖系酵素 [Hess 等、J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのためのプロモータを包含する。

【0216】

成長条件により制御される転写の追加的利点を有する誘導プロモータである他の酵母プロモータはアルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクローム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ及びマルトース及びガラクトースの利用を担う酵素のプロモータ領域である。酵母発現において使用するための適当なベクター及びプロモータは EP 73, 657 においても記載されている。

【0217】

哺乳動物宿主細胞中におけるベクターからのWnt拮抗体ポリペプチドの転写は例えばポリオーマウィルス、鶏痘ウィルス（1989年7月5日公開のUK2, 211, 504）、アデノウィルス（例えばアデノウィルス2）、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びシミアンウィルス40（SV40）などのウィルスのゲノムから、非相同哺乳動物プロモータ、例えばアクチンプロモータ又は免疫グロブリンプロモータから、そして、熱ショックプロモータから得られたプロモータによりにより制御されるが、このようなプロモータが宿主細胞系と適合することを条件とする。

【0218】

より高等な真核生物によるWnt拮抗体ポリペプチドをコードするDNAの転写はベクター中にエンハンサ配列を挿入することにより増大させてよい。エンハンサは通常は約10～300bpのDNAのシス作用性エレメントであり、これはプロモータに対してその転写を増大させるように作用する。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサ配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン）。しかしながら典型的には、真核生物細胞ウィルス由来のエンハンサを使用することになる。例としては複製起点の後期側上のSV40エンハンサ（bp100-270）、サイトメガロウィルス早期プロモータエンハンサ、複製起点の後期側上のポリオーマエンハンサ及びアデノウィルスエンハンサが包含される。エンハンサはWnt拮抗体ポリペプチドコード配列に対して5'又は3'の位置においてベクター内にスプライスしてよいが、好ましくはプロモータから5'側の部位に位置する。

【0219】

真核生物宿主細胞（酵母、カビ、昆虫、植物、動物、ヒト又は他の多細胞生物由来の有核細胞）中で使用する発現ベクターはまた転写の終止のため、及びmRNAの安定化のために必要な配列を含有する。そのような配列は真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'側、場合によっては3'側の未翻訳の領域から一般的に得られる。これ等の領域はWnt拮抗体をコードするmRNAの未翻訳部分内のポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。

【0220】

組み換え脊椎動物細胞培養物中のWnt拮抗体ポリペプチドの合成に適合させるために適するさらに別の方法、ベクター及び宿主細胞はGething等、Nature, 293:620-625（1981）；Mantei等、Nature, 281:40-46（1979）；欧州特許117,060；及び欧州特許117,058に記載されている。

4. 宿主細胞の培養

本発明の1つの態様はWnt拮抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を提供する。本発明のWnt拮抗体ポリペプチドを製造するために使用する宿主細胞は種々の培地中で培養してよい。市販の培地、例えばHamのF10（Sigma）、最小必須培地（MEM）（Sigma）、RPMI-1640（Sigma）、及びダルベッコの変性イーグル培地（DMEM）（Sigma）が宿主細胞の培養のために適している。更に、Ham等、Meth. Enz., 58:44（1979）、Barnes等、Anal. Biochem., 102:255（1980）、米国特許4,767,704；4,657,866；4,927,762；4,560,655又は5,122,469；WO90/03430；WO87/00195；米国特許Re. 30,985に記載されている培地の何れかを宿主細胞の培地として使用してよい。これらの培地の何れもホルモン及び／又は成長因子（例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子）、塩（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩）、緩衝剤（例えばHEPES）、ヌクレオチド（例えばアデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えばGENTAMYCIN（商標）薬）、微量元素（マイクロモルの範囲における終濃度で通常存在する無機化合物として定義される）、及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補給してよい。何れかの他の必要な補給物も、当該分野で知られた適切な濃度において包含

させてよい。培養条件、例えば温度、pH等は発現のために選択された宿主細胞で以前に使用されたものであり、そして当業者の知る通りである。

5. 遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子増幅及び／又は発現は直接試料中で、例えばmRNAの転写を定量するための従来のサザンブロッティング、ノーザンブロッティング [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)]、又はインサイチュハイブリダイゼーションにより、本明細書において提供された配列に基づいて適切に標識されたプローブを用いながら計測してよい。或いは特定のデュプレックス、例えばDNAデュプレックス、RNAデュプレックス、及びDNA-RNAハイブリッドデュプレックス又はDNA-蛋白質デュプレックスを認識できる抗体を使用してよい。次に抗体を標識してよく、そして、表面上のデュプレックスの形成時にデュプレックスに結合した抗体の存在が検出できるようにデュプレックスを表面に結合させる試験を実施してよい。

【0221】

或いは、遺伝子発現を免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養アッセイにより計測することにより、遺伝子産物の発現を直接定量してよい。試料流体の免疫組織学的染色及び／又はアッセイのために有用な抗体はモノクローナル又はポリクローナルのいずれかであってよく、そして何れかの哺乳動物において製造してよい。好都合には、抗体は本明細書にて識別したFrz、sFRP又はRor配列に対して、又は本明細書にて提供したDNA配列に基づいた合成ペプチドに対して、又はWnt拮抗体に融合され特定の抗体エピトープをコードしている外因性配列に対して作成してよい。

6. Wnt拮抗体の精製

Wnt拮抗体ポリペプチドの形態は培地から、又は宿主細胞溶解物から回収してよい。膜結合の場合は、それは適当な洗剤溶液（例えばTriton-X100）を用いるか、又は酵素的分解により、膜から放出され得る。Wnt拮抗体ポリペプチドの発現において使用される細胞は種々の物理的又は化学的な手段、例えば凍結-解凍のサイクリング、超音波処理、機械的崩壊、又は細胞溶解剤により崩壊することができる。

【0222】

組み換え細胞蛋白質又はポリペプチドからWnt拮抗体ポリペプチドを精製することが必要な場合がある。以下の手順は適当な精製手順の例であり、例えばイオン交換カラム上の分画；エタノール沈澱；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAE上のクロマトグラフィ；等電点クロマトグラフィ；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈澱；例えばセファデックスG-75を用いたゲル濾過；IgGなどの夾雑物を除去するためのプロテインAセファロースカラム；及びWnt拮抗体のエピトープタグ化形態に結合するための金属キレートカラムが挙げられる。蛋白質精製の種々の方法を使用してよく、そしてそのような方法は当該分野で知られており、そして例えばDeutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990) Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載されている。選択される使用工程は、例えば、使用される生成課程の特性、及び生成される具体的なWnt拮抗体ポリペプチドに依る。

【0223】

組み換え手法を使用する場合、Wnt拮抗体ポリペプチドは細胞内で、ペリプラズム空間において生成することができ、或いは培地中に直接分泌させることができる。Wnt拮抗体ポリペプチドを細胞内で生成させる場合、第1工程として、何れかの粒状破碎物、即ち宿主細胞又は溶解フラグメントを例えば遠心分離又は超音波処理により除去する。Carter等、Bio/Technology 10: 163-167 (1992)は大腸菌のペリプラズム空間内に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。概すれば、細胞ペーストを約30分間酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA及びフェニルメチルスルホニルフロリド (PMSF) の存在下に解凍する。細胞破碎物は遠心分離により除

去できる。Wnt拮抗体ポリペプチドを培地中に分泌させる場合は、そのような発現系由来の上澄みは一般的に先ず市販の蛋白質濃縮フィルタ、例えばAmicon又はMillipore Pellicon限外濾過装置を用いて濃縮する。プロテアーゼ阻害剤、例えばPMSFを前の工程の何れかに含むことにより蛋白質分解を阻害してよく、そして抗生物質を含むことにより有害な夾雑物の成長を抑制してよい。

【0224】

細胞から製造したWnt拮抗体ポリペプチド組成物は例えばヒドロキシル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してよく、アフィニティクロマトグラフィが好ましい精製手法である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適性は抗体中に存在する何れかの免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依る。プロテインAはヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製するために使用できる(Lindmark等、J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983))。プロテインGは全てのマウスアイソタイプに対して、そしてヒト $\gamma 3$ に対して推奨されている(Guss等、EMBOJ. 5:15671575(1986))。アフィニティリガンドが結合するマトリクスは最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリクスも使用できる。力学的に安定なマトリクス、例えば制御された細孔ガラス又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンはアガロースで達成できるよりも速い流速及び短いプロセッシング時間を可能にする。Wnt拮抗体ポリペプチドが C_H3 ドメインを含む場合は、BakerbondABX(商標)樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)が精製に有用である。蛋白質精製のための他の手法、例えばイオン交換カラム上の分画、エタノール沈澱、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィ、ヘパリンSWPHAROSE(商標)上のクロマトグラフィ、アニオン又はカチオン交換樹脂(例えばポリアスパラギン酸カラム)上のクロマトグラフィ、等電点クロマトグラフィ、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈澱も回収すべき抗体に応じて使用される。

【0225】

何れかの予備的な精製工程の後、目的の抗体及び夾雑物を含む混合物を、好ましくは低塩濃度(例えば約0~0.25M塩)において実施される約2.5~2.4のpHの溶離緩衝剤を用いた低pH疎水性相互作用クロマトグラフィに付してよい。

C. 医薬品製剤

本明細書の1つの態様はWnt拮抗体及び少なくとも1つの製薬上許容しうる担体又は賦形剤を含む組成物を使用可能とする。本発明に従って使用するWnt拮抗体の治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水溶液の形態において、任意の製薬上許容しうる担体、賦形剤、又は安定化剤(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版、A. Gennaro編(2000))に所望の純度を有するWnt拮抗体を混合することにより、保存用として製造される。「製薬上許容しうる担体」は医薬品投与に適合する種々多様な溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌及び抗カビ剤、等張性吸収遅延剤などを包含する。適当な担体又は希釈剤の追加的な例は、水、食塩水、Finger溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンを包含するがこれらに限定されない。リボソーム及び非水性のビヒクル、例えば固定油を使用してもよい。従来の培地又は物質が活性化合物と不適合である場合を除き、これらの組成物の使用が意図される。補助的な活性化合物を組成物に配合することもできる。

【0226】

許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は使用される用量および濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、そして緩衝剤、例えば酢酸塩、トリス、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機性の酸；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸及びメチオニン；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール

；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；蛋白質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン、親水性重合体、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン；単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース又はデキストリン；キレート形成剤、例えばEDTA；等張剤、例えばトレハロース及び塩化ナトリウム；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール；界面活性剤、例えばポリソルベート；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属複合体（例えばZn-蛋白質複合体）；及び／又はノニオン系界面活性剤、例えばTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）、又はポリエチレングリコール（PEG）を包含する。抗体は好ましくは抗体を5～200mg/ml、好ましくは10～100mg/mlの濃度で含む。

10

【0227】

製剤は本明細書においては治療すべき特定の適応症のために必要に応じて1種より多い活性化化合物、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない補完的な活性を有するものを含有してよい。例えば特定のWnt拮抗体に加えて、1つの製剤中には、例えばWnt蛋白質上の異なるエピトープをまったく異なるWnt蛋白質に結合させる追加的な抗体、又はWnt媒介障害の拡大に影響する成長因子などの何らかの他の標的に対する抗体を包含させることが望ましい場合がある。代替的に、又は追加的に、組成物は更に化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及び／又は心臓保護剤を含んでよい。そのような分子は意図される目的のために有効である量で適宜組み合わせ存在させる。

20

【0228】

活性成分は、例えばコアセルベーション法によるか、又は界面重合により製造されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル、及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達システム（例えばリポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又は、マクロエマルジョン中に捕獲してよい。そのような手法はRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版、A. Gennaro編（2000）に記載されている。

【0229】

インビボ投与のために使用される製剤は滅菌されている必要がある。これは滅菌濾過膜を介する濾過により容易に達成される。

30

【0230】

本明細書における治療用組成物は概して、滅菌された取り出し口を有する容器、例えば皮下注射針で穿刺可能な栓を有する静脈内投与溶液用のバッグ又はバイアル内に充填される。

【0231】

投与経路は既知方法に従い、例えば静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、又は患部内経路による注射又は注入、局所投与、又は除放性システムによるものが挙げられる。

【0232】

本発明の医薬組成物の用量及び所望の薬品濃度は、想定される特定の用途に応じて変動し得る。適切な用量又は投与経路の決定は医師のよく知る通りである。動物実験はヒトの治療のための有効用量の決定のための信頼性の高い指針を与える。有効用量の種間での尺度調節はMordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", Toxicokinetics and New Drug Development, Yakobi等編、Pergamon Press, New York 1989, p. 42-96に記載される原則に従って行うことができる。

40

【0233】

本発明の物質又は分子のインビボ投与を行う場合は、通常の用量は投与経路に応じて、

50

一日当たり約 $10 \text{ ng/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ 哺乳動物体重又はそれより高値、好ましくは約 $1 \mu\text{g/kg/日} \sim 10 \text{ mg/kg/日}$ に変動してよい。特定の用量及び送達方法に関する指針は文献に記載されており、例えば米国特許 4, 657, 760; 5, 206; 344; 又は 5, 225, 212 を参照できる。異なる製剤は異なる治療化合物及び異なる障害に対して有効であることが期待され、ある臓器又は組織を標的化する投与は、別の臓器又は組織に対するものとは異なる様式での送達を必要とする場合がある。

【0234】

物質又は分子の除放射性投与が物質又は分子の投与を必要とする何れかの疾患又は障害の治療のために適している放出特性を有する製剤において望まれる場合は、物質又は分子のマイクロカプセル化が意図される。除放射性調製品の適当な例は抗体を含有する固体疎水性重合体の半透過性マトリクスを包含し、このマトリクスは形状付与された物品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。除放射性のための組み換え蛋白質のマイクロカプセル化はヒト成長ホルモン (rhGH)、インターフェロン- α 、 γ (rhIFN- α 、 $-\gamma$)、インターロイキン-2、及び MNRgp120 を用いて良好に実施されている。Johnson 等、Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora 等、Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere System", Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman 編 (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO97/03692、WO96/40072、WO96/07399; 及び米国特許 5, 654, 010。

【0235】

これらの蛋白質の除放射性製剤は、生体適合性及び広範な生体分解性を有することから乳酸グリコール酸共 (PLGA) 重合体を用いて開発してよい。PLGA の分解生成物である乳酸及びグリコール酸はヒト体内で急速なクリアランスに付されることができる。更に、この重合体の分解性はその分子量及び組成に応じて数カ月から数年に調節できる。Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", M. Chasin and R. Langer (編)、Biodegradable Polymers as Drug Delivery System (Marcel Dekker, New York, 1990), pp. 1-41。

【0236】

除放射性マトリクスの別の例はポリエステル、ヒドロゲル (例えばポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ (ビニルアルコール))、ポリラクチド (米国特許 3, 773, 919)、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタメートとの共重合体、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えば LUPRONDEPOT (登録商標) (乳酸グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドよりなる注射可能な微小球)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を包含する。

D. Wnt 媒介障害の治療方法

本発明は治療有効量の Wnt 拮抗体を哺乳動物に投与することを含む、Wnt 媒介障害を、それに罹患した哺乳動物において治療する方法を使用可能とする。1つの実施形態において、障害は Wnt シグナル伝達の活性の異常な、例えば増大した発現に関連する細胞増殖性障害である。別の実施形態において、障害は、Wnt 蛋白質の増大した発現に起因する。更に別の実施形態においては、細胞増殖性障害は、癌、例えば結腸直腸癌、乳癌、HSC に関連する種々の障害に関連する癌、例えば白血病及び種々の他の血液関連癌、及びニューロン増殖性障害に関連する癌、例えば脳腫瘍、例えば神経膠腫、星状細胞腫、髄膜腫、神経鞘腫、下垂体腫瘍、未分化神経外胚葉性腫瘍 (PNET)、髄芽細胞腫、頭蓋

咽頭腫、及び松果体領域の腫瘍である。

【0237】

W n t 拮抗体の投与による細胞増殖性障害の治療は以下の事象の1つ以上において観察可能及び／又は計測可能な低減又はこれらの事象の不在、即ち：癌細胞の数の低減又は癌細胞の不在；腫瘍サイズの低減；軟組織及び骨への癌の拡張を包含する周辺臓器内への癌細胞の浸潤の阻害（即ちある程度まで緩徐化、及び好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（即ちある程度まで緩徐化、及び好ましくは停止）；腫瘍成長のある程度までの阻害；及び／又は特定の癌に関連する症状1つ以上のある程度までの緩解；低減した罹患率及び死亡率、及びクオリティオブライフ問題の改善をもたらす。W n t 拮抗体は、既存の癌細胞を成長抑制及び／又は殺傷する範囲で、細胞増殖抑制性及び／又は細胞毒性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、患者により実感されてもよい。

【0238】

障害の成功裏の治療及び改善を評価するための上記パラメータは医師の良く知る常套的な手順により容易に計測できる。癌療法のためには効能は例えば疾患の進行までの時間（T D P）を評価すること及び／又は応答速度（R R）を測定することにより計測することができる。転移は病期試験によるか、又は骨スキャン並びにカルシウムレベル及び骨への拡張を測定する他の酵素に関する試験により測定できる。C T スキャンも骨盤及びその領域のリンパ節への拡張を検討するために実施できる。既知方法による胸部X線及び肝酵素レベルの測定を用いてそれぞれ肺及び肝臓への転移を検討する。疾患をモニタリングするための他の常套的な方法は経直腸超音波測定（T R U S）及び経直腸針生検（T R N B）を包含する。

【0239】

特定の実施形態においては、W n t 拮抗体の投与は腫瘍負荷を低下させる（例えば癌のサイズ又は重症度を低減する）。更に別の特定の実施形態においては、W n t 拮抗体の投与は癌を殺傷する。

E．細胞におけるW n t シグナル伝達の阻害方法

本発明は有効量のW n t 拮抗体に細胞を接触させることを含む細胞におけるW n t シグナル伝達を阻害する方法を提供する。1つの実施形態において、細胞は哺乳動物、好ましくはヒト内に含有され、そして投与される量は治療有効量である。更に別の実施形態においては、W n t シグナル伝達の阻害は更に細胞の成長の阻害をもたらす。更なる実施形態においては、細胞は癌細胞である。

【0240】

細胞増殖の阻害は当該分野で知られた方法を用いて計測される。例えば、細胞増殖を計測するための好都合な試験はC e l l T i t e r G l o（商標）ルミネセント細胞生存性アッセイであり、これはP r o m e g a（M a d i s o n, W I）より販売されている。そのアッセイは代謝的に活性な細胞の指標である存在するA T Pの定量に基づいて培養物中の生存細胞の数を測定する。C r o u c h等（1993）J. I m m u n o l. M e t h. 160: 81-88、米国特許6602677を参照できる。アッセイは96及び384ウェルのフォーマットで実施してよく、これにより自動化された高スループットスクリーニング（H T S）に適合できる。C r e e等（1995）A n t i C a n c e r D r u g s 6: 398-404を参照できる。アッセイ手順では培養細胞に直接単一試薬（C e l l T i t e r G l o（登録商標）試薬）を添加する。これにより、細胞が溶解し、ルシフェラーゼ反応により生じたルミネセントシグナルが発生する。ルミネセントシグナルは存在するA T Pの量に比例しており、これは培養物中に存在する生存細胞の数に直接比例している。データはルミノメータ又はC C Dカメラ画像化装置により記録できる。ルミネセンス出力は相対光単位（R L U）として表示する。

F．W n t 標的遺伝子の発現を調節する方法

本発明は有効量のW n t 拮抗体を細胞に接触させることを含む、活性化された、又は過剰なW n t シグナル伝達を特徴とする細胞におけるW n t 標的遺伝子の発現を調節する方法を提供する。1つの実施形態において、W n t 標的遺伝子はW n t シグナル伝達の結果

として過剰発現され、そしてWnt拮抗体との接触の結果、Wnt標的遺伝子の発現を低減させる。別の実施形態においては、Wnt標的遺伝子はAxin2、APCDD1、Gad1、Sax1、c-myc、サイクリンD1、PPARデルタ、ガストリン、クラステリン、サバイピン、シクロオキシゲナーゼ、fra-1、オステオポンチン、uPAR、クラウジン-1、CD44、MMP-7/9/11/14/26、IGFBP-4、Met、BMP4、sox-9、ヒストンデアセチラーゼ2、VEGFよりなる群から選択される。更に別の実施形態においては、Wnt標的遺伝子はWntシグナル伝達の結果として過小発現され、そしてWnt拮抗体との接触の結果、Wnt標的遺伝子の発現を回復させる。更なる実施形態においては、Wnt標的遺伝子はレフティ1、レフティ2、sFRP1、Fzd5、fas抗原、カスパーゼ3、インテグリン β 7、アルファeインテグリン、hath1、脂肪酸結合蛋白質2、muc-2、クルッペル様因子-4、カーボニックアンヒドラーゼ-11、エフリンB1、EphB2R、EphB3R、muc-3、組織適合性2、Q領域遺伝子座、 β 2-マイクログロブリンよりなる群から選択される。

10

【0241】

標的遺伝子の発現は本明細書に記載する、そして後述する実施例に記載するものを包含する当該分野で知られた方法を用いながら測定される。

G. Wnt蛋白質の存在を検出する方法

本発明はWnt拮抗体に試料を接触させることを含む、試料中のWnt蛋白質の存在を検出する方法を提供し、Wnt拮抗体とWnt蛋白質との間の複合体の存在又は結合レベルはWnt蛋白質及び／又はWntシグナル伝達の存在を示す。1つの実施形態において、方法は更にWntシグナル伝達のレベルが異常であるかどうかを決定することを含む。この実施形態においては、試料中のWnt蛋白質の結合のレベルはWnt蛋白質発現及び／又はWntシグナル伝達が生理学的に正常であることが分かっている第2の試料中のレベルと比較される。生理学的に正常な試料よりも高値又は低値である第2の試料と比較した被疑試料中の結合のレベルは異常なWntシグナル伝達を示す。別の実施形態においては、Wntシグナル伝達の存在又は異常なWntシグナル伝達は癌などのWnt媒介障害の存在を示す。

20

H. Wnt経路及びそれに関連する障害

1. Wntシグナル伝達経路：

Wntシグナル伝達経路は種々のレベルの経路制御をおこなう多数の蛋白質の関与する非常に複雑なシグナル伝達過程である。経路のこの多重レベルの堅固な制御は細胞生物学におけるその重要性を示す。複雑な調節機序にも関わらず、経路の初期シグナルはFrizzled (Fz) 受容体へのWntの結合により生じる。有効なシグナルは更にLRP (LDL受容体関連蛋白質) クラス、特にLRP5及びLRP6の追加的な単回通過膜貫通分子の存在を必要とする。Wntは更にLRPと結合することによりFrizzledと三量体複合体を形成してよい。次にLRPの細胞質のテール部が別の下流成分であるAxinと相互作用する。ディスヘベルド (Dishevelled)、即ちFrizzledと直接相互作用する細胞質成分は、Axinと相互作用する場合もあり、これによりFrizzled、LRP、Dsh及びAxinのテトラプレックスの複合体が形成される。Axinとのこの相互作用はWntシグナル伝達経路の後の下流の活性に関わる「分解複合体」(後述) から β -カテニンを放出させる。

30

40

【0242】

細胞の外部においては、Wntシグナル伝達はWntに結合することができ、そのためそれをその受容体から隔離させることができる種々の蛋白質により阻害される。この群に属するものは、分泌Frizzled関連蛋白質 (sFRP、Jones等、Bioessays 2002; 24: 811-820) 及びWnt阻害剤因子-1 (WIF-1、Hsieh, J. C. 等、Nature 1999; 398: 431-436) である。ヒトにおいては、sFRPファミリーは5つのメンバー (例えばsFRP-1、sFRP-2、... sFRP-5) よりなり、各々がシステインリッチドメイン (CRD) を含有しており、これはFz受容体のCRDと30~50%の配列相同性を共有している。(Me

50

lkonyan, H. S. 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 13636-13641)。sFRPはFrz受容体と機能阻害複合体を形成し、そしてそのため天然の拮抗体であると考えられているが、生物学的に複雑であり、そして一部の場合においてはWnt活性をアゴナイズするように作用する場合さえある。(Uren, A. 等、J. Biol. Chem. 2000; 275: 4374-4382)。
【0243】

細胞外Wnt阻害剤の別のクラスはディッコフ(Dickkopf, Dkk)である。[Brott, B. K. 等、Mol. Cell. Biol. 2002; 22: 6100-6110; Fedi, P. 等、J. Biol. Chem. 1999; 274: 19465-19472]。Dkkファミリーの3つのメンバー(例えばDkk-1、Dkk-2及びDkk-4)はカノニカルな経路の必須成分である細胞表面受容体LRP-5及びLRP-6の活性化を介してWntシグナル伝達に拮抗することができる。[Mao, J. H. 等、Mol. Cell 2001; 7: 801-809; Pinson, K. I. 等、Nature 2000; 407: 535-538]。DkkはLRP5/6との三元複合体および1回通過膜貫通受容体Kremen1(Krm-1)又はKremen2(Krm-2)を形成する[Mao等、Gene 2003; 302: 179-183; Mao等、Nature 2002; 417: 664-667; Mao等、Nature 2001; 411: 321-325]。次にこの複合体がエンドサイトーシスを受け、これにより細胞表面からLRP5/6受容体が除去される。その結果DkkはカノニカルなWntシグナル伝達に選択的に拮抗するが、非カノニカルなシグナル伝達には影響しない。

【0244】

カノニカルなWntシグナル伝達活性化の特徴は蛋白質β-カテニンの上昇したレベルである。β-カテニンは構成的に生産され、そして単量体蛋白質のプールとして細胞質内に存在する[Papkoﬀ, J. 等、Mol. Cell. Biol. 1996; 16: 2128-2134]。β-カテニンの細胞質レベルを制御するための一次的機序はリクルートメント時の大型の多重蛋白質複合体(「分解複合体」)への直接の物理的分解を介する。この複合体の中央の足場はAxin、並びにβ-カテニンへの結合部位、腺腫様結腸ポリポーシス(APC)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β(GSK3β)、カゼインキナーゼIα(CKIα)及び蛋白質ホフターゼ2A(PP2A)により与えられる[Hinoi, T等、J. Biol. Chem. 2000; 275: 34399-34406; Ikeda等、Oncogene 2000; 19: 538-545; Yamamoto等、J. Biol. Chem. 1999; 274: 10681-10684; Kishida等、J. Biol. Chem. 1998; 273: 10823-10826; Ikeda等、EMBO J. 1998; 17: 1371-1384]。形成後、Axin及びAPC並びにPP2AのGSJ3β媒介ホスホリル化により複合体を安定化させる。次にGSJ3βがβ-カテニンをホスホリル化することによりそれをβ-トランスデュシンリピート含有蛋白質(β-TrCP)により認識可能とし、これによりそれをユビキシン化及びプロテオソーム分解に標的化することができる。[Aberle等、EMBO J. 1997; 16: 3739-804; Latres等、Oncogene 1999; 18: 849-54; Liu等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96: 6273-8]。

【0245】

Axin/APC/GSK3βとの複合体形成はβ-カテニンの分解のための一次的機序であるが、代替の分解経路にはSiah-1及びAPCのC末端との複合体形成により誘導されるユビキチン化が関与することが分かっている。[Matsuzawa等、Mol. Cell 2001; 7: 915-926; Liu等、Mol. Cell 2001; 7: 927-936]。転写因子としてのその役割に加えて、β-カテニンは更に細胞接着に関与している。[Nelson等、Science 2004; 303: 1483-1487; Ilyas等、J. Pathol. 1997; 182: 128-137]。β-カテニンはそれがE-カドヘリン及びα-カテニンとも複合体形成するアドヘレンス接合部

としても知られている細胞内接触の細胞表面部位において観察することができる。即ちEーカドヘリン発現の何れかの増大は β ーカテニンを細胞膜に指向させることになり、これにより細胞質内レベルを枯渇させ、それによりWntシグナル伝達を阻害することになる。更に、Eーカドヘリンーカテニン複合体の分解は遊離 β ーカテニンの細胞質内レベルを増大させることができ、これにより転写活性を刺激する。[Nelson等、上出]。即ち β ーカテニンを遊離させることによる細胞表面受容体cRON、表皮成長因子受容体(EGFR)及びc-ErbB2の活性化は、カノニカルなWntシグナル伝達を刺激することもできる。Wntシグナル伝達の作用を活性化又は促進することができる他のシグナル伝達経路が挙げられる。例えば、インテグリンシグナル伝達は β ーカテニンの核輸送をもたらし得る[Eger等、Oncogene 2004; 23: 2672-2680]が、インスリン様成長因子(IGF)を介したシグナル伝達は使用可能なGSK3 β を「吸い取る」ことによりWntシグナル伝達を活性化することができ、これにより「分解複合体」の形成を抑制する。

10

【0246】

カノニカルなシグナル伝達においては、初期工程はLRP5/6の存在下でのFrzへのWntの結合を含む。[Mao等、Mol. Cell 2001; 7: 801-909; Pinson等、Nature 2000; 407: 535-538]。この三量体複合体の形成は2つの下流の帰結事象を有している。第1のものはディスヘベルド(Dsh)の細胞表面へのリクルートメントおよびカゼインキナーゼI ϵ (CI ϵ)によるそのホスホリル化である。[Kishida等、J. Biol. Chem. 2001; 276: 33147-33155]。ホスホリル化されたDshはFrat1及びGSK3 β と複合体を形成することができ、次にこれがGSK3 β の活性を阻害することができる。第2に、Wnt/Frz/LRP5/6トリプレックスはAxinのLRP5/6媒介分解を促進する。これの正味の作用は β ーカテニンのホスホリル化を担っている分解複合体の脱安定化である。ホスホリル化不在下においては β ーカテニンはユビキチン化されず、このため分解を免れ、これにより細胞内レベル及び核への転座のための利用性が増大する。

20

【0247】

β ーカテニンが核に輸送される様相は完全に明確化されていないが、核輸送蛋白質APCとの相互作用[Rosin-Arbesfeld等、Nature 2000; 406: 1009-1012; Neufeld等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 12085-12090]並びにpygopus及びBcl9/leglessの関与が示唆されている。[Townslley等、Nature Cell Biol. 2004; 6: 626-633]。

30

【0248】

核内に入れば、 β ーカテニンはT細胞特異的転写因子/リンパ様エンハンサ結合因子-1(TCF/LEF)DNA結合蛋白質との結合のために転写リプレッサGrouchoを置き換える。 β ーカテニンによる置き換えの不在下ではTCF/LEF複合体はGrouchoと複合体形成し、Wntの「標的遺伝子」の発現を抑制する。Grouchoの阻害作用は更に、転写活性化に対向するDNAを生成すると考えられている種々のヒストンデアセチラーゼ(HDAC)との相互作用により媒介される。[Cavallio等、Nature 1998; 395: 604-8; Chen等、Genes Dev. 1999; 13: 2218-30]。TCF転写リプレッサ複合体から転写活性化複合体への変換では更にヒストンデアセチラーゼ、例えばCreb結合蛋白質(CBP)/p300並びに他の活性化因子、例えばBrg-1のリクルートメントが起こる。[Takamaru等、J. Cell Biol. 2000; 149: 249-54; Baker等、Cell 2002; 109: 47-60; Brantjes等、Biol. Chem. 2002; 383: 255-261; Roose等、Biochim. Biophys Acta-Rev. Cancer 1999; 1424: M23-M37]。 β ーカテニン-TCF複合体とクロマチンとの間の相互作用もLegless(Bcl9)及びPygopusにより媒介される場合がある。Kramps等、Cell 2002; 109: 47-60; T

40

50

hompson等、Nat. Cell Biol. 2002; 4: 367-73; Parker等、Development 2002; 129: 2565-76。

【0249】

「オフ」即ち不活性状態ならびに「オン」即ち活性状態の両方におけるカノニカルなWntシグナル伝達経路の略記による総括を図1に示す。

2. Wntシグナル伝達活性に関連する障害

Wntシグナル伝達経路の脱調節は種々のWntシグナル伝達経路成分をコードする遺伝子における体細胞突然変異により引き起こされる場合がある。例えば異常なWntシグナル伝達活性は、非小細胞肺癌（NSCLC）[You等、Oncogene 2004; 23: 6170-6174]、慢性リンパ性白血病（CLL）[Lu等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101: 3118-3123]、胃癌[Kim等、Exp. Oncol. 2003; 25: 211-215; Saitoh等、Int. J. Mol. Med. 2002; 9: 515-519]、頭部頸部扁平細胞癌（HNSCC）[Rhee等、Oncogene 2002; 21: 6598-6605]、結腸直腸癌[Holcombe等、J. Clin. Pathol-Mol. Pathol. 2002; 55: 220-226]、卵巣癌[Ricken等、Endocrinology 2002; 143: 2741-2749]、基底細胞癌（BCC）[LoMuzio等、Anticancer Res. 2002; 22: 565-576]及び乳癌におけるWntリガンド過剰発現に関連している。更に、sFRP及びWIF-1などの種々のWntリガンド調節分子の低減は乳癌[Klopocki等、Int. J. Oncol. 2004; 25: 641-649; Ugolini等、Oncogene 2001; 20: 5810-5817; Wissmann等、J. Pathol. 2003; 201: 204-212]、膀胱癌[Stoehr等、Lab Invest. 2004; 84: 465-478; Wissmann等、上出]、中皮腫[Lee等、Oncogene 2004; 23: 6672-6676]、結腸直腸癌[Suzuki等、Nature Genet 2004; 36: 417-422; Kim等、Mol. Cancer Ther. 2002; 1: 1355-1359; Cadwell等、Cancer Res. 2004; 64: 883-888]、前立腺癌[Wissman等、上出]、NSCLC[Mazieres等、Cancer Res. 2004; 64: 4717-4720]、及び肺癌[Wissman等、上出]に関連している。本発明のWnt拮抗抗体分子によりWntシグナル伝達を拮抗することは、これらの癌を治療処置すると期待される。

【0250】

Frz-LRP受容体複合体の種々の成分の過剰発現に起因する持続的な異常Wntシグナル伝達も、特定の癌に関連付けられている。例えばLRP5過剰発現は骨肉腫[Hoang等、Int. J. Cancer 2004; 109: 106-111]に関連付けられているのに対し、Frz過剰発現は前立腺[Wissmann等、上出]、HNSCC[Rhee等、Oncogene 2002; 21: 6598-6605]、結腸直腸[Holcombe等、上出]の癌、卵巣癌[Wissman等、上出]、食道[Tanaka等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95: 10164-10169]及び胃[Kirikoshi等、Int. J. Oncol. 2001; 19: 111-115]癌などの癌に関連付けられている。更に、ディスヘベルドなどのWntシグナル伝達経路の成分の過剰発現は前立腺癌[Wissman等、上出]、乳癌[Nagahata等、Cancer Sci. 2003; 94: 515-518]、中皮腫[Uematsu等、Cancer Res. 2003; 63: 4547-4551]及び子宮頸癌[Okino等、Oncol Rep. 2003; 10: 1219-1223]などの癌に関連付けられている。Frat-1の過剰発現は膵臓癌、食道癌、子宮頸癌、乳癌及び胃癌などの癌に関連付けられている。[Saitoh等、Int. J. Oncol. 2002; 20: 785-789; Saitoh等、Int. J. Oncol. 2001; 19: 311-315]。Axin機能損失（LOF）突然変異は肝細胞癌[Saitoh等、Nature Genet. 2000; 24: 245-250; Tanigu

chi等、Oncogene 2002; 21: 4863-4871] 及び髄芽細胞腫 [Dahmen等、Cancer Res. 2001; 61: 7039-7043; Yokota等、Int. J. Cancer 2002; 101: 198-201] に関連付けられている。本発明のWnt拮抗体とのWnt-Frz相互作用の遮断はFrz又はLRPの過剰発現に関連する癌を軽減すると期待される。

【0251】

最後に多数の癌がβ-カテニンにおける機能獲得突然変異又はAPCにおける機能喪失突然変異などの「分解複合体」の崩壊を介してβ-カテニンを活性化することに関連付けられている。β-カテニンの分解の低減は細胞内の機能的β-カテニンのより多い量をもたらす。例えばβ-カテニンをコードする遺伝子(即ちCTNNB1)における突然変異は胃癌 [Clements等、Cancer Res. 2002; 62: 3503-3506; Park等、Cancer Res. 1999; 59: 4257-4260]、結腸直腸癌 [Morin等、Science 1997; 275: 1787-1790; Ilyas等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 10330-10334]、腸カルチノイド [Fujimori等、Cancer Res. 2001; 61: 6656-6659]、卵巣癌 [Sunaga等、Genes Chrom. Cancer 2001; 30: 316-321]、肺腺癌 [Sunaga等、上出]、子宮内膜癌 [Fukuchi等、Cancer Res. 1998; 58: 3526-3528; Kobayashi等、Japan. J. Cancer Res. 1999; 90: 55-59; Mirabelli-Primdahl等、Cancer Res. 1999; 59: 3346-3351]、肝細胞癌 [Sato等、上出; Wong等、Cancer 2001; 92: 136-145]、胚芽細胞腫 [Koch等、Cancer Res. 1999; 59: 269-273]、髄芽細胞腫 [Koch等、Int. J. Cancer 2001; 93: 445-449]、膵臓癌 [Abraham等、Am. J. Pathol 2002; 160: 1361-1369]、甲状腺癌 [Garcia-Rostan等、Cancer Res. 1999; 59: 1811-1815; Garcia-Rostan等、Am. J. Pathol 2001; 158: 987-996]、前立腺癌 [Cheshire等、Prostate 2000; 45: 323-334; Voeller等、Cancer Res. 1998; 58: 2520-2523]、黒色腫 [Reifenberger等、Int. J. Cancer 2002; 100: 549-556]、毛質性上皮腫 [Chan等、Nature Genet. 1999; 21: 410-413]、ウイルス腫瘍 [Koesters等、J. Pathol 2003; 199: 68-76]、膵臓芽腫 [Abraham等、Am. J. Pathol 2001; 159: 1619-1627]、脂肪肉腫 [Sakamoto等、Arch. Pathol. Lab. Med. 2002; 126: 1071-1078]、若年性鼻咽頭血管線維腫 [Abraham等、Am. J. Pathol. 2001; 158: 1073-1078]、類腱腫 [Tejpar等、Oncogene 1999; 18: 6615-6620; Miyoshi等、Oncol. Res. 1998; 10: 591-594]、滑膜肉腫 [Saito等、J. Pathol 2000; 192: 342-350] などの癌に関連付けられている。機能損失突然変異は結腸直腸癌 [Fearon等、Cell 1990; 61: 759-767; Rowan等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 3352-3357]、黒色腫 [Reifenberger等、Int. J. Cancer 2002; 100: 549-556; Rubinfeld等、Science 1997; 275: 1790-1792]、髄芽細胞腫 [Koch等、Int. J. Cancer 2001; 93: 445-449; Huang等、Am. J. Pathol 2000; 156: 433-437] 及び類腱腫 [Tejpar等、Oncogene 1999; 18: 6615-6620; Alman等、Am. J. Pathol. 1997; 151: 329-334] などの癌に関連付けられている。β-カテニンの異常な活性に起因し、これによりWnt経路を活

性化させる癌は本発明のWnt拮抗体による治療に適している。

3. Wntシグナル伝達及び発癌

Wnt経路は多くの転写終点又は標的遺伝子を有する。これらの大多数は特定の型に対して特異的であり、それは発生シグナル伝達経路では通常である。これはシグナルではなく細胞が応答の性質を決定する細胞外シグナルによる遺伝子制御の基本的な機序と合致している。しかしながら、細胞型特異的遺伝子に加えて、Wntシグナル伝達は、より広汎に誘導される遺伝子、例えばWntシグナル伝達経路の成分及びWnt- β -カテニン-TCFカスケードにより活性化される可能性が最も高い遺伝子も制御する。

【0252】

正常な細胞の生理学から新生物性の変化を特徴とするものへの遷移は癌の発生に伏在する事象をより良く理解するための検討において旺盛に研究されている対象であった。即ち β -カテニンによる標的遺伝子の不適切な活性化は、標的遺伝子自身に体細胞突然変異がない場合であっても、生物において疾患状態をもたらす場合がある。Ilyasは「不適切な幹細胞表現型／無制限の複製能力」、「アポトーシスの回避」、「組織侵襲及び転移」、「成長シグナルの自己充足」、「成長阻害剤に対する非感受性」、「終末分化の失敗」、「免疫応答の回避」、及び「持続的血管形成」を包含する大部分の悪性疾患により獲得される表現型のHanahan and Weinbergリストの改良版を作成している。Ilyas, J. Pathol 2005; 205: 130-144; Hanahan and Weinberg, Cell 2000; 100: 57-70。 β -カテニンの標的遺伝子を包含するWntシグナル伝達により調節される遺伝子又はマイクロアレイ分析により示される改変された発現の分析は、直接又は標的遺伝子に対する作用を介した異常なWntシグナル伝達に起因する混乱がこれら全てを「新生物性表現型」と示することができることを示している。Ilyas, M., J. Pathol 2005; 205: 130-144。Wntシグナル伝達の例示される標的のリストを表1に示す。アップレギュレートされる遺伝子標的は太字で示し、ダウンレギュレートされるものは斜体で示す。活性化された及び／又は過剰なWntシグナル伝達の結果に起因するそのような標的遺伝子の異常な発現は本発明のWnt拮抗体の適用により改善され得る。

【0253】

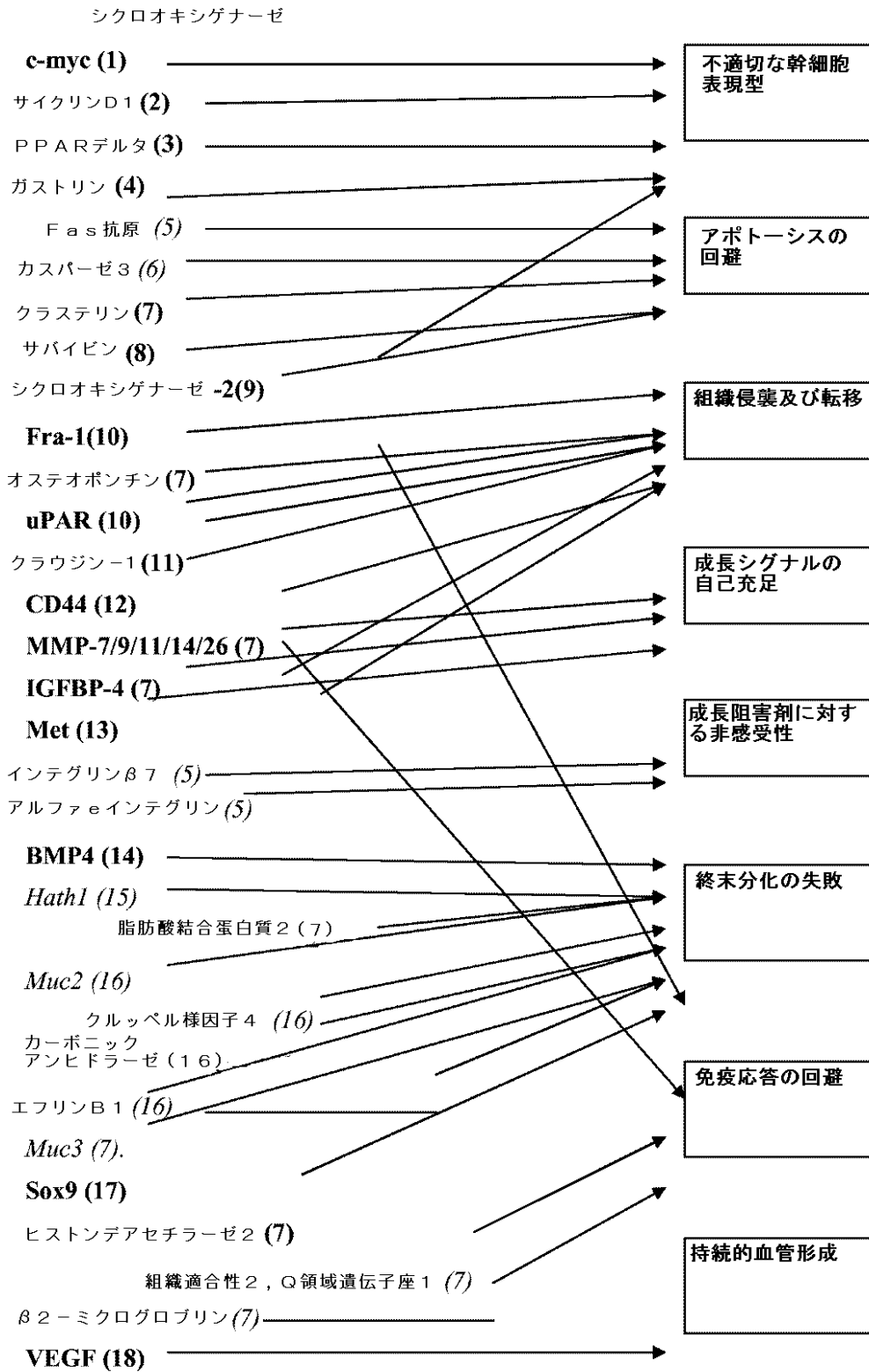
10

20

【表 1】

表 1

W n t 標的遺伝子及び表現型作用



癌はますます「幹細胞」疾患 (Taipale等、Nature 2001; 411: 349-54)、即ち幹細胞の不適切な活性化及び／又は維持として捉えられつつある。Wntシグナル伝達は幹細胞の維持のために必須であることがわかっている [He等、Nature Genet. 2004; 36: 1117-1121; Reya等、Nature

10

20

30

40

50

re 2003; 423: 409-414; Willert等、Nature 2003; 423: 448-452]。腸においては、TCF4は β -カテニンに関する主要な核結合因子であり、そしてTCF4ノックアウトマウスが小腸において幹細胞を発生することができないということは、幹細胞の維持におけるカノニカルなWntシグナル伝達の役割を裏付けている [Korinek等、Nat. Genet. 1998; 19: 379-83; Pinto等、Genes Dev. 2003; 17: 1709-13; Kuhnert等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101: 66-71]。

【0254】

多数の生物学的過程に対するWntシグナル伝達の作用はマトリクスメタロプロテナーゼ遺伝子(MMP)により説明されている。MMP7、MMP14及びMMP26は β -カテニンの標的を指向することが分かっている [Marchenko等、Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004; 36: 942-956; Takahashi等、Oncogene 2002; 21: 5861-5867; Brabletz等、Am. J. Pathol 1999; 155: 1033-1038] が、他のMMPは腸の腺腫により直接発現されることが観察されている [Paoni等、Physiol Genomics 2003; 15: 228-235]。MMPは間質コラーゲンを分解する蛋白質分解酵素であり、これにより腫瘍細胞は表現型「組織侵襲及び転移」を獲得できるようになる。酵素的活性は間質における潜伏性の成長因子の放出も可能にし、これは腫瘍細胞自体により分泌される他の成長因子と一緒に「成長シグナルの自己充足」に寄与する。 [Cousens等、Science 2002; 295: 2387-2392; Egeblad等、Nature Rev. Cancer 2002; 2: 161-174]。MMPはオステオポンチン(二次的なWnt誘導標的) [Paoni等、上出] に対しても作用してフラグメントを放出し、それは β -カテニンの直接の標的である血管内皮成長因子(VEGF)と一緒に「持続的血管形成」の特徴に寄与する。 [Zhang等、Cancer Res. 2001; 61: 6050-6054; Agnihotri等、J. Bio. Chem. 2001; 276: 28261-28267]。

【0255】

Wntシグナル伝達経路はリガンド受容体相互作用の下流のレベルにおいて活性化され得るが、細胞外リガンド-受容体相互作用成分の阻害は、Wntシグナル伝達を開始させる事象が下流で生じた場合であっても腫瘍形成性を低減するのに有効であることを示唆する強力な証拠がある。例えばIlyasは最近の研究において数種の結腸直腸癌細胞系におけるWntシグナルの阻害が低減された腫瘍形成性をもたらしたことを報告している。 [Ilyas上出]。更に、作動不能なFrizzled受容体(Frz7エクトドメイン)の癌細胞系(SK-CO-1)へのトランスフェクションは正常な β -カテニン表現型を回復させた。この細胞系はホモ接合APC^{-/-}突然変異により活性なWntシグナル伝達を有している。更に、そのような細胞はインビボで転移された場合に腫瘍形成を示していない。Vincan等、Differentiation 2005; 73: 142-153。このことは細胞外レベルにおけるWntシグナル伝達の抑制は下流の細胞内Wntシグナル伝達経路成分の活性化に起因するWntシグナル伝達をダウンレギュレートすることができることを明らかにしている。このことは更に、Wnt-Frz相互作用を阻害する本発明のWnt拮抗体などの阻害剤はWntシグナル伝達が活性化される特定の様式に関わらず、何れかのWnt媒介障害に対して治療上の利益を有することを示唆している。

4. 結腸癌における異常なWntシグナル伝達

Wntシグナル伝達成分APCの欠損は当初は遺伝性の癌症候群である家族性の腺腫様ポリープ(FAP)において手がかりであることが発見された。1つの欠損性のAPC対立遺伝子を受け継いでいるFAP患者は多数の結腸ポリープ、又は腺腫を、生涯の早期の年代において発症する。そのようなポリープは第2のAPC対立遺伝子が不活性化される上皮細胞のクローン性の派生物として発生する。これらのFAP腺腫の累積的な作用は最

終的には腺癌の発生をもたらす、これはK-ras、p53及びSmad4などの追加のオンコジーン又は腫瘍抑制遺伝子における突然変異の様々な程度の秩序を有する蓄積として顕在化する。更に、APCの損失は大部分の散发性の結腸直腸癌においても生じる。Kinzler等、Cell 187:159-170 (1996)。β-カテニンの安定化、そして最終的な核輸送、およびWntシグナル伝達をもたらすことによるAPCの突然変異性の不活性化は、従って、上皮細胞を形質転換する。興味深いことに、通常ではWntシグナル伝達時にのみ転写されるpTOPFLASHなどのコンカテマー化されたTCF結合部位を含有するレポータープラスミドはβ-カテニン/TCF-4転写複合体の構成的活性化を介してACP突然変異体癌細胞において不適切に転写される。APCが突然変異されない別の例の結腸直腸癌においては、足場蛋白質Axin-2が突然変異される[Liu等、Nature Genet. 26:146-147 (2000)]か、又はβ-カテニンがN末端Ser/Thr破壊モチーフが除去されるように突然変異される。[Morin等、Science 275:1787-1790 (1997)]。即ち、直腸結腸癌は、APCにおける欠失だけでなく、β-カテニン/TCF-4の転写活性化の適切でない持続と関係している。TCF-4突然変異はcrypt幹細胞及び先祖細胞における欠損性APC発現を介して観察される通り、結腸直腸癌において同じ標的遺伝子の活性化をもたらす(マイクロアレイ分析により示される)ことが更に報告されている。Van deWetering等、Cell 111:241-250 (2002)。一旦Wntカスケードが活性化されると、APC^{-/-}腺腫細胞はその先祖状態を無限に維持する。その結果、Wntシグナル伝達の活性化は結腸直腸癌の発癌において必要な前駆体であり、そして、Wntシグナル伝達の障害はこの障害の発症を処置及び/又は抑制するための有効な手段となり得る可能性が高くなる。

5. 造血幹細胞におけるWntシグナル伝達

造血幹細胞は多能性造血幹細胞(HSC)からの系列拘束先祖細胞の過程において循環系の成人血液細胞を生じさせる。更に、Wntシグナル伝達はHSCの自己更新及び維持に寄与し、そして機能不全のWntシグナル伝達はHSCに起因する種々の障害、例えば白血病及び種々の他の血液関連癌を担っていると考えられる。Reya等、Nature 434:843-850 (2005); Baba等、Immunity 23:599-609 (2005); Jamieson等、N. Engl. J. Med. 351(7):657-667 (2004)。幹細胞が拘束骨髓様先祖細胞に変換されるに従ってWntシグナル伝達は通常では低減される。Reya等、Nature 423:409-414 (2003)。

【0256】

Wntリガンド自身がHSCにより生産されるのみならず、Wntシグナル伝達は活性でもあり、オートクリン又はパラクリンの調節を示唆している。Rattis等、Curr. Opin. Hematol. 11:88-94 (2004); Reya等、Nature 423:409-414 (2003)。更に、β-カテニン及びWnt3aの両方ともネズミHSC及び先祖細胞の自己更新を促進するが、ヒト造血先祖細胞へのWnt5Aの適用はインビトロでの未分化先祖細胞の増殖を促進する。Reya等、上出; Willert等、Nature 423:448-452 (2003); Van Den Berg等、Blood 92:3189-3202 (1998)。

【0257】

HSCに加えて、胚性幹細胞、表皮幹細胞及び上皮幹細胞は未分化の増殖状態の維持に関してWntシグナル伝達に応答性又は依存性であることが分かっている。Willert等、上出; Korinek等、Nat. Genet. 19:379-383 (1998); Sato等、Nat. Med. 10:55-63 (2004); Gat等、Cell 95:605-614 (1998); Zhu等、Development 126:2285-2298 (1999)。従って、本発明のWnt拮抗体によるWntシグナル伝達の障害は機能不全の造血に起因する疾患、例えば白血病及び種々の血液関連の癌、例えば急性、慢性、リンパ様及び骨髓性の白血病、骨髓形成不全症候群及び骨髓増殖性障害の

治療における治療法となり得る。これらには骨髄腫、リンパ腫（例えばホジキン及び非ホジキン型）、慢性及び非進行性の貧血、進行性及び症候性の血球不全、真性赤血球増加症、本態性又は原発性の血小板血症、特発性骨髄線維症、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、成熟細胞性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症が包含される。

6. 白血病におけるWntシグナル伝達

Wntシグナル伝達経路の未調節活性化は白血病の発症の前駆状態である。Reya等、上出。Wntシグナル伝達に依存しているものとしての骨髄様及びリンパ様の系列の両方のオンコジーン成長を裏付ける実験証拠が存在している。Wntシグナル伝達は骨髄性白血病の慢性及び急性の形態の両方を調節する場合における関与が示唆されている。慢性骨髄性白血病患者由来の顆粒球-マクロファージ先祖細胞（GMP）及び治療に抵抗性の患者由来の急性転化細胞は活性化されたWntシグナル伝達を呈している。Jamieson等、上出。更に、Axinの異所性の発現を介した β -カテニンの阻害はインビトロにおいて白血病細胞の再プレーティング能力を低下させ、慢性骨髄性白血病前駆状態は成長及び更新に関するWntシグナル伝達に依存していることを示唆している。更に、Wnt過剰発現はGMPに長期自己更新の幹細胞様特性を獲得させている。Jamieson等、上出。これらの所見は更に、Wntシグナル伝達は血液系列の正常な発生のために必要であるが、ただし異常なWntシグナル伝達は先祖細胞の形質転換をもたらすという仮説を裏付けている。本発明のWnt拮抗体はこれらの型の白血病を治療する場合に有用であり得る。

10

20

【0258】

最近の研究は、リンパ様新生物もWntシグナル伝達により影響され得ることを示唆している。Wnt-16はE2A-PbX転座を担持しているB細胞白血病細胞系において過剰発現され、オートクリンWnt活性が発癌に寄与し得ることを示唆している。McWhirter, 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11464-11469 (1999)。正常なB細胞先祖細胞の成長及び生存におけるWntシグナル伝達の役割はこの見解を更に裏付けている。Reya等、Immunity 13:15-24 (2000); Ranheim等、Blood 105:2487-2494 (2005)。Wntに対するオートクリンの依存性は終末分化したB細胞の癌である多発性骨髄腫の増殖の調節に関して提案されている。Derksen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6122-6127 (2004)。原発骨髄腫及び骨髄腫細胞系はまた安定化を発現することも分かっている（即ち分解複合体とは独立している）。Wntシグナル伝達成分における如何なる突然変異も存在しなかったが、数種の成分、例えばWnt-5A及びWnt-10Bの過剰発現は、腫瘍の依存性及び癌の自己更新が必ずしもWntシグナル伝達経路成分中に生じる突然変異に依存しておらず、むしろ経路自体の構成的活性化のみに依存していることを示唆している。Reya等、上出。過剰発現されたWntに結合することを介して、本発明のWnt拮抗体はB細胞白血病の治療において有効な治療薬となり得る。

30

【0259】

自己更新性の多能性幹細胞の骨髄様先祖細胞への遷移はWntシグナル伝達のダウンレギュレーションを伴う。Reya等、Nature 423:409-414 (2003)。同様に、リンパ様先祖細胞における β -カテニンの安定な発現は、それらの細胞が何れかの細胞型に典型的に関連しているマーカーを欠いていたにもかかわらず、多数の分化選択肢を回復させている。Baba等、Immunity 23:599-609 (2005)。即ち、本発明のWnt拮抗体によるWntシグナル伝達の阻害は、白血病、例えば骨髄様及びリンパ様の白血病、例えば急性及び慢性の骨髄性白血病、並びに急性及び慢性のリンパ性白血病を治療する場合に有効な治療法となり得ることが強く示唆されている。

40

7. 神経障害における異常なWntシグナル伝達

β -カテニンを介したWntシグナル伝達の活性化は神経先祖細胞のサイクリング及び拡張を増大できること、そして、そのようなシグナル伝達の損失は先祖細胞コンパートメ

50

ントの損失をもたらすことが観察されている。Chenn等、Science 297: 365-369 (2002); Zechner等、Dev. Biol. 258: 406-418 (2003)。Wntシグナル伝達の正常な活性化はニューロン幹細胞の自己更新を促進する場合があるということのみから、異常なWnt経路活性化は神経系においては腫瘍形成性であると考えられる。この結論を裏付けている実験証拠は、小脳の小児脳腫瘍である髄芽細胞腫が β -カテニン及びAxinの両方において突然変異を含有しているといふ発見であり、これにより、髄芽細胞腫は未制御のWntシグナル伝達に応答して形質転換されることになる原始的先祖細胞から生じることを示唆している。Zurawel等、Cancer Res. 58: 896-899 (1998); Dahmen等、Cancer Res. 61: 7039-7043 (2001); Baeza等、Oncogene 22: 632-636 (2003)。即ち、本発明のWnt拮抗体によるWntシグナル伝達の阻害は種々のニューロン増殖性障害、例えば脳腫瘍、例えば神経膠腫、星状細胞腫、髄膜腫、神経鞘腫、下垂体腫瘍、未分化神経外胚葉性腫瘍(PNET)、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、松果体領域腫瘍、及び非癌性の神経線維腫症の治療において有効な治療法となり得ることが強く示唆されている。

8. 乳癌における異常なWntシグナル伝達

幹細胞が明確に単離されている乳腺組織においては、先祖細胞の運命又は維持におけるWntの制御的役割は、Wntトランスジェニックマウス発症乳腺腫瘍の研究により示唆されている。これらの腫瘍は幹細胞及び先祖細胞の特性を有する個々の細胞の出現頻度を増大させており、これは他のオンコジンを過剰発現するマウスに由来する腫瘍とは明確な対照をなしている。[Liu等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 4158-4163 (2004); Li等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 15853-15858 (2003)]。このことはWnt経路が形質転換に関して幹細胞及び先祖細胞を標的化するその能力において特有であることを示唆しており、そして正常な乳腺上皮の自己更新における重要な役割を示唆している。即ち本発明のWnt拮抗体によるWntシグナル伝達の阻害は乳癌の治療における有効な治療法となり得る。

【0260】

図32はヒト乳癌における活性なWntシグナル伝達の説明である。図32AはWong等、J. Pathol 196: 145 (2002)により最初に報告された正常(A-1)、低等級(A-2)及び高等級(A-3)のヒト乳腺腫瘍におけるWnt-1発現(インビトロハイブリダイゼーションにより示されたもの)を示している。図32Bは乳癌患者における β -カテニンの核(B-1)及び細胞質(B-2)の局在(IHCにより示されたもの)を示す。また、示した β -カテニン発現パターンに相関する患者の生存確率を示すKaplan-Meier生存プロット(B-3)を示す。このデータはLin等、P. N. A. S. (USA) 97(8): 4262-66 (2000)において最初に報告されている。図32Cはher-2陰性の浸潤性腺管癌を有する患者から単離した組織と比較した場合の癌を有さない患者に由来する正常な乳房におけるWnt-1の発現のマイクロアレイ分析である。

9. 加齢におけるWntシグナル伝達

Wntシグナル伝達経路は加齢及び加齢関連障害において重要な役割を果たすこともできる。

【0261】

Brack A S, 等、Science, 317(5839): 807-10 (2007)において報告されている通り、加齢マウス由来の筋幹細胞はそれらが増殖を開始する際に筋原性から腺維原性に変換されることが観察されている。この変換は加齢筋原性先祖細胞におけるカノニカルなWntシグナル伝達経路活性の増大を伴い、そしてWnt阻害剤により抑制され得る。更に、加齢マウス由来の血清の成分はFrizzled蛋白質に結合し、そして加齢細胞における上昇したWntシグナル伝達を説明することができる。Wnt3Aの幼弱再生筋肉への注射は結合組織の増殖を低減させ沈着を増大させている

。

【0262】

Wnt シグナル伝達経路は、更に、加齢が加速された Klotho マウスモデルを用いた試験において加齢過程に関与することが示されており、この場合、Klotho 蛋白質は Wnt 蛋白質と物理的に相互作用し、阻害していることが測定された。Liu H, et al, Science, 317 (5839): 803-6 (2007)。細胞培養モデルにおいては、Wnt-Klotho 相互作用は Wnt の生物学的活性の抑制をもたらしたのに対し、Klotho 欠損動物由来の組織及び臓器は増大した Wnt シグナル伝達の根拠を示している。

【0263】

従って、Wnt 拮抗剤は加齢の作用を低減するため、及び加齢関連疾患を治療するための治療薬として使用できる。

I. 特定の製剤の投与様式

1. 概論

医薬組成物は意図される投与経路、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（即ち局所）、経粘膜、及び直腸投与に適合するように製剤される。非経腸、皮内、又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は、滅菌希釈液、例えば注射用水、食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成の溶媒；抗細菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸又は重炭酸ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩、及び張力を調節するための物質、例えば塩化ナトリウム又はデキストロースを包含する。pH は酸又は塩基、例えば塩酸又は水酸化ナトリウムを用いて調節できる。非経腸製剤はガラス又はプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、又は多用量バイアル中に充填することができる。

2. 注射用製剤

注射に適する医薬組成物は滅菌された水溶液（水溶性の場合）又は分散体、及び滅菌された注射溶液又は分散体の用時製造のための滅菌粉末を包含する。静脈内投与のためには、適当な担体は生理食塩水、殺菌水、CREMOPHOREL (BASF, Parsippany, NJ) 又はリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) を包含する。全ての場合において、組成物は滅菌されている必要があり、そしてシリンジを用いて投与されるように流体性である必要がある。そのような組成物は製造及び保存の間安定である必要があり、そして細菌及びカビなどの微生物による汚染に対して保存される必要がある。担体は例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリコール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）及び適当な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であることができる。適切な流体性は例えばレシチンなどのコーティングの使用によるか、分散体の場合は必要な粒径を維持することによるか、そして界面活性剤を使用することにより維持することができる。種々の抗細菌剤及び抗カビ剤；例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルは微生物汚染に対応できる。等張剤、例えば糖類、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール及び塩化ナトリウムを組成物中に包含させることができる。吸収を遅延させることができる組成物はモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの物質を包含できる。

【0264】

滅菌注射用溶液は必要に応じて成分の一種又は組み合わせとともに適切な溶媒中に必要量で活性化化合物（例えば本発明の何れかの物質／分子）を組み込むことにより製造できる。一般的に、分散体は基本分散媒体及び他の必要な成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことにより製造する。滅菌された注射用溶液の製造のための滅菌粉末の場合、製造方法は、滅菌された溶液に由来する活性成分及び何れかの所望の成分を含有する粉末を与える真空乾燥及び凍結乾燥を包含する。

3. 全身投与

全身投与は経粘膜又は経皮であることもできる。経粘膜又は経皮投与のためには、標的

10

20

30

40

50

障壁を通過できる浸透剤を選択する。経粘膜浸透剤は洗剤、胆汁酸、及びフシジン酸誘導体を包含する。経鼻スプレー又は座薬は経粘膜投与のために使用できる。経皮投与のためには、活性化化合物は軟膏、膏薬、ゲル剤又はクリーム剤に製剤される。

【0265】

化合物は座薬（例えばカカオ脂又は他のグリセリドなどの基剤を使用）又は直腸送達のための貯留型浣腸の形態において製造することもできる。

4. 担体

1つの実施形態において、活性化化合物は身体からの急速な排除に対抗して化合物を保護する担体とともに製造され、例えば制御放出製剤、例えばインプラント及びマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。生体分解性又は生体適合性の重合体を使用することができ、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸が挙げられる。そのような物質はALZA Corporation (Mountain View, CA) 及びNOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA) から商業的に入手でき、或いは当該分野で知られる通り製造できる。リボソーム懸濁液も製薬上許容しうる担体として使用できる。これらはEppstein等及び米国特許4,522,811に記載のものなどの当該分野で知られた方法に従って製造できる。

5. 単位用量

単位剤型の経口製剤又は非経腸組成物を作成することにより投与及び用量均一性を促進することができる。単位剤型は必要な製薬用担体と組み合わせて治療有効量の活性化化合物を含有する、治療すべき対象に対する単回用量として適する物理的に個別の単位を指す。単位剤型の仕様は活性化化合物の特有の性質及び特定の所望の治療効果並びに活性化化合物の配合の固有の限界により決定され、そしてそれに直接依存している。

6. 遺伝子療法組成物

核酸分子はベクター内に挿入し、そして遺伝子療法ベクターとして使用できる。遺伝子療法ベクターは例えば静脈内注射、局所投与 (Nabel and Nabel, 米国特許5,328,470、1994) により、又は定位注射 (Chen等、Proc Natl Acad Sci USA, 91:3054-7 (1994)) により対象に送達できる。遺伝子療法ベクターの薬学的調製品は許容される希釈剤を包含することができ、又は遺伝子送達ビヒクルを包埋する緩徐放出マトリクスを含むことができる。或いは完全な遺伝子送達ベクターを組み換え細胞から未損傷で製造できる場合、例えばレトロウィルスベクターの場合は、薬学的調製品は遺伝子送達系を製造する1つ以上の細胞を包含できる。

7. 用量

医薬組成物及び方法は、Wnt拮抗体の投与において通常適用される他の治療活性化化合物を更に含んでよい。

【0266】

Wnt拮抗体の投与を必要とする状態の治療又は防止においては、適切な用量レベルは一般的に、一日当たりキログラム患者体重当たり約0.01~500mgであり、これは単回又は多数回用量として投与できる。好ましくは、用量は一日当たり約0.1~約250mg/kg; より好ましくは一日当たり約0.5~約100mg/kgである。適当な用量レベルは一日当たり約0.01~250mg/kg、一日当たり約0.05~100mg/kg、又は一日当たり約0.1~50mg/kgであってよい。この用量範囲において用量は一日当たり0.05~0.5、0.5~5、又は5~50mg/kgであってよい。経口投与のためには、組成物は好ましくは活性成分1.0~1000ミリグラム、特に治療すべき患者への投与の兆候的調節のためには活性成分1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0及び1000.0ミリグラムを含有する錠剤の形態で提供される。化合物は一日当たり1~4回、好ましくは一日当たり1回又は2回のレジメンで投与し

てよい。

【0267】

しかしながら何れかの特定の患者に対する特定の用量レベル及び投薬頻度は変動してよく、使用する特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性及び作用の長さ、年齢、体重、全体的な健康、性別、食餌、投与の様式及び時間、排出速度、薬剤の組み合わせ、特定の状態の重症度、及び治療を受けている宿主を包含する種々の因子に依る。

8. 組成物用キット

組成物（例えば医薬組成物）はキット、容器、パック又はディスペンサに、投与に関する説明書とともに包含することができる。キットとして供給する場合、組成物の異なる成分は別個の容器にパッケージし、そして使用直前に添加混合してよい。そのような成分のパッケージングは個々に活性化合物の機能を損失することなく長期の保存を可能にする。

【0268】

キットは特定の試験、例えば診断試験又は組織タイピングの実施を促進する別個の容器に試薬を包含してよい。

(a) 容器又はベッセル

キットに包含される試薬は、種々の異なる成分の生命が保存され、容器の材料により吸着又は改変されることがないような何れかの種類の容器に供給することができる。例えば密封ガラスアンプルは中性の非反応性気体、例えば窒素下でパッケージされている凍結乾燥されたモジュレータ物質／分子及び／又は緩衝剤を含有してよい。アンプルは何れかの適当な材料、例えばガラス、有機重合体、例えばポリカーボネート、ポリスチレンなど、セラミック、金属又は試薬を保持するために典型的に使用される他の材料よりなっていてよい。適当な容器の他の例はアンプルと同様の物質から作製されてよい簡素なビン、及びアルミニウム又は合金などのホイルで裏打ちされた内部よりなっていてよいエンベロープを包含する。他の容器は試験管、バイアル、フラスコ、ビン、シリンジ等を包含する。容器は滅菌されたアクセスポートを有してよく、例えば皮下注射針で穿刺することができる栓を有するビンが挙げられる。他の容器は除去時に成分の混合を許容する容易に除去可能な膜により分離された2つのコンパートメントを有してよい。除去可能な膜はガラス、プラスチック、ゴム等であってよい。

(b) 説明書

キットは又説明書とともに供給してよい。説明は紙又は他の基体に印刷してよく、及び／又は電子的に読み取り可能な媒体、例えばフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、ZIPディスク、ビデオテープ、レーザーディスク、オーディオテープなどとして供給してよい。詳細な説明はキットに物理的に備わっていなくてもよく；代わりに、ユーザーはキットの製造元又は販売元により特定されるインターネットのウェブサイトが指定されてよく、又は電子メールで供給されてよい。

9. 併用療法

特定の実施形態においては、Wnt拮抗剤を含む医薬品製剤は少なくとも1つの追加的な治療薬及び／又はアジュバントと組み合わせて投与してよい。特定の実施形態においては、追加的な治療薬は化学療法剤、成長阻害剤、又は細胞毒性剤、例えば毒素、例えばマイタンシノイド、カリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核分解酵素などである。

【0269】

上記したこのような併用療法は併用投与（二種以上の治療薬が同じ又は別個の製剤中に包含される場合）及び個別投与を包含し、その場合、Wnt拮抗剤の投与は追加的な治療薬及び／又はアジュバントの投与の前、同時、及び／又は後に行うことができる。Wnt拮抗剤は放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

10. 医薬

本発明はWnt媒介障害を治療するために有用な医薬の製造における使用のためのWnt拮抗剤を提供する。特定の態様において、Wnt媒介障害は癌である。

【0270】

以下の実施例は本発明の好ましい実施形態を説明するために記載する。当業者の知る通

り、以下の実施例に開示した手法は本発明の実施において良好に機能することを本発明者等が見出した手法の代表であり、従ってその実施のための好ましい様式を構成するとみなすことができる。しかしながら、開示された特定の実施形態において多くの変更が可能であり、そしてなお本発明の精神及び範囲から逸脱することなく類似又は同様の結果が得られることは当業者であれば本開示を鑑みれば当然のことである。明細書全体を通じて引用した全ての参考文献は参照により全体が本明細書に明確に組み込まれる。

【実施例】

【0271】

(実施例1)

一般プロトコル

哺乳動物細胞培養

ヒト腎上皮 (HEK) 293細胞 (ATCC # CRL-1573)、ヒト卵巣PA1細胞 (ATCC # CRL-1572) を50/50のDulbecco変性イーグル高グルコース培地、10%ウシ胎児血清添加Ham's F12中で成長させた。ヒト奇形腫誘導NTer2 (ATCC # CRL-1973) 及びTera2 (ATCC # HTB-106) 細胞を15%ウシ胎児血清添加McCoy培地中で維持し、そしてNCCIT細胞 (ATCC # CRL-2073) を10%ウシ胎児血清添加RPMI中で維持した。全ての細胞系に更に2mMグルタミン及び1%ペニシリンーストレプトマイシンを37℃5%CO₂において補給した。

トランスフェクション及びルシフェラーゼアッセイ

トランスフェクションのための準備において、トランスフェクション前24時間、(1) 500,000 HEK293及び(2) 100,000 PA1細胞 (ATCC # CRL-1572)、NCCIT、NTera2又はTera2細胞を12ウェルディッシュ (Nuc) の各ウェル中に投入した。細胞を、0.375 µg TOPglow (Upstate, Cat # 21-204)、0.05mg LEF1、0.01mg SV40RL+ Eugene (Roche) でトランスフェクトし、24時間後にトランスフェクトした。培地を交換し、細胞は未処理とするか、又はWnt3a単独、Wnt5a単独又は血清試料で更に20~24時間処理した後に採取した。全ての希釈は指定した細胞系に対し完全培地中において行った。細胞は50~100 µlの1×SJC溶解緩衝剤 (20mM Tris pH8.0、137mM NaCl、1mM EGTA、1% Triton X-100、10%グリセロール、1.5mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaF、1mM NaVO₄ 及びプロテアーゼ阻害剤) 中に採取し、そして2連の10 µlをDual-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイキット (Promega, Part # TM058) を用いてアッセイし、そしてEnvision Luminometer (Perkin Elmer) において検出した。ルシフェラーゼ活性はRenilla活性に対して規格化した。

【0272】

(実施例2)

Frz-Fcキメラ分子の構築

クローニング及び発現

Frz8 (173)-Fc及びFrz8 (156)-Fc

図4A及びBはFrz8 (156)-Fc及びFrz8 (173)-Fcキメラ構築物の配列を示す。図4Aはより長いFrz8 (173) 配列を示す。灰色で示すもの (即ち最初の24 N末端アミノ酸残基) はリーダーシグナル配列である。下線を付しているもの (即ち残基25~27) は成熟蛋白質において存在又は不在であってよいアラニン残基である。箱で囲んだ文字で示すもの (即ち残基157~173) はより短いFrz8 (Frz156) キメラ構築物からより長いFrz8 (Frz173) ものを区別するFrz8受容体の追加的配列である。太字で示されているもの (即ち残基174~182) はリンカー配列であり、斜体の配列 (即ち残基183~409) はFc領域である。図4Bはより短いFrz (156) 最小CRD (ECD) ドメイン配列を示す。灰色で示すもの (即

10

20

30

40

50

ち最初の24N末端アミノ酸残基)はリーダーシグナル配列である。下線を付したもの(即ち残基25~27)は成熟蛋白質において存在又は不在であってよいアラニン残基である。太字で示されているもの(即ち残基157~164)はリンカー配列であり、斜体の配列(即ち残基165~391)はFc領域である。

【0273】

Frz8(156)-Fc構築物は以下の通り構築した。Frizzled8残基1~156をコードするcDNAをpRK誘導プラスミドのEcoRI及びXhoI部位にサブクロニングした。ネイティブのヒトcDNAが好ましいが、同一の蛋白質配列をコードする代替配列(例えばネズミ)を使用してもよい。このクロニング手順においては、Frz8のカルボキシル末端をヒトIgGエフェクタドメイン(Fc)のアミノ末端に短いリンカー領域(例えば残基LESGGGGV T)(配列番号70)を介して融合することによりFrz8-Fc融合物を作成した。最終構築物はFrz8の156残基をコードしている。クロニングは標準的な分子生物学の手法を用いて実施した(Ausubel等(編), 2003, Current Protocols in Molecular Biology, 4 Vols., John Wiley & Sons)。蛋白質はチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中で発現させた。

【0274】

或いは前記したものとは異なる長さのFrz8の長さ(例えば1~173)をコードするcDNAを使用してもよい。更に、代替のリンカー配列(例えばESGGGGV T)(配列番号69)を使用してもよい。

Frz-Fc及びFrp-Fc構築物

Frz1、Frz2、Frz3、Frz4、Frz5、Frz6、Frz7、Frz9、Frz10、sFRP1、sFRP2、sFRP3、sFRP4、又はsFRP5を含むFrizzledドメイン成分を有するWnt拮抗剤のための構築物はFrz8に関して記載した手順と同様の様相で構築した。Frz2、Frz3、Frz4、Frz5及びsFRP3はXhoI及びAscIを用いてpRK誘導プラスミド中にサブクロニングした。Frz1、Frz6、Frz7、Frz9、Frz10、及びsFRP4はClaI及びXhoIを用いてpRK誘導プラスミド中にサブクロニングし、そしてsFrp1、sFrp2、及びsFrp5はClaI及びAscIを用いてpRK誘導プラスミド中にサブクロニングした。Frz8構築物の場合と同様、Frzドメインのカルボキシル末端をヒトIgGエフェクタドメイン(Fc)のアミノ末端に短いリンカー領域を介して融合することによりキメラWnt拮抗剤を作成した。図7(A、B及びC)はこれらの構築物に関する例示されるアミノ酸配列を示す。リーダーシグナル配列は太字で示し、斜体は非ネイティブのリーダー配列を示す。リンカーには下線を付し、Fc成分は斜体で示す。

【0275】

図5(A-H)(配列番号:115-129)はこれらのWnt拮抗剤構築物に関する例示される核酸配列を示す。

【0276】

インビボの活性又は安定性を最適化するため、又は他の有利な特性、例えば増大した可溶性、向上した結合特性を得るために、代替の構築物を製造することができる。これらの構築物は上記したWnt拮抗剤のリンカーとは異なるリンカーを包含してよい。例えば、Frz3-Fcキメラ蛋白質(配列番号114)の代替構築物はBstXI及びXhoIを用いてpRK誘導プラスミド内にFrz3ドメインをサブクロニングすること、及びFcドメインにFrz3ドメインを融合させるためにLESGGGGV T(配列番号70)ペプチドリリンカーを用いることにより作成されている。

蛋白質単離

Wnt拮抗剤キメラ蛋白質はPROSEP(登録商標)(Millipore)プロテインAコンジュゲート樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより>90%純度まで単離した。より高次の凝集物はSuperdex200(登録商標)(GE-Healthcare)

t h c a r e) ゲル濾過カラム上を通過させることにより二量体から分離した。蛋白質の実体及びシグナル配列を除去するためのアミノ末端のプロセッシングはエドマン分解により確認した。最終蛋白質の純度は98%より高値であると推定される(図10)。精製後の物質の内毒素レベルは完全であり、1.0 EU/mg未満であった。

【0277】

(実施例3)

Frz8-Fcキメラ分子の血清安定性

Frz8(173)-Fcキメラ構築物の血清安定性の初期の試験は構築物が限定されたインビボ半減期を有することを示した。インビボの不安定性はFrizzled受容体成分のECDメイン(ECD)におけるプロテアーゼ切断部位の存在に起因すると考えられた。実施例2に記載したFrz8(156)-Fc構築物はFrz8(173)-Fcを超えた上昇した血清安定性を示した。無胸腺ヌードマウスにFrz8(173)-Fc又はFrz8(156)-Fcの何れかの10mg/kgを静脈内注射した。血清を特定の時点において収集し、総蛋白質及び活性蛋白質に関して分析した。図11Aは1μLの血清中に存在する蛋白質を検出するために使用したヒトFcに関するイムノブロットを示し、そして各々の精製された蛋白質25μgの場合と比較した(P)。Frz8(156)-Fcは投与後72時間の血清中に検出可能であったのに対し、Frz8(173)-Fcは30分超過後には検出されなかった。

【0278】

収集した血清中のFrz8(156)-Fc及びFrz8(173)-Fcの活性はHEK293細胞におけるWnt3a依存性TOPglowレポーター活性の阻害を計測することにより試験した。相当するインビトロ力価は2.5μg/mlにおける精製されたFrz8(156)-Fc及びFrz8(173)-Fcでの処置において観察されたが、蛋白質投与後30分に収集されたFrz8(173)-Fc処置マウスの血清からは僅か部分的な阻害活性のみが回収された。対照的に、より強力な阻害活性が投与後24時間までFrz8(156)-Fc処置マウスの血清からは回収することができ、少なくとも72時間検出可能な阻害レベルであった(図11B)。これらの試験はFrz8(156)分子がFrz8(173)に基づいた分子よりもインビボでより安定であることを示している。

【0279】

更に、Frz8(173)-Fcは準最適な効能を有しており、そして開始腫瘍体積の収縮とは相反して腫瘍体積の増大速度を低減するのみの作用を示している。この準最適な効能はFrz8(173)-Fc分子を包含する種々のWntシグナル伝達成分-Fcキメラ拮抗体での処置に起因する経時的な腫瘍体積のグラフを示す図12に示す通りである。このアッセイにおいては、MMTV-WNT-1腫瘍は無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪パッド内に移植し、そして薬剤をX軸上に矢印で示す時点においてIV投与した。

【0280】

(実施例4)

Frz8(156)-Fcのインビボ薬物動態

Frz8(156)-Fcのインビボ薬物動態は、ヌードマウスに1, 5, 又は20mg/kg iv又は20mg/kg ipにおいてこの蛋白質の単回用量を投与することにより試験した。図13に示す通り、そして以下に記載する本実施例において更に考察する通り、Frz8-Fc試薬は全ての用量でヌードマウスにおいて二相性の排出を示した。単回IV又はIP用量の後、Frz8-Fcは(1)曝露での用量比例増大；(2)IP投薬後の迅速な吸収；(3)約25~30ml/日のクリアランス；及び(4)約4日間の半減期を示している。生体利用性係数、 $AUC_{IP}/AUC_{IV} = 92\%$ 。

動物プロトコル

雌性無胸腺ヌードマウスを投与する薬剤の性質及び投与様式に基づいて、12匹4群に分割する。群1：Frz8-Fc 1mg/kg、静脈内(IV)；群2：Frz8-Fc 5mg/kg、IV；群3：Frz8-Fc 20mg/kg、IV；及び群4：Frz8

—F c 20 mg / k g、腹腔内 (I P)。各動物には群の表記に従ってF r z 8 —F c の I V又はI Pボーラス用量を投与した。投与した用量体積 (5 ~ 10 mL / k g) は投薬溶液の濃度及び各動物の体重に応じて変動する。I V投薬は尾部静脈を介して投与する。

【0281】

以下の手順に従って各動物から血液約125 μ Lを収集する。血清はE L I S Aアッセイまで-70 $^{\circ}$ Cにおいて保存する。試料はn = 3動物 / 時点となるように採取する。投与前試料収集及び / 又はブランクマウス血清収集のために余剰動物を使用する。採血は交互に眼を使用しながら各動物につき最初の二時点において眼窩後方出血により行う。最終時点では、血液は心臓穿刺により収集し、そして約1 mLを2つの試験管に分取する。一方の試料はF r z 8 —F c濃度の測定のために使用し、他方は研究用に保存する。各動物には各採血時点の後に液体交換として10 mLの食塩水をI Pボーラス投与する。眼窩後方出血はイソフロラン麻酔下を実施し、終末出血はケタミン / キシラジンカクテル下に行う。動物は最終血液採取後に麻酔下に頸部切断により安楽死させる。

結果

図13Aは20又は5 mg / k g I V又は20 mg / k g I Pの両方に起因する7日以降の血清中の検出を示すF r z 8 —F cで処置したマウス由来の未希釈血清のイムノブロットである。試料は4、7、10又は14日に個々のマウスから採取した。対照用に、未処置マウスからも血清試料を採取し、F r z 8 —F c蛋白質を20 μ g / mLまで添加し、試料を37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、そして次にS D S ローディング緩衝剤 (2 h と表示) で処理し ; 未処置マウス由来の未希釈血清も陰性対照として同様に泳動させた (S と表記) 。

【0282】

図13B及び13Cは薬物動態試験から求めた場合のF r z 8 —F c血清レベルのグラフ総括である。特定期間の時間は16日間 (図13B) 及び2日間 (図13C) に渡る評価を包含する。F r z 8 —F cは全用量でヌードマウスにおける二相性の排出投与を呈していた。曲線は予測された濃度を示し、個々のデータポイントはE L I S Aで調べた個々のマウスに由来するF r z 8 —F c蛋白質の平均の血清レベルを示す。13DはF r z 8 —F cの薬物動態の二相性モデルに関するパラメータの総括である。i p又はi v経路のいずれかにより20 mg / k gを投与した場合、蛋白質の相当する血清レベルが注射当日内で達成され、そして蛋白質は7日間まで血清中で検出可能であった。20 mg / k gでi p投与したのち、蛋白質は迅速に吸収され、T_{max}は約8時間、生体利用性 (AUC_{I P} / AUC_{I V}) は92%であった。蛋白質のクリアランスは約25 ~ 30 mL / d / k gであり半減期は約4日間であった。

【0283】

(実施例5)

F r z —F c分子の結合親和性

F r z 8 (156) ドメインへのF Cドメインの付加は二桁を超えてW n t 3 aに対する結合親和性の増大をもたらしている。図14は二量体F cドメインに連結された場合のW n t 3 aシグナル伝達を遮断するF r z 8 —E C Dの増強された能力を示す。図14AはF r z 8 (156) —F Cの2つの異なる調製品のW n t 3 a阻害アッセイのI C₅₀グラフである。図14Bは単離されたF r z 8 (156) C R D (E C D) の純度を確認するゲルである。図示しているのは、(a) 非還元F r z 8 E C D (レーン1) ; (b) 分子量マーカー (レーン2) ; 及び還元されたF r z 8 E C D (レーン3) である。このゲルは結合アッセイに使用されたF r z 8 E C Dが未損傷であり、そしてほぼ予測された分子量において泳動されていることを示している。

【0284】

(実施例6)

F r z —F cキメラの結合活性

E L I S A

W n t 拮抗体のP K評価のために、384ウェルのE L I S Aマイクロプレート (N u

nc Maxisorp, Rochester, NY) のウェルをウサギ抗ヒトFc (Jackson Immuno Research, Westgrove, PA) でPBS 中 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でコーティングした ($25\mu\text{g}/\text{ウェル}$)。4℃で一夜インキュベートした後、ウサギ抗ヒトFc 溶液を静かに移し、そしてプレートを遮断緩衝剤 (0.5% BSA 及び 10ppm プロクリン含有 PBS) $40\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で遮断した。穏やかに浸透しながら室温で60分間インキュベートした後、ウサギ抗ヒトFc コーティングプレートを洗浄緩衝液 (PBS 0.05% Tween 20 (登録商標) 及び 10ppm プロクリン) で3回洗浄した。Frizzled 標準物質 ($0.78\sim 100\text{ng}/\text{mL}$ の濃度範囲の連続希釈物) 及びアッセイ緩衝剤 (0.5% BSA、0.05% Tween 20 (登録商標) 及び 10ppm プロクリンを含む PBS) 中アッセイ範囲にまで希釈した試料を試験プレートに添加した ($25\mu\text{l}/\text{プレート}$)。穏やかに浸透しながら室温で120分間インキュベートした後、アッセイプレートを洗浄緩衝剤で6回洗浄した。残存する結合Frz-Fc はアッセイ希釈剤中に希釈した ($25\mu\text{l}/\text{ウェル}$) セイヨウワサビパーオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG-Fc (Jackson Immuno Research) を用いて検出した。適切な発色 (10~25分間) の後、酵素反応を1Mリン酸 ($25\mu\text{l}/\text{ウェル}$) で停止させた。アッセイプレートを450nmの波長で読み取り、レファレンス波長は630nmであった。試料濃度は4パラメータアルゴリズムを用いた標準曲線フィットに試料ODを比較することにより求めた。

BIAcore

図15はFrz8 (1-156)-FcキメラへのWnt3aの直接結合を示す。このキメラ蛋白質は一般的にChen, Y. 等、J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) に記載されている通り約1700応答単位においてBiocore (商標) (BIAcore, Inc. Piscataway, N. J.) CM5センサーチップにカップリングされているアミンである。概すればカルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore (商標) Inc.) を発売元の説明書に従って塩酸N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) 及びN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) で活性化した。1Mエタノールアミン注入を行うことにより未反応基を遮断した。次にWnt3aを推定濃度 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で注入し、そして時間の関数としての応答単位の変化により結合を評価した。Wnt3aはFrz8-Fcに結合することがわかった。図15に示す通り、Wnt3aとFrz8-Fcとの会合は対照蛋白質 (大腸菌発現非ネイティブWnt3a) を超えた1000応答単位の高度に有意な増大をもたらしている。

OCTET

WntリガンドWnt3a及びWnt5aと相互作用するWnt拮抗体の能力はOCTET (商標)-OKシステム (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA) を用いて計測した。このシステムはバイオセンサー表面で結合している蛋白質の計測を可能にする。アッセイでは先ず、0.5% CHAPS によるリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) 中で10分間抗ヒトIgGFc 特異的バイオセンサーと共にWnt拮抗体分子 ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) の1つをインキュベートした。未結合のWnt拮抗体はPBS 0.5% CHAPS 中1.5分間洗浄することにより除去した。次にWnt3a又はWnt5a ($5.0\mu\text{g}/\text{ml}$) の何れかをアッセイに添加し、そして0.5% CHAPS によるPBS 中5分間バイオセンサー表面に結合したWnt拮抗体分子と共にインキュベートした。Wnt拮抗体分子とWntリガンドとの間の相互作用は同じ緩衝剤中でモニタリングした。全アッセイ工程は150uLの体積において室温で実施した。図16はこの結合アッセイの結果を示しており、ここで図16AはFrz1-Frz10-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示し、図16BはsFRP-FcキメラへのWnt3aの結合から得られたデータを示し、そして図16CはFrz1-Frz10-Fcキメラ及びsFRP-FcキメラへのWnt5aの結合から得られたデータを示す。

【0285】

OCTET (商標) アッセイは、Wnt3a及びWnt5aの両方が他のFrz蛋白質

に対してFrz 8-Fc、Frz 5-Fc及びFrz 4-Fcに最速で結合し、Wnt 3aがFrz 1-Fc、Frz 2-Fc及びFrz 7-Fcにより緩徐な速度で結合していることを示している。Wnt 5a結合曲線の幅及び直線性はこの結合アッセイで調べた場合、Wnt 3a結合と対してより低値の結合親和性を示唆している。OCTET（商標）結合データの幅はsFRP-Fc蛋白質がFrz 1、Frz 2及びFrz 7で観察されたものと同様であり、そしてFrz 5及びFrz 8で観察されたものより幾分低いWnt 3aに対する親和性を有することを示唆している。

【0286】

（実施例7）

Wnt拮抗体によるWntシグナル伝達の阻害—細胞アッセイ

細胞アッセイはTOPglowレポータープラスミドでトランスフェクトした293（ヒト腎）細胞を用いて実施した。トランスフェクションのための準備において、トランスフェクション前24時間、500,000 HEK293を12ウェルディッシュ（Nuc）のウェル中に投入した。細胞を、0.375 µg TOPglow（Upstate、Cat # 21-204）、0.05 mg LEF1、0.01 mg SV40RL+Fugene（Roche）でトランスフェクトし、24時間後にトランスフェクトした。培地を交換し、細胞は未処理とするか、又はWnt 3a単独、Wnt 5a単独又はWnt拮抗体で更に20～24時間処理した後に採取した。全ての希釈は指定した細胞系に完全培地中において行った。細胞は50～100 µlの1×SJC溶解緩衝剤（20 mM Tris pH 8.0、137 mM NaCl、1 mM EGTA、1% Triton X-100、10% グリセロール、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、50 mM NaF、1 mM NaVO₄及びプロテアーゼ阻害剤）中に採取し、そして10 µlを二度、Dual-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイキット（Promega, Part # TM058）を用いてアッセイし、そしてEnvision Luminometer（Perkin Elmer）において検出した。ルシフェラーゼ活性はRenilla活性に対して規格化した。

【0287】

Wnt 5aで処置すべき細胞は、レポーターに加えてFrz 4及びLrp5でトランスフェクトした。これらの追加的成分の存在は、Wnt 5aによるWnt経路活性化をカノニカル経路の場合のように可能とする。Mikels AJ, and Nusse R., PLoS Biol. 4:e115 (2006)。Wnt 3a活性化細胞は100 ng/mL Wnt 3aで処置し、Wnt 5a活性化細胞は1 µg/mL Wnt 5aで処置した。

【0288】

図17A及びBに示す通り、Frz-Fc拮抗体は様々な程度にまでWntシグナル伝達を阻害した。Frz 5-Fc及びFrz 8-Fcは両方ともWnt 3aシグナルの完全な阻害を示し、そしてWnt 5aシグナルを有意に阻害した。Frz 4-Fc、Frz 2-Fc及びFrz 7-FcはWnt 3aシグナルの有意な阻害を示した。

【0289】

（実施例8）

Wnt拮抗体の相対的IC₅₀

Wnt拮抗体の相対的IC₅₀を、実施例7に記載したTOPglowルシフェラーゼTCFレポータープラスミドで安定にトランスフェクトしたU2OS（ヒト骨肉腫）細胞におけるWnt拮抗体によるWntシグナル伝達の阻害を計測することにより調べた。細胞における初期Wntシグナル伝達はWnt 3a活性化と共に得られた。Frz-Fcの3倍連続希釈物を一夜細胞に適用した（図18）。このアッセイで測定された通り、Wnt 3aはFrz 8-Fc、Frz 5-Fc及びFrz 4-Fcにナノモル未満のIC₅₀（Frz 8-FcのIC₅₀は0.04 nM、Frz 5-FcのIC₅₀は0.20 nM、そしてFrz 4-FcのIC₅₀は0.48 nM）、そしてFrz 2-Fc及びFrz 7-FcにナノモルレベルのIC₅₀（Frz 2-FcのIC₅₀は1.2 nM、Frz 7-FcのIC₅₀は1.2 nM）を示した。

cのIC50は1.4 nM)で結合している。

【0290】

(実施例9)

薬剤応答の薬力学マーカーとしてのWnt標的遺伝子

β-カテニンの免疫組織化学的分析の代替として、Wntの転写標的を用いてWntシグナル伝達活性の阻害をモニタリングした。オートクリンWntシグナル伝達を有する細胞系は既知Wnt標的遺伝子の増大した発現を示し、この発現をWnt3a並びにFrz8-Fcのインビトロ投与により調節した。NTera-2細胞のRNA分析によれば、Frz8-Fc処置は試験したWnt標的遺伝子の発現に影響することを示している。即ち、これらの遺伝子の発現は処置効能の指示子として追跡することができる。これらの観察の延長として、これらのWnt標的遺伝子の発現は、Wntシグナル伝達により駆動され抗Wnt治療薬に対する有望な候補である癌を識別するための診断ツールとして使用できる。

10

インビトロ

精製されたWnt3a、Fz8CRD-Fc又は対照蛋白質で処置したPA-1細胞に対するインビトロ比較遺伝子発現分析を実施することにより奇形腫細胞におけるWntシグナル伝達のインビボ阻害を示すためのWnt標的遺伝子の適性を調べた。Wnt3a、Frz8-Fc又は対照Fc蛋白質で処置したPA-1細胞から単離されたRNAをマイクロアレイ分析に付し、そして外因性に添加されたWnt3a、Frz8-Fc及び対照Fc蛋白質に応答した指定遺伝子の発現レベルの変化を測定した。マイクロアレイ分析のために、細胞に指定蛋白質を三度投与し、全RNAを、RNAeasyキット(Qiagen)を用いて単離した。アレイ分析はAffymetrixヒトゲノムU133遺伝子チップセットにて実施した(Rubinfeld B, 等, Nat Biotechnol 2006; 24: 205-9)。特異的プローブ及びプライマーセットを図20に示す。

20

【0291】

Axin2、APCDD1及びGad1などのWntシグナル伝達の予め識別されている標的の発現レベルを、Wnt3a処置によりアップレギュレートするか、又はFrz8-Fc処置によりダウンレギュレートした(図19A)。更に、Lefty2(A)、Lefty1(B)、sFRP1及びFzd5などの一部の遺伝子をWnt3aによりダウンレギュレートし、Frz8-FcによるWntシグナル伝達の阻害によりアップレギュレートした(図19A)。その後のqRT-PCRによる遺伝子発現分析により、これらの転写物をNTera-2、Tera-2及びNCCIT細胞においてもWnt3a及びFz8CRD-Fcにより同様に調節した。

30

インビボ

APCDD1、Gad1及びFzd5は上記したインビトロ分析において最も一貫して調節された遺伝子であり、そしてそのため、インビボ腫瘍異種移植片試験のためのWnt応答性の潜在的マーカーとして選択した。

【0292】

腫瘍組織RNAを効能試験終了時に収集した異種移植片標本から精製し、Wnt応答性転写物の定量的逆転写-PCR(qRT-PCR)分析をRubinfeld B, 等, Nat Biotechnol 2006; 24: 205-9により以前に報告されたとおり実施した。各遺伝子の倍々誘導はΔΔCt法を用いて測定し、結果はグルタルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼに対して相対的に表示した。特異的プローブ及びプライマーセットを図20に示す。全ての反応は二度行い、そして少なくとも2のアッセイの平均±SEMをプロットした。

40

【0293】

インビトロで観察された作用と同様に、治療用量のFrz8-Fcでの処置はAPCDD1及びGad1に関する遺伝子発現を低減し、NTera-2異種移植片由来の腫瘍におけるFzd5の発現を増大させた(図19B)。CD4hFc処置の後には全ての遺伝

50

子の一般的な非特異的ダウンレギュレーションがあったが、これらの変化はF r z 8 - F c 処置腫瘍で観察されたものと比較して統計学的に有意ではなかった。これらの観察結果はインビボのF r z 8 - F c の抗腫瘍形成作用は標的遺伝子に対するものであり、そしてこれらの遺伝子の発現レベルは潜在的な抗W n t 治療薬の効能をモニタリングするために使用できることを示している。

【0294】

(実施例10)

自家移植片及びヒト異種移植片を有するマウスにおける腫瘍成長に対するW n t 拮抗体の阻害作用

本実施例に示す試験はW n t 拮抗体がW n t 発現腫瘍を治療する場合に有用であることを示している。W n t - 1 - M M T V モデルの場合における大部分は完全な腫瘍の後退は強力にW n t 駆動性である腫瘍に対するW n t 拮抗体の作用を説明している。しかしながら、P A - 1 及びN T e r 2 腫瘍に対するW n t 拮抗体の有意な作用はまた、完全にW n t 駆動性ではない場合がある腫瘍を治療する強力な治療潜在能力を反映している。

動物

雌性C 5 7 B 1 6 マウス (T h e J a c k s o n L a b o r a t o r y) を M M T V - W n t 1 腫瘍の継代のために使用した。マウスの維持及びインビボの操作法はI n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e 及びU s e C o m m i t t e e 認可プロトコルを用いて実施した。

M M T V - W n t モデル-自家移植片

図21はW n t 動物モデルを作成するためにトランスフェクションにおいて使用したベクター構築物を説明する直線的な模式図である。この構築物は、T s u j o m o t o 等、C e l l 5 5 : 6 1 9 - 6 2 5 (1 9 8 8) 及びL i 等、O n c o g e n e 1 9 : 1 0 0 2 - 1 0 0 9 (2 0 0 0) に記載されている通り、M M T A ウィルス挿入を用いた場合に観察される構成的W n t シグナル伝達活性化を模倣している。

マウスにおけるM M T V - W n t 1 トランスジェニック腫瘍の継代

M M T V - W n t 1 トランスジェニックマウス由来の腫瘍を乳房脂肪パッド内への外科的移植により6~10代に渡りC 5 7 B 1 6 マウスにおいて連続継代した。腫瘍組織をトランスジェニックマウスから無菌的に収集し、H B S S で洗浄し、裁断して小片とした。レシピエントマウスをケタミン (7 0 ~ 8 0 m g / k g) 及びキシラジン (7 . 5 ~ 1 5 m g / k g) の混合物で麻酔し、腫瘍断片を第3乳房脂肪パッドに皮膚吻合下に挿入し、皮膚を創傷クリップを用いて閉鎖した。腫瘍は最大10継代まで継代し、最初の2継代後は、腫瘍組織を組織学的に検査することによりそれが乳房起源であり、そしてW n t を発現し続けていることを確認した。乳腺癌はマウスにおいて6~12か月で発症する。これらのマウスから単離した腫瘍を用いて後に記載する移植モデルを作成した。

インビボ試験

M M T V - W n t モデルにおけるW n t 拮抗体の効能を試験するインビボの試験のために、浸解した腫瘍組織から得た細胞の皮下注射により腫瘍細胞を導入した。腫瘍組織はW n t トランスジェニックマウス由来の腫瘍を移植したマウスから無菌的に収集し (上記) 、P B S 又はH B S S で洗浄し、裁断して小片とし、細胞解離キット (S i g m a) を用いながらH B S S 中に浸解した。細胞を滅菌H B S S 中で二回洗浄し、H B S S 中50%マトリゲル溶液に懸濁した。細胞懸濁液を150 μ l / マウスを超えない容量で無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪パッド内に皮下接種した。

【0295】

N T e r a 2 又はP A - 1 動物モデルを用いたインビボ試験のためには、細胞を記載した通り成長させ、成長が対数期になった時点で採取した。細胞をH B S S 中50%マトリゲル溶液中に懸濁し、そして8 $\times$ 10⁶ 個 / マウス (N T e r a 2) 又は10 $\times$ 10⁶ 個 / マウス (P A - 1) の何れかの濃度において無胸腺ヌードマウス内に皮下接種した。

【0296】

腫瘍は毎日モニタリングし、接種の7~12日後に計測した。動物を150~250 m

m^3 の範囲の同一平均腫瘍体積の群に分割した。Wnt 拮抗体での処置は群分けの 1～2 日後に開始し、そしてマウスには 1 日 1 回、Wnt 拮抗体、陰性対照蛋白質 CD4-Fc、又は PBS の 100～200 μL を腹腔内 (IP) 又は静脈内 (IV) 投与した。その後の薬剤処置を毎週 2～3 回反復し、そして 3～4 週間継続した。腫瘍は毎週 2 回計測し、腫瘍体積が 2500 mm^3 に達した時点で動物を屠殺した。血液は眼窩静脈出血により試験期間中に採取し、血清は、SDS-PAGE とその後のイムノブロッティング及び HRP 又は蛍光コンジュゲート抗ヒト Fc を用いた検出により治療薬のレベルに関して、そして、実施例 7 に記載する通り TOPglow 活性の Wnt3a 活性化を阻害するその能力により治療薬の活性に関して試験した。

自家移植片腫瘍

腫瘍自家移植片の成長に対する Wnt 拮抗体の阻害作用

ip 又は iv 経路の何れかによる Frz8-Fc での処置は急速な腫瘍の後退と投与過程の間の持続的な阻害をもたらしたのに対し、陰性対照蛋白質 CD4-Fc は PBS 処置に対して作用を有さなかった。処置マウスは投与終了後 3 週間モニタリングし、最終的には腫瘍の再生が観察された。

【0297】

図 22 は腹腔内 (IP) 投与による無胸腺ヌードマウスにおける MMTV-Wnt 腫瘍移植片に対する Frz8-Fc の効能を説明する。図 22A は MMTV-Wnt-1 腫瘍移植片を保有するヌードマウスに週 2 回腹腔内注射により PBS、CD4-Fc (10 mg/kg/日) 又は Frz8-Fc (10 mg/kg/日) を投与した場合を示すグラフである。各群マウス 11 匹であり、群の平均腫瘍体積は処置開始前に 226 mm^3 であった。平均の腫瘍体積を経時的にプロットし、そして処置日を X 軸上矢印で示す。第 25 日において、対照群を屠殺し、投与群への薬剤投与を停止した。図 22B は 4 投与群における経時的な平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。図 22B において注意すべき点は、Frz8-Fc 拮抗体処置後の平均腫瘍体積は処置開始後第 5 日において 226 mm^3 から約 219 mm^3 、第 18 日には約 67 mm^3 まで腫瘍体積の低下をもたらしている。これは腫瘍サイズのそれぞれ 4% 及び 70% の低減を示している。本試験においては、Frz-Fc 拮抗体を投与した腫瘍は対照動物と比較して腫瘍サイズの後退を示した。このことは本発明の Frz-Fc 拮抗体が単剤として殺腫瘍性であり、そして抗癌治療薬として有用であることを明らかにしている。

【0298】

図 23 は静脈内 (IV) 投与による無胸腺ヌードマウスにおける MMTV-Wnt 腫瘍移植片に対する Frz8-Fc の効能を説明する。図 23A は MMTV-Wnt-1 腫瘍移植片を保有するヌードマウスに週 3 回静脈内注射により PBS、CD4-Fc (10 mg/kg/日) 又は Frz8-Fc (10 mg/kg/日) を投与した場合を示すグラフである。各群マウス 11 匹であり、群の平均腫瘍体積は処置開始前に 226 mm^3 であった。本試験における第 4 の群 (ハイパー群) には週 3 回静脈内注射により Frz8-Fc (10 mg/kg/日) で処置した試験開始時に 375 mm^3 の平均腫瘍体積を有するマウス 10 匹を包含していた。平均の腫瘍体積を経時的にプロットし、そして処置日を X 軸上矢印で示す。第 25 日において、対照群動物を屠殺し、処置群への薬剤投与を停止した。図 23B は 4 投与群における経時的な平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率 (%) の表による集計である。注意すべき点は、Frz8-Fc で処置した全マウスにおいて腫瘍負荷は平均 226 mm^3 から処置開始後第 4 日において 179 mm^3 の平均体積にまで、そして第 18 日には約 73 mm^3 まで低減している。これは腫瘍サイズのそれぞれ 21% 及び 67% の低減を示している。ハイパー群に関しては、腫瘍体積は平均 376 mm^3 から処置第 4 日には 225 mm^3 に、そして第 18 日には 53 mm^3 に低減している。これは腫瘍サイズのそれぞれ 39% 及び 86% の低減を示している。

Wnt シグナル伝達に対する投与マウスから得た血清の阻害作用

処置マウスから単離した血清に由来する Wnt シグナル伝達の阻害は図 24 に報告する通りであり、図 24A は IP 処置マウスから単離した血清の結果を示し、IV 投与のもの

10

20

30

40

50

は図24Bに示す。データはTOPglowアッセイ（実施例7に記載）におけるWntシグナル伝達拮抗体活性を示す棒グラフとして示す。この試料は投与、マウス試験番号及び希釈に従って群として存在している。TOPglow遺伝子レポーターアッセイにおける相対的ルシフェラーゼ活性はY軸上に示す。NA（対照）を除く全ての試料に約40 ng/mLの精製されたWnt3aを投与している。全ての他の蛋白質対照は5 µg/mLで培地中存在している。

ヒト異種移植片腫瘍

Wnt拮抗体により天然に誘導されたヒト腫瘍モデルの阻害はヒト癌の治療におけるそれらの有用性の更なる指示子として機能すると考えられる。ヒト腫瘍誘導細胞系を、Wnt拮抗体活性を試験する場合の有用性の指標として、PA-1奇形腫細胞系において観察されたものと同様のオートクリンWntシグナル伝達の証拠に関して試験した。奇形腫誘導NTera-2、Tera-2、及びNCCIT細胞系はFrz8-Fcにより阻害できる基礎Wntシグナル伝達を呈したのとは対照的に、293細胞はFrz8-Fcにより阻害されない低い基礎シグナル伝達を呈した（図25A）。しかしなお、4種全ての奇形腫細胞系はWnt受容体を発現したと考えることができ、その理由はWnt3a処置によりシグナル伝達が更に刺激され、これはFrz8-Fcにより遮断され得るためである（図25B）。これらの結果は奇形腫細胞系がWntを発現し、それがそれらの腫瘍形成性に寄与していることを示している。従ってこれらの系を無胸腺ヌードマウスにおける腫瘍形成に関して評価し、そして腫瘍形成の一貫性に基づいてNTera-2及びPA-1をインビボ効能試験のために選択した。

NTera2腫瘍異種移植片に対するWnt拮抗体の阻害作用

Wnt拮抗体Frz8-FcによるNTera2腫瘍異種移植片を呈しているマウスの治療は対照マウスに比して、約50%の腫瘍体積の低減及び約70%の腫瘍質量の低減をもたらした。

【0299】

図26は無胸腺ヌードマウスにおけるNTera2腫瘍異種移植片の成長に対するFrz8-Fc処置の抗腫瘍効能を示す。NTera2腫瘍異種移植片を担持した無胸腺ヌードマウスに15 mg/kg/日の初期用量のPBS、CD4-Fc及びFrz8-Fc、次いで10 mg/kg/日の後続用量を週3回腹腔内注射により投与した。各群はマウス20匹とし、群の平均腫瘍体積は投与開始前に200 mm³であった。試験の第4の群はFrz8-Fc（10 mg/kg/日）を週3回腹腔内注射により処置した試験開始時336 mm³の平均腫瘍体積を有するマウス10匹を包含していた。図26Aは例示的手順のフローチャートであり、図26Bは経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、ここで処置日はX軸上で矢印により示す。図26Cは試験の第20日における群中の全動物の屠殺時における平均腫瘍重量をプロットしたグラフである。図26D及び26Eはそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率（%）の表による集計である。

Wntシグナル伝達に対するNTera2腫瘍異種移植片を有するマウスから得た血清の阻害作用

図27はNTera2腫瘍試験における種々の動物から単離した血清のFrz8-Fc Wnt拮抗体のTOPglowアッセイにおけるWntシグナル伝達拮抗体活性を示す棒グラフである。総体的ルシフェラーゼ活性（Y軸）は対照及びFrz8-Fc Wnt拮抗体によるTOPglowアッセイから計測した。追加的な精製Wnt又はWntコンディショニング培地は細胞には添加しなかった。これらの結果は低減されたWntシグナル伝達がFrz8-Fc Wnt拮抗体で処置されたこれらのマウスにおける腫瘍サイズの低減に関連していることを示している。

PA-1腫瘍異種移植片の成長に対するWnt拮抗体の阻害作用

Wnt拮抗体Frz8-FcによるPA-1腫瘍異種移植片を呈しているマウスの治療は治療12日以内に腫瘍成長の有意な低減をもたらした。このモデルでは、腫瘍は約50%より小型であり、治療期間の終了時には対照マウスにおける腫瘍よりも有意に小型の塊であった。

【0300】

図28は無胸腺ヌードマウスにおけるPA-1腫瘍異種移植片の成長に対するFrz8-Fc処置の抗腫瘍効能を示す。PA-1腫瘍異種移植片を担持した無胸腺ヌードマウスに15mg/kg/日のPBS、CD4-Fc及びFrz-Fc、次いで10mg/kg/日の後続用量を週3回腹腔内注射により投与した。各群はマウス13匹とし、そして群の平均腫瘍体積は処置開始前に168mm³であった。図28Aは例示の手順のフローチャートであり、図28Bは経時的な平均腫瘍体積をプロットしたグラフであり、ここで処置日はX軸上で矢印により示す。図28Cは屠殺時における平均腫瘍重量のグラフである。マウスは細胞接種後第58日（治療開始後第32日）に屠殺し、そして腫瘍を摘出して計量した。平均腫瘍重量±SEMを群の関数としてプロットする。図28D及び28Eはそれぞれ平均腫瘍体積及び腫瘍体積の平均変化率（%）の表による集計である。

10

【0301】

(実施例11)

MMTV腫瘍を移植されFrz8-Fc及びFrz5-FcWnt拮抗体によって処置されたマウスにおけるWntシグナル伝達

Wntシグナル伝達に対するFrz8-Fc及びFrz5-FcWnt拮抗体の作用

Frz5-FcはFrz8-Fcと同様に効果的にWnt3a誘導シグナル伝達を阻害する。

【0302】

MMTV腫瘍（約400～800mm³サイズ）を有する無胸腺ヌードマウスをFrz8-Fc、Frz5-Fc、又は陰性対照としてのCD4-Fcを10mg/kgで処置した。処置後5時間に、マウスから心臓穿刺により血清を収集し、Wnt3aにより活性化された293細胞に対するWnt阻害作用に関して分析し、そして実施例7に記載する通りTOPglowによりトランスフェクトした。NA（対照）を除く全試料を約40ng/mLの精製されたWnt3aで処置する。全ての他の蛋白質対照は5μg/mLで培地中に存在させる。図29はFrz8-Fc又はFrz5-Fcで処置したマウスにおける阻害のレベルを示す。Frz8-Fc又はFrz5-Fcでの処置は同等レベルのWnt3a誘導シグナル伝達阻害をもたらした。

20

Axin2発現に対するFrz8-Fc及びFrz5-FcWnt拮抗体の作用

Frz8-Fc及びFrz5-FcはWnt標的遺伝子Axin2の調節により測定した場合にインビボのWntシグナル伝達を阻害する。

30

【0303】

MMTV腫瘍（約400～800mm³サイズ）を有する無胸腺ヌードマウスをFrz8-Fc、Frz5-Fc、又は陰性対照としてのCD4-Fcを10mg/kgで処置した。処置後5時間に、マウスから心臓穿刺により血清を収集した。QIAGEN RNEASYキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて腫瘍細胞からRNAを抽出し、実施例9に記載する通りAxin2の発現に関して分析した。Axin2の低減したレベルがFrz8-Fc又はFrz5-Fcで処置したマウスから得られた試料中で観察され、これらの化合物がインビボのWntシグナル伝達を阻害できることを示していた。図30はFrz8-Fc及びFrz5-Fc処置腫瘍における低減されたAxin2発現を示し、図30AはGAPDHの発現に対して規格化した発現を示し、図30Bはrp119の発現に対して規格化した発現を示す。

40

【0304】

(実施例12)

Wnt拮抗体を投与した再生組織

Wntシグナル伝達は皮膚、腸及び造血細胞などの再生性の組織の自己更新において重要な役割を果たしており、Dkk1によるWntシグナル伝達の阻害は成熟マウスにおけるこれらの組織の構造に悪影響を与える場合がある。以下の実施例は抗腫瘍効能を得るために使用される条件と同条件下のFrz8-Fcへの曝露がマウスにおける腸及び皮膚に何らかの影響を有しているかどうかを調べるものである。組織は週3回14処置後にMM

50

T V-W n t 1 腫瘍モデル（実施例 1 0 に記載）における処置マウスから収集し、切片を免疫組織化学的操作により β -カテニン蛋白質に関して染色した。皮膚及び種々の腸コンパートメントの分析によりこれらの組織の構造が全ての群の処置マウスにおいて形態学的に正常であるらしいことを示し、腸パネート細胞（図 3 1 A）及び皮膚毛包（図 3 1 B）における細胞質及び核の β -カテニン染色の典型的なパターンが伴っていた。更に、週 3 回 9 処置後の N T e r a-2 モデルを用いた場合の動物から収集された皮膚及び腸の組織学的及び免疫組織化学的分析も、対照群と投与群との間に差がないことを示していた。このことは腫瘍成長を阻害できる治療レジメンによる F r z 8-F c による治療が皮膚及び腸の組織更新に対して悪影響を有さないことを示唆している。

【0305】

（実施例 1 3）

本実施例は W n t 拮抗体を製造する種々の方法を記載する。

大腸菌における W n t 拮抗体の発現

本実施例は大腸菌における組み換え発現による W n t 拮抗体の未グリコシル化形態の製造を説明する。

【0306】

W n t 拮抗体をコードする D N A 配列を、初めに、選択された P C R プライマーを用いて増幅する。プライマーは選択された発現ベクター上の制限酵素部位に相当する制限酵素部位を含有する必要がある。種々の発現ベクターを使用してよい。適当なベクターの例はアンピシリン及びテトラサイクリン耐性に関する遺伝子を含有する p B R 3 2 2（大腸菌から誘導；B o l i v a r 等、Gene, 2: 95 (1977) 参照）である。ベクターを制限酵素で消化し、脱ホスホリル化する。次に P C R 増幅した配列をベクター内にライゲーションする。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、t r p プロモータ、ポリ h i s リーダー（最初の 6 S T I I コドン、ポリ h i s 配列、及びエンテロキナーゼ切断部位）、W n t 拮抗体コーディング領域、ラムダ転写終結因子、及び a r g U 遺伝子をコードする配列を包含する。

【0307】

次にライゲーション混合物を用いて選択された大腸菌を S a m b r o o k 等、上出に記載される方法を用いて形質転換する。形質転換体は L B プレート上で成長するそれらの能力により識別し、次に抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミド D N A を単離し、制限分析及び D N A 配列決定により確認する。

【0308】

選択されたクローンは抗生物質を添加した L B ブロスなどの液体培地中で一夜成長させることができる。一夜培養物はその後より大規模の培養物に接種するために使用してよい。次に細胞を所望の光学密度まで成長させ、その間、発現プロモータを作動させる。

【0309】

更に数時間細胞を培養したのち、細胞を遠心分離により採取する。遠心分離により得た細胞ペレットは当該分野で知られた種々の薬剤で可溶化することができ、可溶化された W n t 拮抗体蛋白質は次に、蛋白質の堅固な結合を可能にする条件下で金属キレート形成カラムを用いて精製することができる。

【0310】

W n t 拮抗体は以下の手順を用いながらポリ H i s タグ化形態において大腸菌内で発現してよい。W n t 拮抗体をコードする D N A を選択された P C R プライマーを用いて初めに増幅する。プライマーは選択された発現ベクター上の制限酵素部位に相当する制限酵素部位、及び、効率的で信頼性の高い翻訳の開始、金属キレート形成カラム上での迅速な精製、及びエンテロキナーゼの蛋白質分解的除去を提供する他の有用な配列を含有する。P C R 増幅ポリ H i s タグ化配列を次に発現ベクター内にライゲーションし、これを用いて菌株 5 2 に基づいた大腸菌宿主（W 3 1 1 0 f u h A (t o n A) l o n g a l E r p o H t s (h t p R t s) c l p P (l a c I q)）を形質転換する。形質転換体は、初めに、3~5 の O D 6 0 0 に到達するまで振とうしながら 3 0 °C において 5 0 m g /

10

20

30

40

50

mlのカルベニシリンを含有するLB中で成長させる。次に培養物をCRAP培地（水500ml中3.57gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.71gのクエン酸ナトリウム $2\text{H}_2\text{O}$ 、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母エキス、5.36gのSheffieldハイケースFS並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55% (w/v) グルコース及び7mMの MgSO_4 を混合することにより製造)中に50~100倍希釈し、そして振とうしながら30℃において約20~30時間成長させる。試料を除去してSDS-PAGEにより発現を確認し、バルク培養物全体を遠心分離して細胞をペレット化する。細胞ペレットを精製及び再折り畳みまで凍結する。

【0311】

0.5~1Lの発酵物に由来する大腸菌ペースト（6~10gペレット）を7Mのグアニジン、20mM Tris、pH8の緩衝剤中10容量 (w/v) で再懸濁する。固体の硫酸ナトリウム及びナトリウムテトラチオネートをそれぞれ終濃度0.1M及び0.02Mとなるように添加し、溶液を4℃で一夜攪拌する。この工程により全てのシステイン残基がスルフィトール化により遮断された変性蛋白質をもたらす。溶液を30分間Beckman超遠心分離機において40,000rpmで遠心分離する。上澄みを金属キレートカラム緩衝剤（6Mグアニジン、20mM Tris、pH7.4）3~5容量で希釈し、0.22ミクロンのフィルタで濾過することにより清澄化する。清澄化された抽出液は金属キレートカラム緩衝剤中で平衡化させた5ml Qiagen Ni-NTA金属キレートカラムにロードする。カラムを追加的な50mMイミダゾール含有緩衝剤（Galbiochem, Utrोल等級）pH7.4で洗浄する。250mMイミダゾール含有緩衝剤で蛋白質を溶出させる。所望の蛋白質を含有する画分を合わせ、4℃で保存する。蛋白質濃度はそのアミノ酸配列に基づいて計算された消光係数を用いて280nmにおけるその吸光度により推定する。

【0312】

蛋白質は20mM Tris、pH8.6、0.3M NaCl、2.5M尿素、5mMシステイン、20mMグリシン及び1mM EDTAよりなる新しく製造した再折り畳み緩衝剤中に緩徐に試料を希釈することにより再折り畳みさせる。再折り畳み容量は最終蛋白質濃度が50~100マイクログラム/mlとなるように選択する。再折り畳み溶液は12~36時間4℃で穏やかに攪拌する。再折り畳み反応はTFAを終濃度0.4% (pH約3)となるように添加することによりクエンチする。蛋白質を更に精製する前に、溶液を0.22ミクロンのフィルタで濾過し、アセトニトリルを2~10%終濃度となるように添加する。再折り畳み蛋白質は10~80%のアセトニトリル勾配を用いた溶離により0.1%TFAの移動相緩衝剤を用いたポーラスR1/H逆相カラム上のクロマトグラフィに付す。A280吸光度を有する画分のアリコートでSDSポリアクリルアミドゲル上で分析し、均質な再折り畳み蛋白質を含有する画分をプールする。一般的に大部分の蛋白質の正しく再折り畳みされた物質種は、それら物質種がそれらの疎水性の内部を逆相樹脂との相互作用から遮蔽された状態で最も圧縮されているため、アセトニトリルの最低濃度において溶出する。凝集した物質種は通常はより高いアセトニトリル濃度で溶出する。誤って折りたたまれた形態の蛋白質を所望の形態から分割することに加えて、逆相工程も、試料から内毒素を除去する。

【0313】

所望の折りたたまれたWnt拮抗体ポリペプチドを含有する画分を合わせ、そして溶液に指向された穏やかな窒素流を用いてアセトニトリルを除去する。蛋白質は透析によるか、又は製剤緩衝剤中で平衡化したG25 Superfine (Pharmacia)樹脂を用いたゲル濾過により20mM Hepes、pH6.8+0.14M塩化ナトリウム及び4%マンニトールとなるように製剤し、そして滅菌濾過する。

哺乳動物細胞におけるWnt拮抗体の発現

本実施例は哺乳動物細胞における組み換え発現によるWnt拮抗体の潜在的にグリコシル化された形態の製造を説明する。

【0314】

ベクター pRK5 (1989年3月5日公開の欧州特許307, 247参照) を発現ベクターとして使用した。場合により Wnt 拮抗体 DNA を選択された制限酵素で pRK5 内にライゲーションすることにより、Sambrook 等、上出に記載されているようなライゲーション法を用いて Wnt 拮抗体 DNA の挿入を可能にする。本実施例の目的のために、得られたベクターは pRK5-WA と称する。

【0315】

1つの実施形態において、選択された宿主細胞は293細胞であってよい。ヒト293細胞(ATCC CCL1573)をウシ胎児血清及び場合により栄養成分及び／又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中組織培養プレート中でコンフルエントとなるまで成長させる。約10 μ gのpRK-WA DNAをVARNA遺伝子をコードするDNA [Thimmapaya等、Cell, 31:543 (1982)] 約1 μ gと混合し、そして500 μ lの1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂に溶解する。この混合物に、500 μ lの50mM HEPES (pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄を滴下し、25℃で10分間沈殿を形成させる。沈殿を懸濁させ、293細胞に添加し、37℃で約4時間沈降させる。培地を吸引し、PBS中20%グリセロール2mlを30秒間添加した。次に293細胞を血清不含培地で洗浄し、新しい培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

【0316】

トランスフェクションの約24時間後、培地を除去し、培地(単独)又は200 μ Ci/ml ³⁵S-システイン及び200 μ Ci/ml ³⁵S-メチオニンを含む培地と交換する。12時間のインキュベーションの後、コンディショニングされた培地を収集し、スピンフィルタにて濃縮し、そして15%SDSゲル上にロードさせた。プロセッシングされたゲルを乾燥し、Wnt 拮抗体ポリペプチドの存在を明らかにするための選択された期間に渡ってフィルムに露光させてよい。トランスフェクトされた細胞を含む培地を更にインキュベート(血清不含培地中)してよく、そして培地を選択されたバイオアッセイにおいて試験する。

【0317】

代替の手法において、Wnt 拮抗体はSomparyrac等、Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載のデキストランサルフェート法を用いて一過性に293細胞内に導入してよい。293細胞はスピナーフラスコにて最大密度となるまで成長させ、そして700 μ gのpRK5-WA DNAを添加する。細胞を、初めに、遠心分離によりスピナーフラスコから濃縮し、そしてPBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を4時間細胞ペレットにてインキュベートする。細胞を90秒間20%グリセロールで処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 μ g/ml ウシインスリン及び0.1 μ g/ml ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコ内に再導入する。約4日間の後、コンディショニングされた培地を遠心分離し、濾過することにより細胞及び破砕片を除去する。次に発現されたWnt 拮抗体を含む試料を濃縮し、透析及び／又はカラムクロマトグラフィなどの何れかの選択された方法により精製する。

【0318】

別の実施形態においては、Wnt 拮抗体はCHO細胞中で発現できる。pRK5-WAをCaPO₄又はDAEA-デキストランなどの既知試薬を用いながらCHO内にトランスフェクトすることができる。上記した通り細胞培養物をインキュベートすることができる。培地を培地(単独)又は³⁵S-メチオニンなどの放射標識を含む培地と交換する。Wnt 拮抗体ポリペプチドの存在を測定した後、培地を血清不含培地と交換する。好ましくは培地を約6日間インキュベートし、次にコンディショニングされた培地を採取する。次に発現されたWnt 拮抗体を含む培地を何れかの選択された方法により濃縮及び精製することができる。

エピトープタグ化Wnt 拮抗体は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。Wnt 拮抗体はpRK5ベクターからサブクローニングしてよい。サブクローンインサートはP

CRを受けてバキュロウィルス発現ベクター内にポリhisタグなどの選択されたエピトープタグと共にインフレームに融合させることができる。ポリhisタグ化Wnt拮抗体インサートは次に、安定なクローンの選択のためのDHFRなどの選択マーカーを含有するSV40駆動ベクター内にサブクロニングすることができる。最後に、CHO細胞をSV40駆動ベクターによりトランスフェクト（上記）することができる。標識は発現を確認するために上記した通り実施してよい。次に発現されたポリHisタグ化Wnt拮抗体を含む培地をNi²⁺キレートアフィニティクロマトグラフィなどの何れかの選択された方法により濃縮及び精製することができる。

【0319】

Wnt拮抗体はCHO及び／又はCOS細胞において一過性発現手順により、又はCHO細胞において別の安定な発現手順により発現させてもよい。

【0320】

CHO細胞における安定な発現は以下の手順を用いて実施する。蛋白質を該当する蛋白質の可溶性形態に関するコード配列（例えば細胞外ドメイン）がヒンジ、CH2およびCH2ドメインを含有するIgG1定常領域配列に融合されている、及び／又はポリHisタグ化形態にあるIgG構築物（イムノアドヘシン）として発現させる。

【0321】

PCR増幅の後、該当するDNAをAusubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons（1997）に記載の標準的手法を用いてCHO発現ベクターにサブクロニングする。CHO発現ベクターはcDNAの好都合なシャトル作用を可能にするための目的のDNAの5'及び3'の適合制限部位を有するように構築する。CHO細胞における発現のために使用されるベクターはLucas等、Nucleic Acids Res. 24:9（1774-1779（1996））に記載されており、そして目的のcDNA及びジヒドロフォレート還元酵素（DHFR）の発現を駆動するためにSV40初期プロモータ／エンハンサを使用する。DHFR発現はトランスフェクション後のプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

【0322】

所望のプラスミドDNA12マイクログラムを市販のトランスフェクション試薬SUPERFECT（登録商標）（Qiagen）、DOSPER（登録商標）又はFUGENE（登録商標）（Boehringer Mannheim）を用いて約10×10⁶個のCHO細胞に導入する。細胞はLucas等、上記に記載の通り成長させる。約3×10⁷個の細胞を以下に記載する通り後の成長および製造のためにアンプル中に凍結する。

【0323】

プラスミドDNAを含有するアンプルをウォーターバス内に入れ、回転混合することにより解凍する。内容物をピペットで培地10mLを含有する遠心分離管に入れ、5分間1000rpmで遠心分離する。上澄みを吸引し、細胞を選択培地（0.2μmフィルタ処理PS20+5%0.2μm透析済みウシ胎児血清）10mL中に再懸濁する。次に細胞を選択培地90mLを含有する100mLのスピナー中に分取する。1～2日後、細胞を150mLの選択成長培地で満たされた250mLスピナーに移し、そして37℃でインキュベートする。更に2～3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーに3×10⁵個/mLを播種する。遠心分離及び生産培地中の再懸濁により細胞培地を新しい培地と交換する。何れかの安定なCHO培地を使用してよいが、1992年6月16日に発行された米国特許5,122,469に記載の生産培地を実際には使用してよい。3Lの生産スピナーに1.2×10⁶個/mLを播種する。第0日において、細胞数、pHを測定する。第1日において、スピナーを採取し、濾過空気パージを開始する。第2日にスピナーを採取し、温度を33℃に変更し、そして500g/Lグルコース30mL及び10%消泡剤（例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365医療等級エマルジョン）0.6mLを採取する。生産を通じて、pHは概

10

20

30

40

50

ね 7. 2 に維持されるように調節する。10 日後、又は生存性が 70 % 未満に低下するまで、細胞培養物を遠心分離及び 0. 22 μ m フィルタ濾過により採取する。濾液は 4 °C で保存するか、又は、即座に精製用カラムにロードする。

【0324】

ポリ His タグ化構築物に関しては、蛋白質は Ni-NTA カラム (Qiagen) を用いて精製する。精製の前に、イミダゾールをコンディショニングされた培地に 5 mM の濃度となるまで添加する。コンディショニング培地は 4 °C で 4 ~ 5 ml / 分の流量において 0. 3 M NaCl 及び 5 mM イミダゾールを含有する 20 mM Hepes pH 7. 4 緩衝剤で平衡化させた 6 ml の Ni-NTA カラム上に送液する。ローディング後、カラムを追加の平衡化緩衝剤で洗浄し、0. 25 M イミダゾール含有平衡化緩衝液で蛋白質を溶離させる。高度に精製された蛋白質はその後、25 ml の G25 Superfine (Pharmacia) カラムを用いて 10 mM Hepes、0. 14 M NaCl 及び 4 % マンニトールを含有する保存緩衝剤 pH 6. 8 中に脱塩し、そして -80 °C において保存する。

10

【0325】

イムノアドヘシン (Fc 含有) 構築物を以下の通りコンディショニングされた培地から精製する。コンディショニングされた培地を 20 mM リン酸ナトリウム緩衝剤 pH 6. 8 で平衡化されている 5 ml プロテイン A カラム (Pharmacia) 上に送液する。ローディング後、カラムを平衡化緩衝剤で十分洗浄した後に、100 mM クエン酸 pH 3. 5 で溶離させる。溶離した蛋白質は 275 μ L の 1 M Tris 緩衝剤 (pH 9) を含有する試験管に 1 ml 画分ずつ収集することにより即座に中和する。高度に精製された蛋白質はその後、ポリ His タグ化蛋白質に関して上記した通り保存緩衝剤中に脱塩する。均質性は SDS ポリアクリルアミドゲルにより、そしてエドマン分解による N 末端アミノ酸配列決定により評価する。

20

酵母における Wnt 拮抗体の発現

以下の方法は酵母における Wnt 拮抗体の組み換え発現を記載する。

【0326】

第 1 に、酵母発現ベクターを Wnt 拮抗体の細胞内生産又は分泌のために ADH2 / GAPDH プロモータから構築する。Wnt 拮抗体及びプロモータをコードする DNA を Wnt 拮抗体の細胞内発現を指向するために選択されたプラスミドの適当な制限酵素部位内に挿入する。分泌のために、Wnt 拮抗体をコードする DNA を、ADH2 / GAPDH プロモータ、ネイティブの Wnt 拮抗体シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は例えば酵母アルファ因子又はインベルターゼ分泌シグナル / リーダー配列、及び Wnt 拮抗体の発現のためのリンカー配列 (必要な場合) をコードする DNA と共に選択されたプラスミド内にクローニングすることができる。

30

【0327】

酵母菌株 AB110 などの酵母細胞を次に上記した発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養することができる。形質転換された酵母の上澄みは、10 % トリクロロ酢酸による沈澱及び SDS-PAGE による分離、その後のクーマシーブルー染色によるゲルの染色により分析することができる。

40

【0328】

組み換え Wnt 拮抗体はその後、遠心分離により発酵培地から酵母細胞を除去すること、そして次に選択されたカートリッジフィルタを使用して培地を濃縮することにより、単離精製できる。Wnt 拮抗体を含有する濃縮物は更に選択されたカラムクロマトグラフィ樹脂を用いて精製してよい。

バキュロウィルス感染昆虫細胞における Wnt 拮抗体の発現

以下の方法はバキュロウィルス感染昆虫細胞における Wnt 拮抗体の組み換え発現を記載する。

【0329】

Wnt 拮抗体に関してコードする配列をバキュロウィルス発現ベクター内に含有される

50

エピトープタグの上流に融合させる。そのようなエピトープタグはポリhisタグ及び免疫グロブリンタグ（例えばIgGのFc領域）を包含する。pVL1393（Novagen）などの市販のプラスミドから誘導したプラスミドを包含する種々のプラスミドを使用してよい。概すれば、Wnt拮抗体、又はWnt拮抗体のコード配列の所望の部分にコードする配列、例えば膜貫通蛋白質の細胞外ドメインをコードする配列、又は蛋白質が細胞外である場合は成熟蛋白質をコードする配列を、5'及び3'領域に対して相補なプライマーを用いたPCRにより増幅する。5'プライマーはフランキングする（選択された）制限酵素部位を取り込んでよい。次に産物をこれらの選択された制限酵素で消化し、そして発現ベクター内にサブクローニングする。

【0330】

10

組み換えバキュロウィルスは上記プラスミド及びBACULOGOLD（商標）ウィルスDNA（Pharmingen）をスポドプテラ・フルギペルダ（Sf9）細胞（ATCC CRL1711）内にリポフェクチン（GIBCO-BRLより販売）を用いて同時トランスフェクトすることにより作成する。28℃で4～5日インキュベートした後、放出されたウィルスを採取し、その後の増幅に使用する。ウィルス感染及び蛋白質発現はO'Reilly等、Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載の通り実施する。

【0331】

発現されたポリhisタグ化Wnt拮抗体は次に例えば以下の通りNi²⁺-キレートクロマトグラフィにより精製できる。Rupert等、Nature, 362:175-179 (1993)により記載される通り組み換えウィルス感染Sf9細胞から抽出液を製造する。概すれば、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用緩衝剤（25mL Hepes、pH7.9; 12.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%NP-40; 0.4M KCl）に再懸濁し、そして氷上で20秒間2回超音波処理する。超音波処理物は遠心分離により清澄化し、そして上澄みをローディング緩衝剤（50mMホスフェート、300mM NaCl、10%グリセロール、pH7.8）中に50倍希釈し、0.45μmフィルタを通して濾過する。Ni²⁺-NTAアガロースカラム（Qiagenより販売）を5mLの床容量で作製し、水25mLで洗浄し、ローディング緩衝剤25mLで平衡化する。濾過した細胞抽出液を0.5mL/分でカラムにロードする。カラムはローディング緩衝剤でベースラインのA₂₈₀となるまで洗浄し、その時点で画分の収集を開始する。次にカラムを2次洗浄緩衝剤（50mMホスフェート; 300mM NaCl、10%グリセロール、pH6.0）で洗浄し、これにより非特異的結合蛋白質を溶離させる。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを2次洗浄緩衝剤中0～500mMのイミダゾール勾配を用いて展開する。1mL画分を収集し、SDS-PAGE及び銀染色、又はアルカリホスファターゼにコンジュゲートしたNi²⁺-NTA（Qiagen）を用いたウエスタンブロットにより分析する。溶出したHis₁₀-タグ化Wnt拮抗体を含む画分をプールし、ローディング緩衝剤に対して透析する。

20

30

【0332】

40

或いはIgGタグ化（又はFcタグ化）Wnt拮抗体の精製は例えばプロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィを包含する既知のクロマトグラフィ手法を用いながら実施できる。

アフィニティクロマトグラフィを用いたWnt拮抗体ポリペプチドの精製

ネイティブ又は組み換えのWnt拮抗体ポリペプチドは蛋白質精製の分野の種々の標準的手法により精製してよい。例えば、プロ-、成熟、又はプレ-Wnt拮抗体ポリペプチドを目的のWnt拮抗体ポリペプチドに対して特異的な抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィにより精製する。一般的に、イムノアフィニティカラムは活性化されたクロマトグラフィ樹脂にWnt拮抗体ポリペプチドを共有結合的にカップリングすることにより構築される。或いは、Fcドメインを含有するWnt拮抗体はProSep A（M

50

i l l i p o r e) などの固定化されたプロテインA樹脂を用いて培地から直接精製してよい。

【0333】

ポリクローナル免疫グロブリンを、硫酸アンモニウムを用いた沈殿によるか、又は固定化されたプロテインA上 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) の精製により免疫血清から製造する。同様に、モノクローナル抗体を硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインA上のクロマトグラフィによりマウス腹水から製造する。部分精製された免疫グロブリンをCnBr活性化SEPHAROSE (商標) (Pharmacia LKB Biotechnology) などのクロマトグラフィ樹脂に共有結合させる。製造元の説明書に従って、抗体を樹脂にカップリングさせ、樹脂を遮断し、そして誘導体樹脂を洗浄する。

10

【0334】

そのようなイムノアフィニティカラムは可溶性形態においてWnt拮抗体を含有する細胞から画分を製造することによるWnt拮抗体ポリペプチドの精製において利用してよい。この調製品は全細胞、又は洗剤添加による示差的遠心分離を介して得られたサブ細胞画分の可溶化により、又は当該分野で良く知られている他の方法により、誘導される。或いはシグナル配列を含有する可溶性Wnt拮抗体ポリペプチドは細胞を成長させている培地中に有用な量において分泌させてよい。

【0335】

可溶性Wnt拮抗体ポリペプチド含有調製品はイムノアフィニティカラムを通過し、そしてカラムをWnt拮抗体ポリペプチドの優先的吸収が可能な条件下 (例えば洗剤存在下の高イオン強度緩衝剤) で洗浄する。次に、抗体/Wnt拮抗体結合を崩壊させる条件下 (例えば低pH緩衝剤、例えば約pH2~3、又は高濃度のカオトロピックな物質、例えば尿素又はチオシアネートイオン) にカラムを溶離し、そしてWnt拮抗体ポリペプチドを収集する。

20

文献

【0336】

【化 3 1】

1. He TC, Sparks AB, Rago C, *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; **281**: 1509-1512.
2. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; **398**: 422-426
3. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; **99**: 335-345. 10
4. Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A, Wang TC. Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* 2000; **106**: 533-539.
5. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, *et al.* Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; **18**: 1385-1390.
6. Chen TA, Yang I, Irby R, *et al.* Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res* 2003; **63**: 4368-4374. 20
7. Paoni NF, Feldman MW, Gutierrez LS, Ploplis VA, Castellino FJ. Transcriptional profiling of the transition from normal intestinal epithelia to adenomas and carcinomas in the APC(Min/+) mouse. *Physiol Genomics* 2003; **15**: 228-235.
8. Zhang T, Otevrel T, Gao ZQ, *et al.* Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 8664-8667. 30

【 0 3 3 7】

【化 3 2】

9. Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AMC. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 1572-1577.
10. Mann B, Gelos M, Siedow A, *et al.* Target genes of beta-catenin-T cell-factor lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 1603-1608
11. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 2001; **12**: 469-476. 10
12. Wielenga VJM, Smits R, Korinek V, *et al.* Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 1999; **154**: 515-523
13. Boon EMI, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase Met in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 5126-5128. 20
14. Kim JS, Crooks H, Dracheva T, *et al.* Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 2744-2748.
15. Leow CC, Romero MS, Ross S, Polakis P, Gao WQ. Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 6050-6057.
16. Battle E, Henderson JT, Beghtel H, *et al.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell* 2002; **111**: 251-263. 30
17. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, *et al.* SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004; **166**: 37-47.
18. Zhang XB, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; **61**: 6050-6054. 40
19. DeAlmeida, VL., Miao L, Ernst JA, Koeppen H., Polakis P., Rubinfeld, B, The soluble Wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo, *Cancer Res* 2007; **67**: 5371-5379.

【 図 6 D 】

sFp3 (FzB) (NP_001454) (配列番号 13)
WYGSFGWLLIAGLILALILALVPGARAAACEPRFIPLCISLPNNVTEPHLHSTQANAILAEIOFELLGTHCSFDLLFLCQNYAPICITDFOHEIRP
CASVCERAGQCEFLIKTRISHPENLACELPIYDVGCLSPFALVTRDQADPHDSNSGKRGASERCKCKPDTQXTITFRNNYVYTRAKVREIKYTKCHDVT
AVVEVEIKLSSEWIPRUTVNLVYSSGGCLPLNINVEYILNIGYEDERSKLLLVESIAEKMDKRGKVRKMDKRLHGLSGKSSSDSSVSQSGNSNFR
QARN

sFp4 (NP_003005) (配列番号 14)
MFSLTVALCLMLALVGRGACAVRIPCHRHFWPIITRMPNHLHSTQENAILAEIOVEELVNVCSAVLFFFCAMYAPICITLETHDIPKPSYQORARD
CEPLAKYHNHVESLACDEPIYDVTDLDEVDKWDITPDNVTQRELDVDRQVSCFVCLSPFALVTRDQADPHDSNSGKRGASERCKCKPDTQXTITFRNNYVYTRAKVREIKYTKCHDVT
TTVVDVEIKFSSESTFVFPVLTINSQCOPHILPHQDVLLCYEWSNRHMLLENCIVEMKRDQSKRSIQNEERLQORVODKKTAGTSGNSNFPFKGRPP
AFPEASFKNIKTRSAQKTNPKY

sFp5 (NP_003006) (配列番号 15)
MRAASAGVTTAALLAALLGALHWAAPCEYDYWGQARPLHGRYSKPPQCLDIPADILPCHTVGVKRNPLNLEHSLARVKQKASWLPILAKRCHSDTQVP
LCSLFAVCLDREPITYCSSLCEAVPACQAPLEAVGFPWPEMLHCKPFLDNDLCIAVOFGLPAPAPPKTKCAOCENHSADGLAEOMCSDDVVKRIKEIKIE
NDRKLGIAQKKEKLLFEPFKKHQTRFLVYHKNAGCPCQLDLSAGSLVWEGKVDQGLLHAYVHWKSNKMEFAKHESIPCSLYTPFFYFGAEPH

FIG. 6D

Ror1 (NP_005003) (配列番号 16)
MHRPRRGRTPPLAALLAALLGALHWAAPCEYDYWGQARPLHGRYSKPPQCLDIPADILPCHTVGVKRNPLNLEHSLARVKQKASWLPILAKRCHSDTQVP
LCSLFAVCLDREPITYCSSLCEAVPACQAPLEAVGFPWPEMLHCKPFLDNDLCIAVOFGLPAPAPPKTKCAOCENHSADGLAEOMCSDDVVKRIKEIKIE
NDRKLGIAQKKEKLLFEPFKKHQTRFLVYHKNAGCPCQLDLSAGSLVWEGKVDQGLLHAYVHWKSNKMEFAKHESIPCSLYTPFFYFGAEPH

Ror2 (NP_004551) (配列番号 17)
MARGSALPARELLCIPAWAARALLSVSTSGEVTEVLDPDLQPLDGGDGPITPLKGVFLNPLEPNNITVGGTALLHCKVANPPNPNVWLNKDAFTVOEPR
RLIKRTEIGSRLAQDLDPDGVQVATNGAKTIPATGVLFLQPSHPNNFQDDHEDGCPQPIGILACAPFIGNRTYVUSLQKGELENRIATAPTHLG
TSILHSDQCSQAPALFSTCHFTFCDAKATFRELCECTVSDLCRTEITLARGSNFLILRDLQKCALPSPSPDANCKRIGFAPRLGRITGCTGSG
MDTRGATSKGQCQVWALQPHSHHLSSTDFELGGGHAYCRNFGQGGWCTQNNVNRMLCQVFCSPDSSKSGILILVPSIAIPVIACTFLFYGC
RNRKASATPQRQLASFSQDMEMPLINQKQAKETLSLSAVNFEELGEDARFGYVHGLGFAGGEQCAVAKITLDAKESPLREFRHEALRLAQFN
VYCLLVYTKDPLSNITFSYCHSGLHEFLVWRFSVDSGSDDDRTVYSKALEPDPVHLVAGIAGHEYLSLHHVHDLATNVLVYDLNVLKISDLGLFREYA
ADYIKLLGSLPLFINNAPEALWIKFISDSDINSGYVLMWVFSYGLQYGSNQGVEMRNROVLPCTDCCPAMYALACNWFNFTSRFRFKDHSRLAM
GNLSNYSATSGASNTTSSLSSTFSVSNVSNARYGPKAPFPQPTIPKGGIIRPMVFPFQYVFNQVQVPAVGAIPNFYVQVPMQAFQOVFPQV
PKTSSHSGSGSTSGVYTTASNTSADRAALLSEGADTQNPEDGAQSTQAEAEESGSPETELLGDCLQVDEAQVLEA

FIG. 6E

【 図 7 A 】

Fz1-Fc (配列番号 76)
MGSTARLGAVLITFVIVGLHGVGKIDARGSGAGGARGRPVDRRLARQLILLMLLEBAILLIGVRAQAGQGGGAGGQRPDPCCQSGQYNGRAGLIV
EDHSGQELISLCLDIAHQNLKTHMLLGHTRQDAGLGVHQFFFLVYQCSALKEFLICSNIAVYVLEQAQLFCSLGRAGQCEALAKRGEFGWFDLCEK
FVHAGELICVGGNTQAKAGDAVTDAAARSTICHPATHELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz2-Fc (配列番号 77)
MGSTARLGAVLITFVIVGLHGVGKIDARGQHEGKGLSIPDHGQCPISLPLCTDIANNCTMENLGHVQDAGLEVHQFPYPIWYQCSPELRLCNSKAP
VCTVLEALFCSLCEAGQCEALAKRGEFGWFDLCEK
FVHAGELICVGGNTQAKAGDAVTDAAARSTICHPATHELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz3-Fc (配列番号 78)
MGSTARLGAVLITFVIVGLHGVGKIDARGISLFCSEPIELRWQQLPVNTTWMENLHNYDQCTAALMEFPHMNLDSRDFPLCALVASIQMEYGVTLIP
KICORAVSCLMLNMGFVNMELNCRPEPDLNIDLGAAVTDAAARSTICPPCAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz4-Fc (配列番号 79)
MGSTARLGAVLITFVIVGLHGVGKIDARGTDEEPRCPDIRSMQNLGNVTMENLVGHLEQDIAELQTTPPLIQVCSQLOFLICSVYVNMCTEKINI
PIGCGMCLSVKARCEVFLKPEFMEPESLNCRFPQDNDHNMCEGDEGSAQTDAAARSTICPPCAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz5-Fc (配列番号 75)
MGSTARLGAVLITFVIVGLHGVGKIDARGAKSAVQCEITVPCSGIGYVNLTHENQFHNDQDAELVHQFHWFLVEIQCSPELRFELCSWYTPCLIPVYHKL
PSCVCRKAGCSPLDQVGEAMPENSCRPLVLDGAAVTDAAARSTICPPCAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

FIG. 7A

【 図 7 B 】

Fz6-Fc (配列番号 80)
MNPTEFLQCELEPLLRGSLTTCETIYPCWMAVNMCTFENLMGHVDSIAVBSHREPLANLECSNTEFLCAVFTCEQLHVTFCRKLCEKCYSDCK
KALDPLNFELESCRLQICDSTVFVTTLSGGGGTCACTHCTCPAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz7-Fc (配列番号 81)
MRDPAAPLISLIGLCAIVALLGALSAGAQPYHSGISVFDHGFQCPISIPLOTDIAYNOTILPMLHGTNQDAGLEVHQFPYPLVYQCSPELRLCNSKAP
PVCVTIDQATPCPSLGRAGCEALNNHFRQWFERLNCNFPVHGAGRICVQNTSDLSGSGSVTDKHTCPCPAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz8-Fc (配列番号 74)
MENGTELEVLSLLAALVLRSGAASAKSLAQCTVPICKSGVNTVMPNQFNHDTQDAGLEVHQFHWFLVEIQCSPELRFELCSWYTPCLISDYKKLPPC
PSVCRKAGCALMRQVGEAMPENSCRPLVLDGAAVTDAAARSTICPPCAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz9-Fc (配列番号 82)
MVALELGAALLMLAAGGALEIGREDPERGGAAPQAVETPMCRGELGVNLTMPNLHGTQDAAGLEVHQFHWFLVEIQCSPELRFELCSWYTPCLISDYKKLPPC
IPACRMEQALRCAPLNGQVFNWSPDLCAALPTNDPHALCMAFENALLESSEGSVTDKHTCPCPAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

Fz10-Fc (配列番号 83)
MQDRPPLHVLVQWGSAAALSSMDMEAPDGKQPIETPMKQDIGNMTMPNLHGTQDAAGLEVHQFHWFLVEIQCSPELRFELCSWYTPCLISDYKKLPPC
VMCEARLKCSPEHMQFNKPKPSLDRKTRPKNRDNPVLCMAFNNKSGLESSEGSVTDKHTCPCPAPPELLGGSVFLFPFKDITLMSRTPEVTCVVDVSHGDEYVNMVYDGVGVNANKVAPREEDYNS
TRVYVSVYVHLQWLNKGYCKVYKNAKLPAPLEKTTISAKGQPREFQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFTSDIAVENWESNGQPENNYKTTTPEVLDGSGFT
LYSKLTVDKSRWQGNVFCSTMEALHNHYTKSLSLSFGK

FIG. 7B

【図 7 C】

sFRP1-Fc (配列番号 84)
MSIGSGGGAGAGALGVLLAGALLAVGASAEVDVVSQSLGPGQSGREYFKFCQVDIDPADLRLCHVGVKVMKLPNLLSHETNAKVKQASSWFLLKNCIA
GTVFLCSLFAFVCLDR2YFCNMLCEAVSDSCFVWDFGFWFMILKCFKFGVGVCIAMFPAFNAWMAEATDGAASSTLCPCPAPELLGGSVFLFFFPFADTL
MSRTAEVTVVVDVSHEDDEVENNAKTKPREQYNTSTVVSIVLVHQLMANGKGYKCVSNKALPAPIKTIISAKGQPREFQVYTLISAKGQPREFQVYTLISAKGQ
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSTFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP2-Fc (配列番号 85)
MLQSGSLLILFLASHCCLSGARGLEFGQPDFSYRSNCKEIPANLQLCHGEYQNMKSLPNLLGHETWKEVLEQAGAWIDLVKQCHPDPTKKFLGSLFAFVCLDOL
DETQPCSHSLCVQKURCAFWAGAFGEWFDMLBCDPRFPONDICIPASSDHRGAQVDMAAASTLCPCPAPELLGGSVFLFFFPFADTLMSRTAEVTVVVDV
VSHEDDEVATVWVDGVGVENNAKTKPREQYNTSTVVSIVLVHQLMANGKGYKCVSNKALPAPIKTIISAKGQPREFQVYTLISAKGQPREFQVYTLISAKGQ
YESDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSTFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP3-Fc (配列番号 86)
MGSTAAKLGAVLVIVGLHGVGKIDAGACAEVNAFLQKSLPNNMTNPNLHSTQENALIAEQVEVLVNGSAVIRFFCAMYAPICTLSEFLHDPFKESVVCQARAD
KSVCEARQCEPTLLIKVRSWPNELAEELVVDVSGVCSIEPAIVGVNAGVSTLCPFAPELLGGSVFLFFFPFADTLMSRTAEVTVVVDVSHEDDEVATVW
EYAFNMYVDGVGVENNAKTKPREQYNTSTVVSIVLVHQLMANGKGYKCVSNKALPAPIKTIISAKGQPREFQVYTLISAKGQPREFQVYTLISAKGQPRE
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSTFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP4-Fc (配列番号 87)
MELSLVALCLMLHLALGVGAPCAEVAIPGCRMRNMTNPNLHSTQENALIAEQVEVLVNGSAVIRFFCAMYAPICTLSEFLHDPFKESVVCQARAD
CEFLMKNHNSWESLACDELVTYDSGYCSIEPAIVGVNAGVSTLCPFAPELLGGSVFLFFFPFADTLMSRTAEVTVVVDVSHEDDEVATVWVVDG
VEVNAKTKPREQYNTSTVVSIVLVHQLMANGKGYKCVSNKALPAPIKTIISAKGQPREFQVYTLISAKGQPREFQVYTLISAKGQPREFQVYTLISAKGQ
ANNYKTTTPVLDSDGSSTFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP5-Fc (配列番号 88)
MRAAAGGVTAALALLGALHWAFAECEDYGVQWAEFLHGKSYSKFQCCLDIPADLFLCHTVGVKMLPNLLSHESLAEVYQASSMFLIANKGCHSDQV
LCSLFAFVCLDR2YFCNMLCEAVSDSCFVWDFGFWFMILKCFKFGVGVCIAMFPAFNAWMAEATDGAASSTLCPCPAPELLGGSVFLFFFPFADTLMS
TPEVTVVVDVSHEDDEVATVWVDGVGVENNAKTKPREQYNTSTVVSIVLVHQLMANGKGYKCVSNKALPAPIKTIISAKGQPREFQVYTLISAKGQPREFQVYTLISAKGQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSTFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7C

【図 8】

Frz1
SVPHHGQSPSTPCHDPAKATIDNLLCHNQENHGVVIDVNVVYQSAEHRPFLCHVAG
Frz2
SLDHSGLDPSSTPCHDPAKATIDNLLCHNQENHGVVIDVNVVYQSAEHRPFLCHVAG
Frz7
SVPHHGQSPSTPCHDPAKATIDNLLCHNQENHGVVIDVNVVYQSAEHRPFLCHVAG
Frz5
KASKAPVCSSTTPVLCGGGCTIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Frz8
ASAKELACSSTTPVLCGGGCTIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Frz9
RGRGALCVAVTFHPCGGGCTIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Frz10
ERGGGKCPLETPHPCGGGCTIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Frz4
GDERRECDPTFSLGQNTQNTIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Frz3
GHSISFSCPTTRCCDDLPATIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Frz6
KHSISFSCPTTRCCDDLPATIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Cons.GPI.P.E.DIGI.I.A.M.LLC.I..SLEVRQ.IV..QSP.LRTFLCSNTA
Frz1
VGVVSE-LIIEGSLSE-ALNOCGLANKSGHIDPDKLGVVAG--SGH--QNTTSDK
Frz2
VGVVSE-LIIEGSLSE-ALNOCGLANKSGHIDPDKLGVVAG--SGH--QNTTSDK
Frz7
VGVVSE-LIIEGSLSE-ALNOCGLANKSGHIDPDKLGVVAG--SGH--QNTTSDK
Frz5
ICIPNNHNPCHGCHRAKACCFPMQVQGFAPFPMSCNRPVIGLDAEVLQNTHTDL
Frz8
ICIPNNHNPCHGCHRAKACCFPMQVQGFAPFPMSCNRPVIGLDAEVLQNTHTDL
Frz9
KCDKSTVTPACGCGAKICAPTMQVQGFAPFPMSCNRPVIGLDAEVLQNTHTDL
Frz10
KCDKSTVTPACGCGAKICAPTMQVQGFAPFPMSCNRPVIGLDAEVLQNTHTDL
Frz4
KCEKINIFICGCGSVKRCGFVLKEFGAFESNKFPPON--DINIMQCHGDEE
Frz3
ICIPNNHNPCHGCHRAKACCFPMQVQGFAPFPMSCNRPVIGLDAEVLQNTHTDL
Frz6
KHSISFSCPTTRCCDDLPATIDHMRPFHEDDRAEVEVQVETLQCSPPDRFLCHVAG
Cons. .S.PIPPS.E.AK.G.PAR..FG..L.L..G.....L..H....

FIG. 8

【図 9】

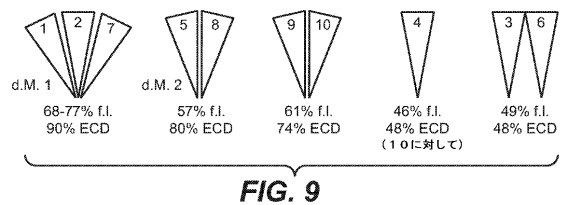


FIG. 9

【図 10】

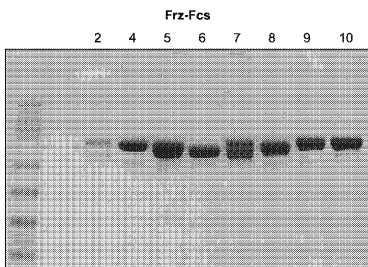


FIG. 10

【図 11 A】

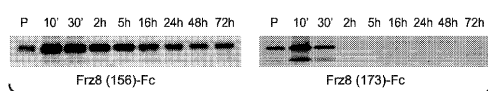


FIG. 11A

【図 11 B】

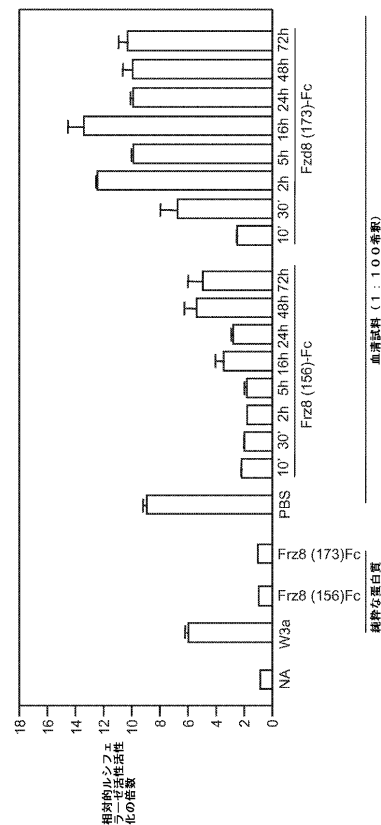
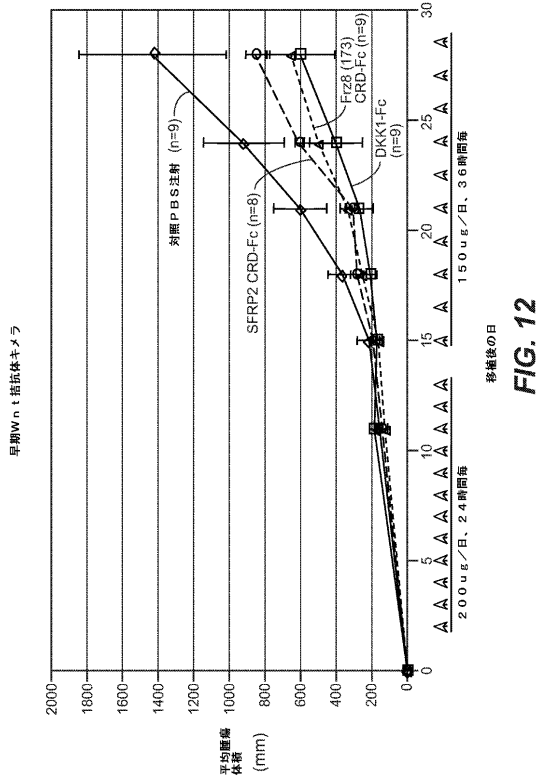
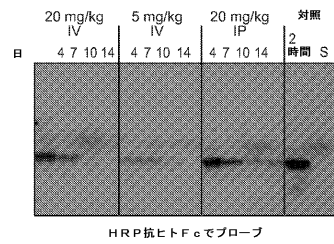


FIG. 11B

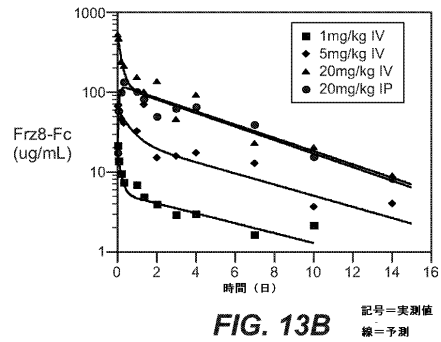
【図 1 2】



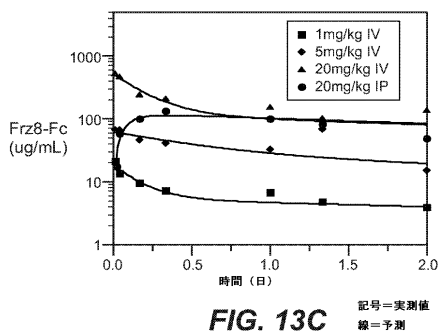
【図 1 3 A】



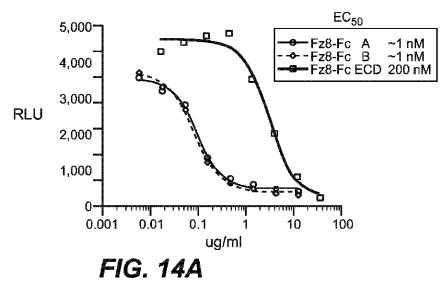
【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【図 1 4 A】

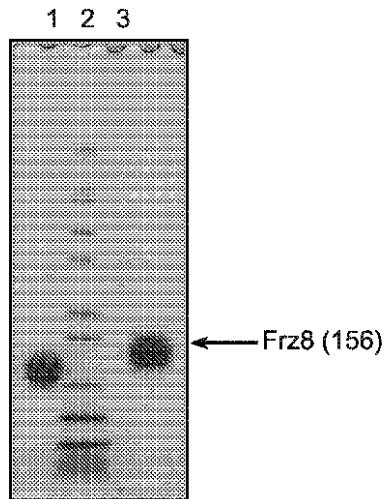


【図 1 3 D】

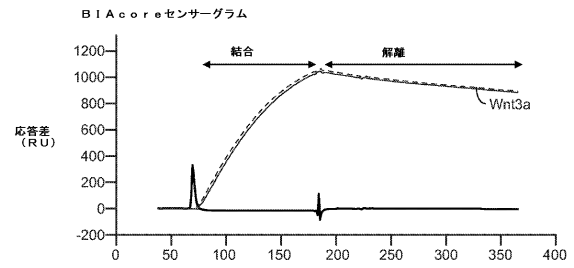
	Frz8-Fc 1mg/kg IV	Frz8-Fc 5mg/kg IV	Frz8-Fc 20mg/kg IV	Frz8-Fc 20mg/kg IP
AUC (日 * ug/mL)	39.7	179	687	633
CL or CL/F (mL/日 / kg)	25.2	28.0	29.1	31.6
Alpha HL (時間)	2.76	10.0	3.29	
T1/2 (日)	4.86	4.32	3.52	3.62
Tmax (時間)				8.38
Cmax (ug/mL)	18.3	62.4	515	113
V1 (mL/kg)	54.6	80.1	38.8	
Vssまたは V/F (mL/kg)	167	154	133	165

FIG. 13D

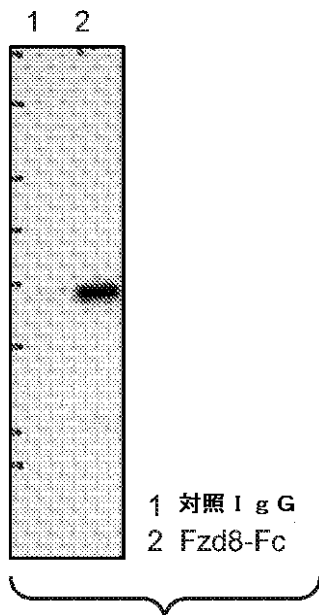
【図 14 B】

**FIG. 14B**

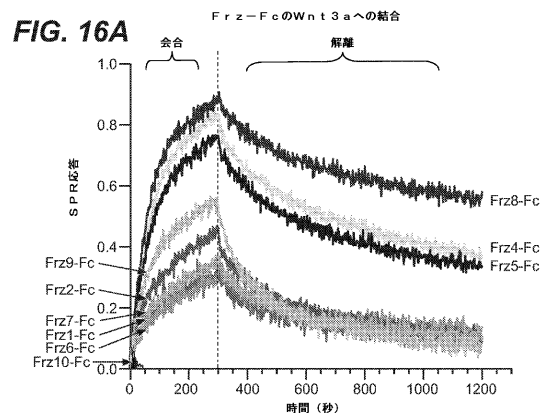
【図 15 A】

**FIG. 15A**

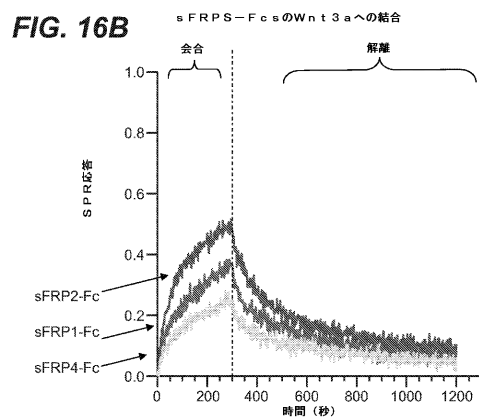
【図 15 B】

**FIG. 15B**

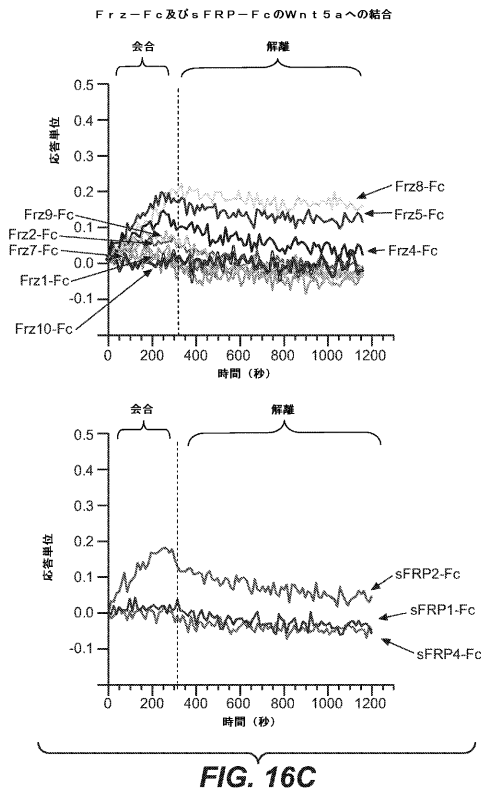
【図 16 A】



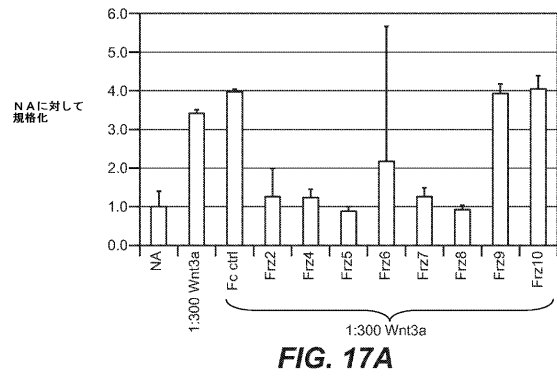
【図 16 B】



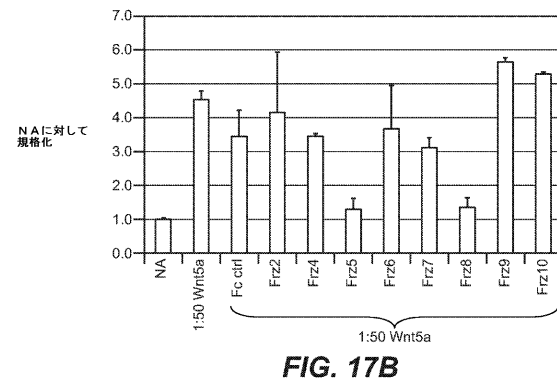
【図 16 C】



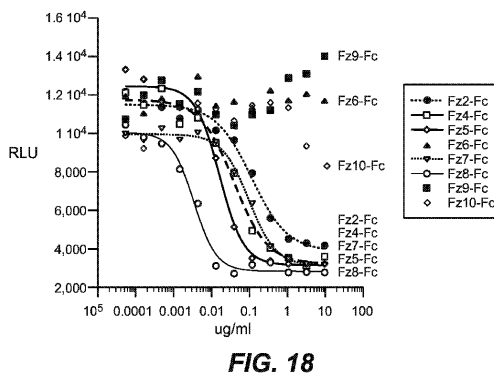
【図 17 A】



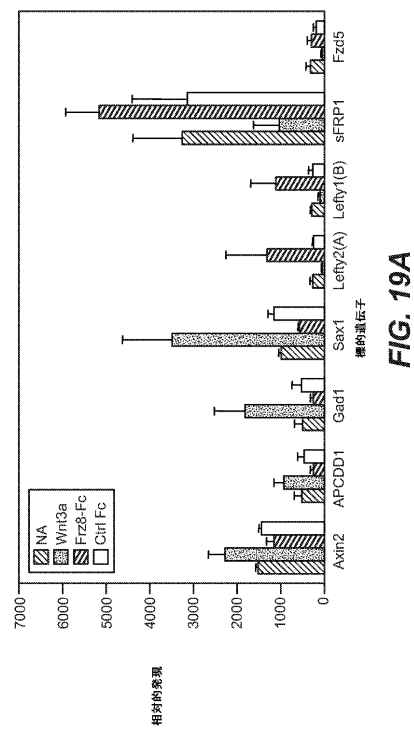
【図 17 B】



【図 18】



【図 19 A】



【 図 1 9 B 】

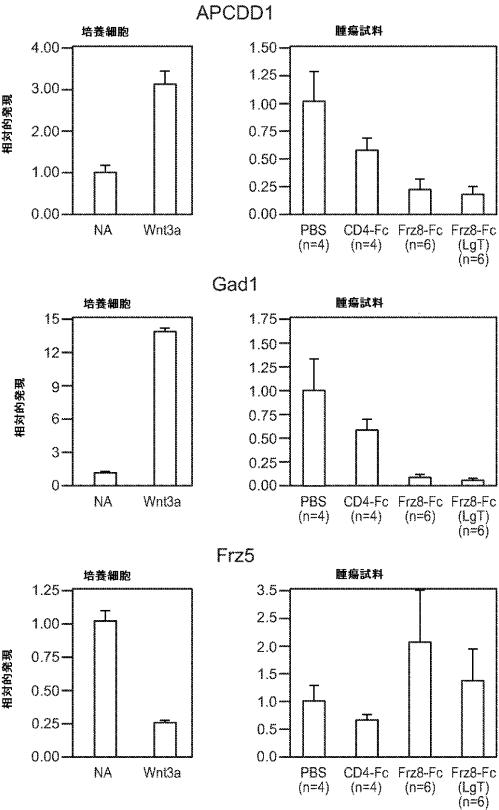


FIG. 19B

【 図 2 1 】

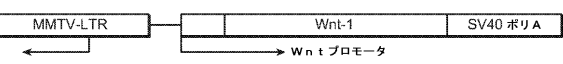


FIG. 21

【 図 2 0 】

遺伝子名	アクセッション番号	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ配列
Lefty1 (B)	NM_020997	CTAAGGACCTTACATGTGAGATG (配列番号 88)	ACAGGACAGTAAACATGACACA (配列番号 90)	AACCTGAGGCGAGAAAGCCAA (配列番号 91)
Lefty2 (A)	NM_003240	TTCCACACATGCTTTAGAGAACTT (配列番号 92)	TTCTGATATCTCATTCATTT (配列番号 93)	AAACATGCAATACATGCTGTTT CTGGTGAC (配列番号 94)
Gad1	NM_000817	TGACTCGCTTAGCTGAAACCT (配列番号 95)	TGAGCTGTGCTCATTTATCTGA (配列番号 96)	TCAGAGGCTCTCGGAAATGTTG CCT (配列番号 97)
APCDD1	NM_153000	TGTGTTGCAGCTGCTCT (配列番号 98)	AACCACTCTGCTTGGATTTC (配列番号 99)	CCCTTGAATTTCTTTTACTCTCT CAGTTTATATATCTG (配列番号 100)
Axin2	NM_004655	CTCCGTGTGTCGCTAT (配列番号 101)	CATGACAAAAGTCATTTGATACA AGA (配列番号 102)	TTGAGGCTCAAGCTTCCCTGT (配列番号 103)
Sex1	XM_372331	GAACCTCGCTGCTCTCT (配列番号 104)	ACTTGGTCTCGATTCTG (配列番号 105)	AGCTTCACGAGACGAGTTC (配列番号 106)
Fzd5	NM_003468	GGCAACAATTTACCTTTCCTT (配列番号 107)	GAACCAAGTGAAGTTCATTACA (配列番号 108)	CGCCAACTTAGGATTTAAGCC (配列番号 109)
sFRP1	NM_003012	CAGATACAGGACATGATGA (配列番号 110)	CAAGCTTTTGTAGAGACTTAG GAT (配列番号 111)	CCGTTTCTCTAGTTCTTCTG TAGTACTCTCT (配列番号 112)

FIG. 20

【 図 2 2 A 】

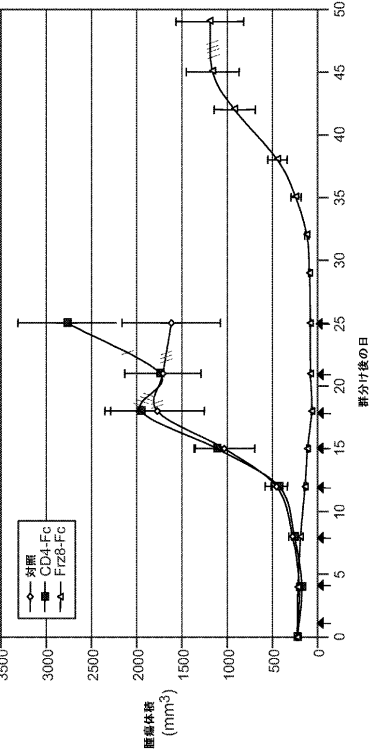


FIG. 22A

【図 2 2 B】

平均腫瘍体積						
日	PBS ip		CD4 ip		Frz ip	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	225.93	9.61	226.89	9.64	226.91	10.43
4	204.15	14.75	175.55	16.55	219.03	15.48
7	277.53	43.16	259.37	25.02	191.11	29.50
11	457.82	122.93	429.21	85.56	140.81	11.93
14	1031.84	333.62	1112.39	238.44	113.56	12.62
18	1767.01	513.69	1935.97	404.77	67.31	7.48

腫瘍体積の平均の変化率 (%)						
日	PBS ip		CD4 ip		Frz ip	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
4	-8.07	7.36	-22.91	5.76	-3.66	4.79
7	28.57	23.12	14.51	10.51	-16.76	11.34
11	116.03	61.46	90.58	41.23	-37.28	5.31
14	396.12	165.30	388.61	105.48	-49.84	5.25
18	736.95	252.59	766.50	189.04	-69.67	3.51

FIG. 22B

【図 2 3 A】

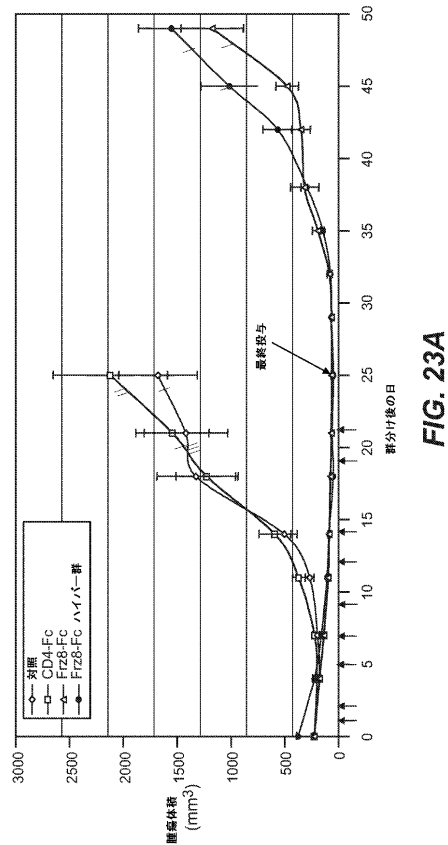


FIG. 23A

【図 2 3 B】

平均腫瘍体積								
日	PBS iv		CD4 iv		Frz iv		Frz iv 高い群	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	225.77	10.49	225.61	10.09	225.95	9.97	376.03	13.90
4	181.27	12.97	202.13	13.68	178.60	10.86	225.50	16.47
7	196.93	16.02	224.70	18.96	137.38	7.15	161.01	10.29
11	268.38	41.88	371.32	62.94	97.76	11.03	107.32	7.90
14	504.20	122.01	592.14	161.73	89.54	10.45	88.39	8.27
18	1324.53	381.24	1224.00	315.88	73.27	7.01	52.66	7.52

腫瘍体積の平均の変化率 (%)								
日	PBS iv		CD4 iv		Frz iv		Frz iv 高い群	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
4	-19.75	4.49	-9.94	5.18	-20.97	3.31	-39.19	5.19
7	-12.72	6.13	3.06	11.85	-38.25	3.92	-56.90	2.88
11	16.07	15.71	71.13	30.63	-57.08	4.51	-71.22	2.23
14	110.70	45.68	177.25	75.09	-60.25	4.63	-76.15	2.15
18	440.18	143.18	477.62	150.60	-67.10	3.14	-85.64	2.17

FIG. 23B

【図 2 4 A】

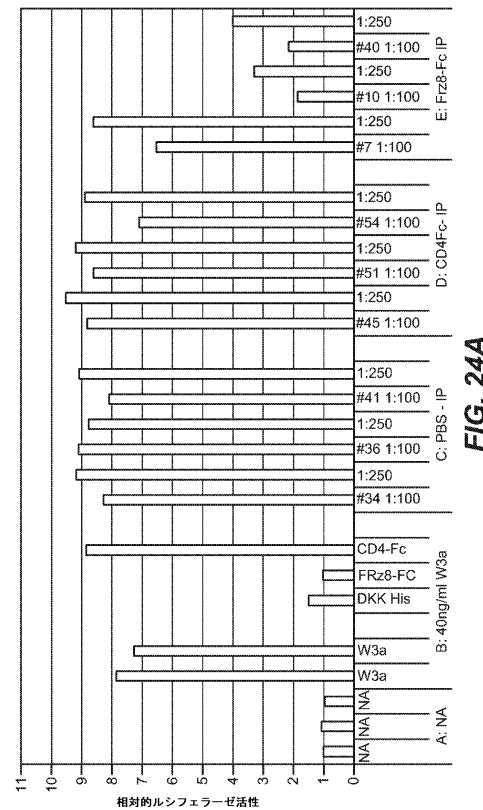
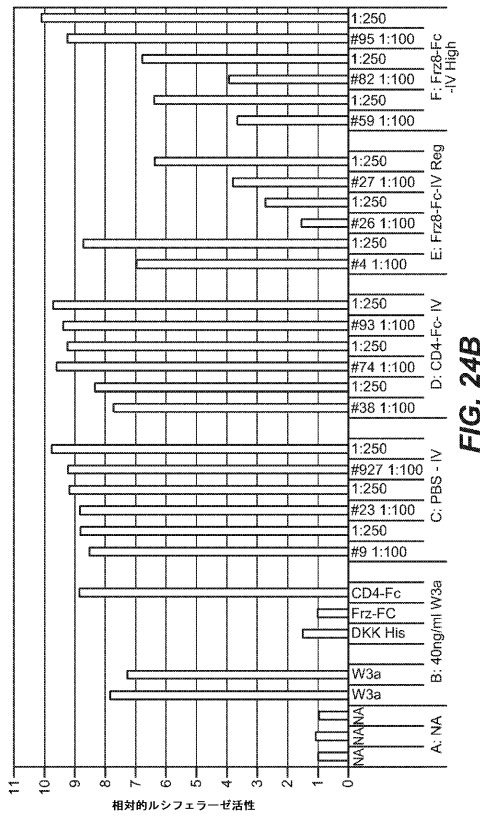
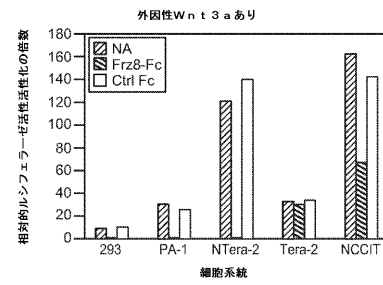
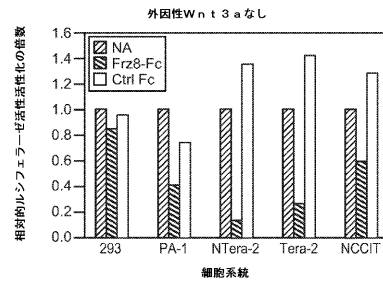


FIG. 24A

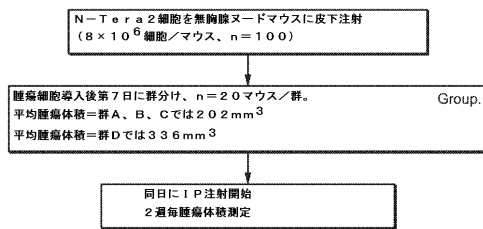
【図 24B】



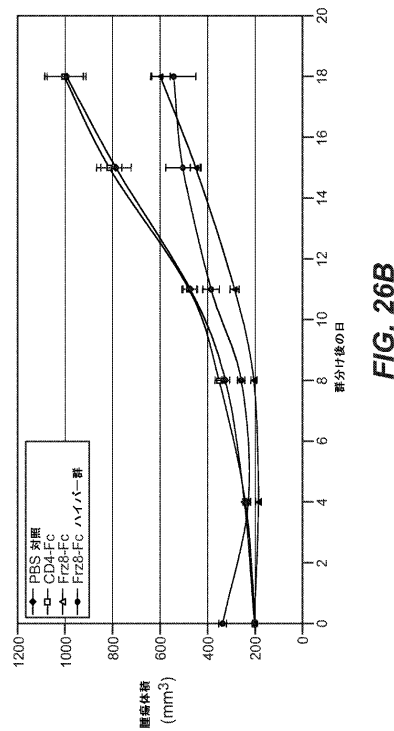
【図 25】



【図 26A】



【図 26B】



【図 2 6 C】

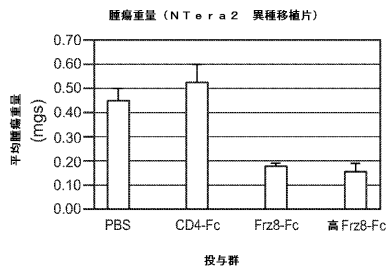


FIG. 26C

【図 2 6 D】

平均腫瘍体積

日	A-PBS		B-CD4		C-Frz8d8		D-Frz8d8 Hi	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	201.87	4.77	201.47	4.71	201.25	4.55	336.13	16.41
4	244.09	8.03	240.31	11.73	193.57	7.70	228.07	9.67
8	324.51	17.62	340.32	17.84	220.08	11.21	258.18	15.24
11	472.56	30.40	460.39	32.42	278.11	16.03	384.99	35.34
15	785.50	64.09	785.44	56.64	439.92	19.18	503.53	72.39
18	993.47	81.81	968.94	82.53	591.65	29.83	541.90	92.76

FIG. 26D

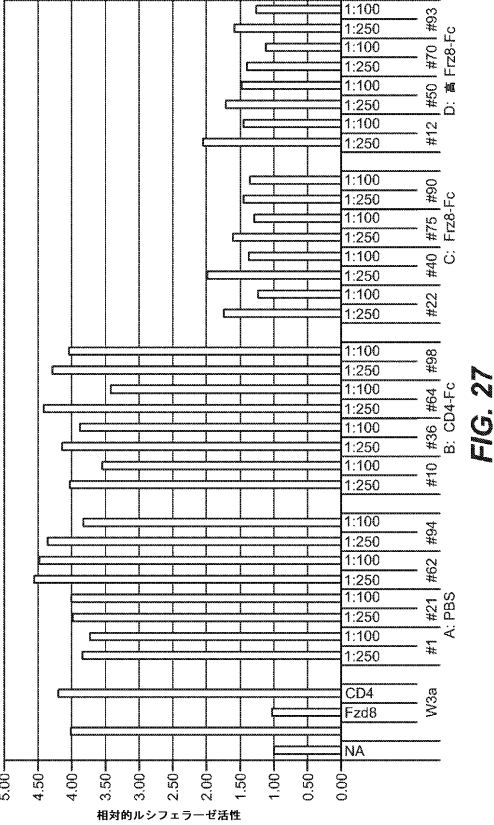
【図 2 6 E】

腫瘍体積の平均の変化率 (%)

日	A-PBS		B-CD4		C-Frz8d8		高 D-Frz8d8	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
4	21.73	4.17	20.27	6.24	-3.01	4.42	-30.82	4.37
8	62.19	9.63	71.92	10.91	9.84	5.71	-21.16	6.81
11	136.08	16.35	131.68	17.58	38.88	8.53	14.16	8.50
15	293.50	34.54	295.91	30.72	119.74	10.17	48.53	18.47
18	398.22	46.14	387.96	44.41	195.07	40.24	58.76	25.38

FIG. 26E

【図 2 7】



【図 2 8 A】

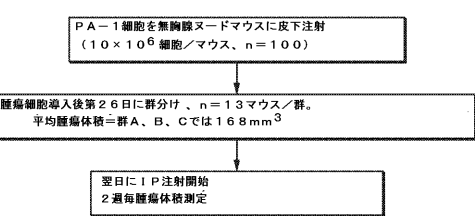
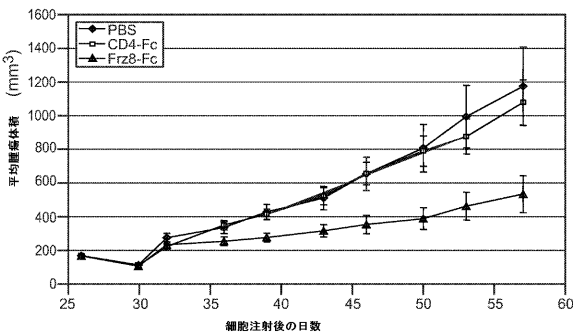


FIG. 28A

【図 2 8 B】



【図 28C】

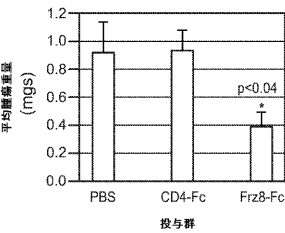


FIG. 28C

【図 28D】

平均腫瘍体重						
日	A-PBS		B-CD4		C-Frz8-Fc	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
26	167.5	9.6	167.8	9.6	167.2	9.1
30	113.4	12.0	110.6	8.9	106.5	10.5
32	273.5	26.5	221.8	16.4	232.5	18.4
36	334.4	35.0	349.4	27.5	253.4	25.9
39	426.1	46.0	413.0	30.5	275.3	26.5
43	508.3	68.3	520.2	50.6	314.4	37.0
46	652.4	98.9	653.8	65.9	352.7	54.5
50	803.5	140.7	786.3	90.3	387.2	64.7
53	989.8	184.9	872.4	102.9	460.9	81.8
57	1170.0	232.2	1074.1	134.0	531.8	109.1

FIG. 28D

【図 28E】

腫瘍体積の平均の変化率 (%)						
日	A-PBS		B-CD4		C-Frz8-Fc	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
30	-33.5	5.3	-34.3	3.6	-37.4	3.5
32	61.5	11.6	32.6	7.7	38.7	6.3
36	96.8	16.2	108.8	12.6	49.1	9.5
39	152.5	22.6	155.4	18.4	62.7	10.0
43	197.7	35.1	223.2	32.2	84.9	14.4
46	279.9	50.8	304.0	38.7	104.6	22.2
50	363.8	68.8	385.7	52.6	123.2	28.7
53	476.1	96.8	443.3	61.1	164.8	35.5
57	579.2	121.2	562.7	72.6	203.1	49.2

FIG. 28E

【図 29】

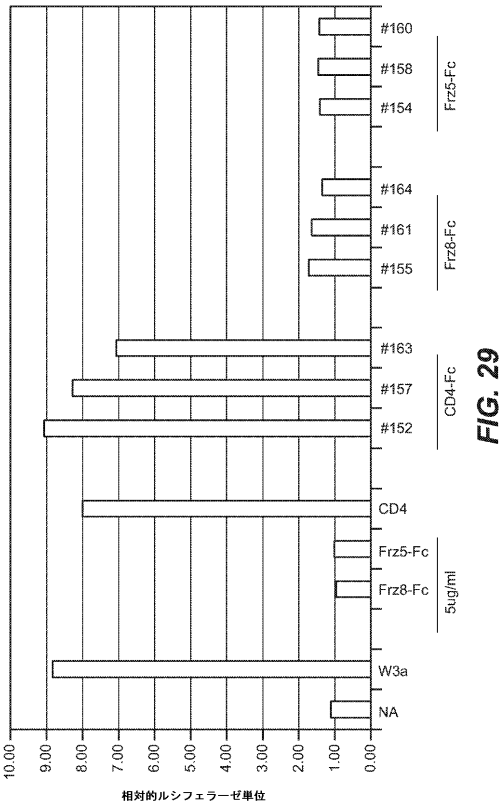


FIG. 29

【図 30】

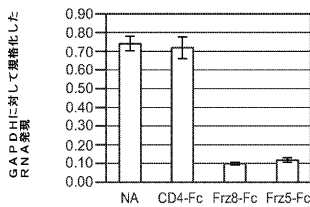


FIG. 30A

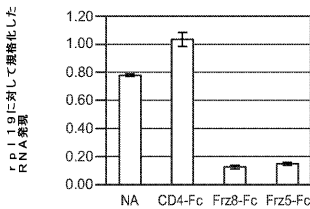
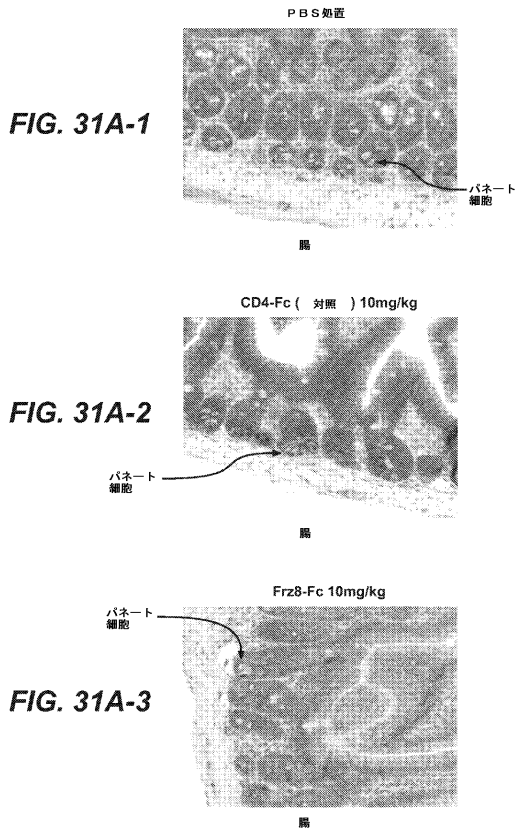
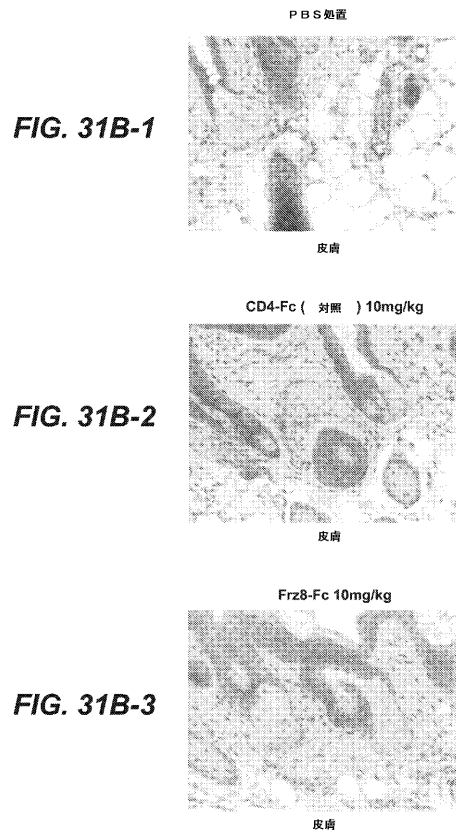


FIG. 30B

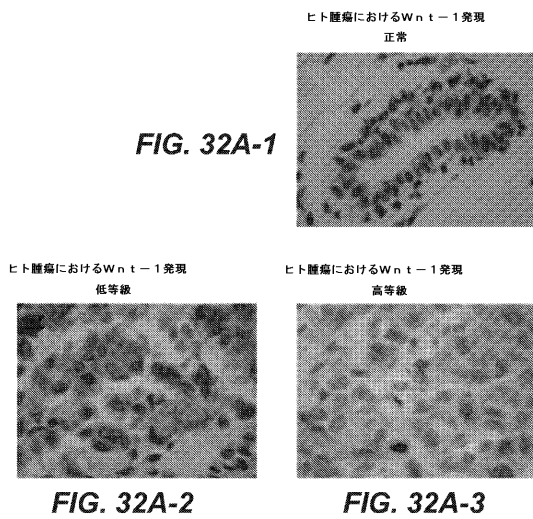
【図 3 1 A】



【図 3 1 B】

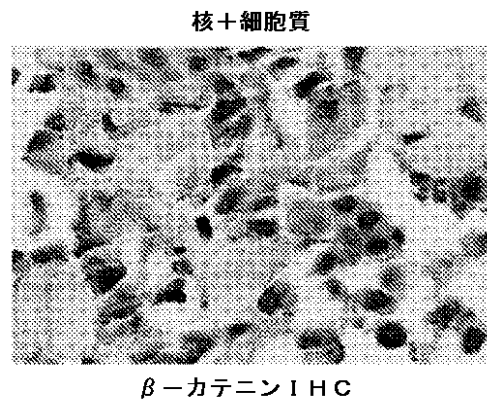


【図 3 2 A】



【図 3 2 B 1】

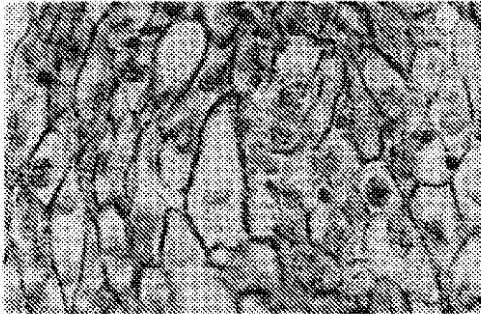
乳癌患者における β -カテニンの
核及び細胞質局在化

**FIG. 32B-1**

【図 3 2 B 2】

乳癌患者における β -カテニンの核及び細胞質局在化

原形質膜



β -カテニン IHC

FIG. 32B-2

【図 3 2 B 3】

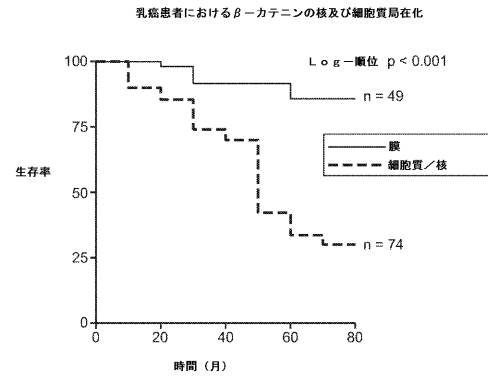
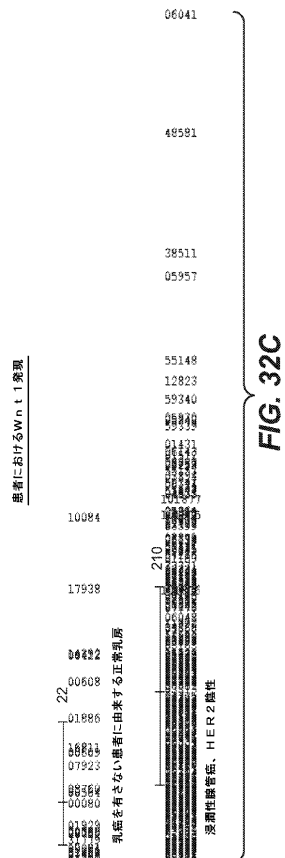


FIG. 32B-3

【図 3 2 C】



【配列表】

2010504081000001.app

【国際調査報告】

60900380010



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/077845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17 C07K14/705 C12N15/62 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POLAKIS PAUL: "Evidence for Wnt Signaling in Cancers lacking Genetic Defects" THERAPEUTIC OPPORTUNITIES OF THE WNT SIGNALING PATHWAY IN CANCER, 25 October 2005 (2005-10-25), pages 1-54, XP002492938 NYAS eBriefings Online Adobe Flash Presentation Retrieved from the Internet: URL: http://www.nyas.org/ebriefreps/ebrief/000541/presentations/polakis/player.html> [retrieved on 2008-08-21] Slides 39-53 ----- -/--	1-5, 8, 11, 13-51

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May 2009

Date of mailing of the international search report

15. 05. 2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentsaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Camilleri, Alain
22. 7. 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2007/077845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	[Online] 20 March 2006 (2006-03-20), XP002492787 R&D Systems Product sheet of Recombinant Mouse Frizzled-1/Fc Chimera Retrieved from the Internet: URL: http://www.rndsystems.com/pdf/1120-FZ.pdf pdf> [retrieved on 2008-08-11]	1-5,8, 11, 13-18, 20-23
Y	the whole document	1-5,8, 11,13-51
X	----- BLUMENTHAL ANTJE ET AL: "The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation." BLOOD 1 AUG 2006, vol. 108, no. 3, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 965-973, XP002520353 ISSN: 0006-4971	1-5,8, 11, 13-18, 20-23
Y	page 966, left-hand column, paragraph 4 page 969, left-hand column, paragraph 2	1-5,8, 11,13-51
X	----- YAMASHITA JUN K ET AL: "Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction" FASEB JOURNAL, vol. 19, no. 9, July 2005 (2005-07), XP002520354 ISSN: 0892-6638 Retrieved from the Internet: URL: http://www.fasebj.org/cgi/reprint/04-3540fjev1.pdf	1-5,8, 11, 13-18, 20-23
Y	abstract	1-5,8, 11,13-51
Y	page 3, paragraph 2 ----- HOLCOMBE R F ET AL: "Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma." MOLECULAR PATHOLOGY : MP AUG 2002, vol. 55, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 220-226, XP002492379 ISSN: 1366-8714 abstract page 224, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column page 225, left-hand column ----- -/-	1-5,8, 11,13-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/077845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MILOVANOVIC TATJANA ET AL: "Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY NOV 2004, vol. 25, no. 5, November 2004 (2004-11), pages 1337-1342, XP009104591 ISSN: 1019-6439 page 1337, right-hand column, paragraph 3 page 1338, left-hand column, paragraph 1 page 1338, right-hand column, paragraph 4 page 1340, left-hand column, paragraph 1 -----	1-5,8, 11,13-51
Y	NAKAMURA T ET AL: "A Wnt- and beta-catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 100, no. 10, 13 May 2003 (2003-05-13), pages 5834-5839, XP002366594 ISSN: 0027-8424 abstract page 5835, left-hand column, paragraph 1 page 5836, left-hand column; figure 2 page 5837, left-hand column -----	1-5,8, 11,13-51
Y	US 2004/247593 A1 (HE BIAO [US] ET AL) 9 December 2004 (2004-12-09) pages 1-2, paragraph 8-12 sequence 31 examples 1-8 claim 7 -----	1-5,8, 11,13-51
Y	WO 2004/032838 A (UNIV CALIFORNIA [US]; HE BIAO [US]; YOU LIANG [US]; XU ZHIDONG [US]; J) 22 April 2004 (2004-04-22) claim 7 sequence 35 -----	1-5,8, 11,13-51
Y	WO 2006/036173 A (RHODE ISLAND HOSPITAL A LIFESP [US]; WANDS JACK R [US]; MERLE PHILIPPE) 6 April 2006 (2006-04-06) page 18, lines 16-27 page 3, paragraph 3 page 15, last paragraph - page 16, paragraph 3 page 25, paragraph 2 page 46, lines 24,25 -----	1-5,8, 11,13-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/077845

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007/077845

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz1 (SEQ ID NO: 18 or 50 or 35) and an Fc domain, or Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76)

2. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz2 (SEQ ID NO: 19 or 51 or 36) and an Fc domain, or Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77).

3. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz3 (SEQ ID NO: 20 or 52 or 37) and an Fc domain, or Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78).

4. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz4 (SEQ ID NO: 21 or 53 or 38) and an Fc domain, or Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79).

5. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

International Application No. PCT/US2007/077845

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz5 (SEQ ID NO: 22 or 54 or 39) and an Fc domain, or Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75).

6. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz6 (SEQ ID NO: 23 or 55 or 40) and an Fc domain, or Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80).

7. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz7 (SEQ ID NO: 24 or 56 or 41) and an Fc domain, or Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81).

8. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz8 (SEQ ID NO: 25 or 57 or 42) and an Fc domain, or Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74).

9. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz9 (SEQ ID NO: 26 or 58 or 43) and an Fc domain, or Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82).

10. claims: 1-5 (part), 8 (part), 11 (part), 13-51 (part)

International Application No. PCT/ US2007/077845

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hFrz10 (SEQ ID NO: 27 or 59 or 44) and an Fc domain, or Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83).

11. claims: 1-4 (part), 6 (part), 9 (part), 12-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises sFRP1 (SEQ ID NO: 28 or 60 or 45) and an Fc domain, or sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84).

12. claims: 1-4 (part), 6 (part), 9 (part), 12-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises sFRP2 (SEQ ID NO: 29 or 61 or 46) and an Fc domain, or sFRP2-Fc (SEQ ID NO: 85).

13. claims: 1-4 (part), 6 (part), 9 (part), 12-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises sFRP3 (SEQ ID NO: 30 or 62 or 47) and an Fc domain, or sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86).

14. claims: 1-4 (part), 6 (part), 9 (part), 12-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises sFRP4 (SEQ ID NO: 31 or 63 or 48) and an Fc domain, or sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87).

15. claims: 1-4 (part), 6 (part), 9 (part), 12-51 (part)

International Application No. PCT/US2007/077845

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises sFRP5 (SEQ ID NO: 32 or 64 or 49) and an Fc domain, or sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

16. claims: 1-4 (part), 7 (part), 10 (part), 13-17 (part), 19-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hRor1 (SEQ ID NO: 33 or 65) and an Fc domain.

17. claims: 1-4 (part), 7 (part), 10 (part), 13-17 (part), 19-51 (part)

A Wnt antagonist, as well as a pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist, a nucleic acid encoding the Wnt antagonist, and the use of the pharmaceutical composition comprising the Wnt antagonist in treating cancer, wherein the Wnt antagonist comprises hRor2 (SEQ ID NO: 34 or 66) and an Fc domain.

9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/077845

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004247593 A1	09-12-2004	NONE	
WO 2004032838 A	22-04-2004	CA 2501235 A1 EP 1549144 A2	22-04-2004 06-07-2005
WO 2006036173 A	06-04-2006	CA 2580780 A1 US 2008194457 A1 WO 2006036179 A2	06-04-2006 14-08-2008 06-04-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	G 0 1 N 33/53 D	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. レーザーディスク

(72)発明者 ボラキス, ポール
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 4 1, ミル バレー, コーテ マデラ アベニュー 2 6 0

(72)発明者 ルビンフェルド, ボニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 6, ダンビル, クエイル ラン ドライブ 4 1 8 6

(72)発明者 デ アルメイダ, ベニタ アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, バックランド アベニュー 9 6 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA04 DA02 DA06 EA02 EA04 GA13 HA14
4C084 AA02 AA07 BA22 BA41 CA18 CA53 DC50 NA14 ZB212 ZB262
ZC412
4H045 AA11 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	使用WNT拮抗剂和WNT拮抗剂诊断和治疗WNT介导的疾病		
公开(公告)号	JP2010504081A	公开(公告)日	2010-02-12
申请号	JP2009527577	申请日	2007-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アーンストジェームズエー ポラキスポール ルビンフェルドボニー デアルメイダベニタアイ		
发明人	アーンスト, ジェームズ エー. ポラキス, ポール ルビンフェルド, ボニー デアルメイダ, ベニタ アイ.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C07K16/00 C07K19/00 A61K38/00 A61P43/00 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/4702 C07K14/71 G01N2333/71 Y02A50/473		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/00 C07K19/00 A61K37/02 A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61P35/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA14 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA22 4C084/BA41 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/825063 2006-09-08 US 60/951175 2007-07-20 US		
其他公开文献	JP2010504081A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及细胞增殖的调节。更具体地，本发明涉及Wnt途径的抑制剂，以及它们在诊断和治疗以Wnt途径信号传导的激活和由Wnt途径信号传导介导的细胞事件的调节为特征的疾病中的用途。。本发明卷曲蛋白，从分泌型卷曲相关蛋白或蛋白洛尔，和嵌合Wnt拮抗剂包含Fc免疫球蛋白组分，以及细胞Wnt信号传导病症和Wnt介导的病症，包括癌症衍生FRZ域组件用于治疗 and 诊断检测提供其用途。

