

## АНТИТЕЛА КОЈА БЛОКИРАЈУ CRIPTO И ЊИХОВА УПОТРЕБА

### Област технике на коју се проналазак односи

Предметни проналазак генерално се односи на подручје генетике и ћелијске и молекуларне биологије. Још одређеније проналазак се односи на антитела која се везују за и регулишу сигнализацију CripTo, китове који садрже таква антитела и поступке који користе антитела. Према Међународној класификацији патената (МКП) проналазак припада класама А 61 К 39/395, С 07 К 16/00, С 07 К 16/18, С 07 К 16/30, С 07 К 16/46.

### Технички проблем

Прекомерна експресија CripTo протеина је повезана са много типова тумора (укључујући али без ограничења на туморе дојке, тестиса, дебелог црева, плућа, оваријума, бешике, утеруса, цервикса, панкреаса и желуца), као што је показано имунобојењима хуманог ткива са зечјим поликлоналним антителима добијеним против малих cripTo пептида. Panico *i sar.*, 1996, *Int. J. Cancer*, 65: 51-56; Byrne *i sar.*, 1998, *J Pathology*, 185:108-111; De Angelis *i sar.*, 1999, *Int J Oncology*, 14:437-440. Према томе, постоји потреба у пракси за начинима за контролу, рестрикцију и/или превенцију овакве прекомерне експресије, регулисања CripTo сигнала, и регулисања последица експресије CripTo (тј., започињање и/или одржавање трансформације ћелија).

### Стање технике

CripTo је ћелијски површински протеин састављен од 188 остатака аминокиселина случајно изолован приликом прегледања цДНК библиотеке хуманог карцинома ембриона (Ciccociola *i sar.*, 1989, *EMBO J.*, vol. 8, no. 7, str. 1987-1991). CripTo протеин има најмање два уочљива домена: домен богат цистеином, и домен који је прво окарактерисан као сличан домену нађеном у породици епидермалног фактора раста (EGF). CripTo је оригинално класификован као члан EGF фамилије (Ciccociola *i sar.*, *supra*); међутим, накнадне анализе показале су да CripTo не везује ни један од познатих EGF рецептора и његов домен налик на

EGF је био у ствари различит од EGF фамилије (Bianco *i sar.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:8624-8629).

Cripto сигнални пут је остао прикривен упркос континуираним истраживањима уз литературу која подржава активацију неколико различитих путева, укључујући пут MAP киназе (DeSantis *i sar.*, 1997, *Cell Growth Differ.*, 8:1257-1266; Kannan *i sar.*, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:3330-3335), TGF- $\beta$  пут (Gritsman *i sar.*, 1999, *Development*, 127:921-932; Schier *i sar.*, 2000, *Nature*, 403:385-389), могуће интеракције са Wnt путем (Salomon *i sar.*, *Endocr Relat Cancer*. 2000 Dec;7(4): 199-226; и унакрсни одговор са EGF путем (Bianco *i sar.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:8624-8629).

U.S. патент 5,256,643 и две издвојене пријаве сродне са овом (U.S. патенти 5,654,140 и 5,792,616), откривају хумани Cripto ген, Cripto протеин, и антитела за Cripto.

U.S. патент 5,264,557 и три издвојене пријаве сродне са овом (U.S. патенти 5,620,866, 5,650,285, и 5,854,399), откривају хумани Cripto-сродни ген и протеин. Такође су откривена антитела која се везују за Cripto-сродни протеин али не реагују унакрсно везивањем са самим Cripto протеином.

### **Излагање суштине проналаска**

Предметни проналазак обезбеђује нова антитела која се специфично везују за Cripto, и поступке припремања и употребе таквих антитела. Проналазак такође обезбеђује антитела која се везују за Cripto и регулишу Cripto сигнализирање или интеракцију протеина, нпр., антитело које се везује за Cripto тако да је сигнал који настаје од интеракције протеина са Cripto регулисан нисходно. Проналазак такође обезбеђује антитела која се везују за Cripto и блокирају интеракцију између Cripto и ALK4. Проналазак такође обезбеђује антитела која се везују за Cripto и регулишу раст тумора. Проналазак такође обезбеђује антитела која се везују за Cripto, регулишу Cripto сигнализирање и регулишу раст тумора. Проналазак такође обезбеђује антитела која се везују за Cripto, блокирају интеракцију између Cripto и ALK4 и регулишу раст тумора.

У једном аспекту проналаска, антитело предметног проналаска специфично се везује за епитоп одабран из групе епитопа за које се везују антитела A10B2.18 (АТСС ПРИСТУПНИ БР. РТА-3311), В3F6.17 (АТСС ПРИСТУПНИ БР. РТА-3319).

У другом аспекту проналаска, антитело предметног проналаска се специфично везује за епитоп у лиганд/рецептор везујућем домену Cripto. Cripto може бити одабран од CR-1 (SEQ ID NO:1) или CR-3 (SEQ ID NO:2).

У другом облику епитоп за који се везују антитела предметног проналаска је у домену који обухвата остатке аминокиселина 46-62 Cripto. Антитела која се специфично везују за епитопе у домену који обухвата остатке аминокиселина 46-62 Cripto укључују, али нису ограничени на A10B2.18 (АТСС ПРИСТУПНИ БР. РТА-3311), В3F6.17 (АТСС ПРИСТУПНИ БР. РТА-3319).

Предметни проналазак такође обухвата антитела која се везују специфично за Cripto и способна су да регулишу Cripto сигнализирање.

Предметни проналазак такође обухвата антитела која се специфично везују за Cripto и блокирају интеракцију између Cripto и ALK4.

У другом аспекту, предметни проналазак обухвата антитела која се специфично везују за Cripto и способна су да регулишу раст тумора.

У још једном аспекту, предметни проналазак обухвата антитела која се специфично везују за Cripto, која су способна да регулишу Cripto сигнализирање, и која су способна да регулишу раст тумора.

У још једном аспекту, предметни проналазак обухвата антитела која се специфично везују за Cripto, која су способна да блокирају интеракцију између Cripto и ALK4, и која су способна да регулишу раст тумора.

У још једном облику предметни проналазак обезбеђује антитело које продукује хибридома одабран из групе која се састоји од A10B2.18 (АТСС ПРИСТУПНИ БР. РТА-3311), В3F6.17 (АТСС ПРИСТУПНИ БР. РТА-3319).

Антитела предметног проналаска укључују али нису ограничена на моноклонална, поликлонална, хуманизована, химерна и хумана антитела.

Предметни проналазак такође обезбеђује препарат за давање субјекту који има тумор који експримира *Cripto* који садржи најмање једно од антитела описаних горе. У још одређенијем облику субјект је човек. Препарат може укључивати фармацеутски прихватљив ексципијент. Антитела која су горе описана могу бити коњугована са хемотерапеутским агенсом или се могу обезбедити у комбинацији са некоњугованим хемотерапеутиком.

Другим аспектом проналаска обухваћени су поступци модулисања раста ћелија тумора *in vitro* у узорку који садржи корак додавања узорку препарата описаног горе.

Такође су обухваћени поступци модулисања раста ћелија тумора *in vivo* код субјекта који садрже корак давања субјекту ефективне количине препарата описаног горе. У посебном облику субјект је човек.

Други аспект проналаска су поступци третирања субјеката који имају тумор који прекомерно експримира *Cripto* који садржи давање субјекту препарата описаних горе у ефективној количини. Препарати за давање могу укључити фармацеутски прихватљиве ексципијенте, антитела коњугована са хемотерапеутским агенсима и антитела која се дају у комбинацији са некоњугованим хемотерапеутским агенсима.

Поступци предметног проналаска су посебно корисни у модулисању раста ћелија тумора и/или третирању субјекта (тј. човека) који има тумор где је туморска ћелија одабрана од дојке, тестиса, дебелог црева, плућа, оваријума, бешике, утеруса, цервикса, панкреаса, и туморских ћелија желуца.

У још једном облику, предметни проналазак обухвата поступке одређивања да ли ткиво експримира *Cripto*, садржећи корак анализирања ткива код субјекта путем имуно теста користећи било које од антитела описаних горе. Такође су обухваћени поступци одређивања да ли ћелијска линија прекомерно експримира *Cripto*, садржећи корак анализирања ћелијске линије путем имуно

теста користећи било које од антитела описаних горе. Ови и други аспекти проналаска описани су са више детаља ниже у "Детаљном опису проналаска".

### **Кратак опис слика нацрта**

Проналазак је детаљно описан на примеру извођења приказаном на нацрту у коме:

Слика 1- На слици 1 је показан одговор NCCIT, ћелијске линије хуманог тестикуларног карцинома, на анти-CFC блокирање Cripto mAb A8G3.5 (Пример 6).

Слика 2 - На слици 2 је показан одговор NCCIT, ћелијске линије хуманог тестикуларног карцинома, на анти-EGF блокирање Cripto mAb A27F6.1 (Пример 7).

Слика 3 - На слици 3 су дати резултати FACS теста: 293/ALK4 ћелијског везивања CR-Fc (Пример 8).

### **Детаљан опис проналаска**

Откривена су антитела која се специфично везују за Cripto и њихова употреба у регулисању Cripto сигнализирања или интеракције протеина и/или блокирања интеракције између Cripto и ALK4, и/или модулацији раста ћелија тумора. Откривене су различите класе антитела која се специфично везују за Cripto укључујући, на пример, антитела која се специфично везују за епитоп у везујућем домену лиганд/рецептор било природног Cripto протеина или денатурисаног облика Cripto; антитела која се везују за домен налик EGF, cis-богати домен, или пептид (нпр., од око 3 до око 20 аминокиселина) из региона који садржи аминокиселинске остатке 46 до 150; антитела која се везују за Cripto и регулишу Cripto сигналирање; антитела која везују Cripto и регулишу раст ћелија тумора; и антитела која се везују за Cripto, регулишу Cripto сигнализирање, и регулишу раст ћелија тумора. Ова антитела су одабрана користећи конвенционалне тестове *in vitro* за селекцију антитела која се везују за везујући домен лиганд/рецептор, регулишу Cripto сигнализирање, или регулишу раст ћелија тумора.

Поступци овог проналаска корисни су у терапији малигнух или бенигнух тумора сисара где стопа раста тумора (која је ненормална стопа за нормална ткива) је барем делом зависна од Cripto. Ненормална стопа раста је стопа раста која је повећана у односу на ону потребну за нормалну хомеостазу и која је у вишку у односу на ону у нормалним ткивима истог порекла.

### Дефиниције

У овом документу направљене су различите дефиниције. Већина речи има значење које би се тим речима приписало од стране оних са искуством у пракси. Речи које су посебно дефинисане било ниже или другде у овом документу имају значење обезбеђено у контексту предметног проналаска у целини и обично су схваћене од стране оних са искуством у пракси.

Онако како се овде користи термин "регион" значи физички континуирани део примарне структуре биомолекула. У случају протеина, регион је дефинисан са континуираним делом секвенце аминокиселине тог протеина.

Онако како се користи оведе термин "домен" односи се на структурни део биомолекула који доприноси познатој предвиђеној функцији биомолекула. Домени могу бити ко-екстензивни са регионима или њиховим деловима; домени могу такође инкорпорирати део биомолекула који је различит од одређеног региона, у додатку на цео или део тог региона. Примери домена протеина укључују, али нису ограничени на ванћелијски домен (обухвата од око остатка 31 до остатка 188 Cripto, укључујући Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO:2)) и трансмембрански домен (обухвата од око остатка 169 до остатка 188 Cripto, укључујући Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO:2)). Везујући домен лиганд/рецептор Cripto протеина обухвата од око 75 остатка до око 150 остатка Cripto, укључујући Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO:2) и укључује домен налик EGF Cripto, који обухвата, на пример, од око остатка 75 до око остатка 112 од Cripto, укључујући Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO:2) и цистеин-богати домен од Cripto, који обухвата, на пример, од око 114 остатака до око 150 остатака од Cripto, укључујући Cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) и CR-3 (SEQ ID NO:2). На пример, идентификовано је

много моноклоналних антитела као везујућа за EGF-сличне или cis-богате домене. Додатно је моноклонално антитело A10B2.18 (ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3311), B3F6.17 (ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3319) и A17A2.16 идентификовано као везујуће за епитоп који је формиран у домену у региону који обухвата остатке аминокиселине 46-62, узводно од домена налик EGF. Види Пример 3 ниже. Епитоп у везујућем домену лиганд/рецептор је епитоп, било да је формиран у конформационо природном Сrpto протеину, или денатурираном Сrpto протеину, за који се антитела могу везати.

Онако како се овде користи термин "антитело" подразумева се да се односи на комплетно, интактно антитело, и Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, и друге његове фрагменте. Комплетно, интактна антитела укључују, али нису ограничена на моноклонална антитела као што су мишја моноклонална антитела, поликлонална антитела, химерна антитела, хумана антитела, и хуманизована антитела. Различити облици антитела могу бити продуковани користећи стандардне поступке техника рекомбинантне ДНК (Winter i Milstein, Nature 349: 293-99, 1991). На пример, могу бити конструисана "химерна" антитела, у којима је домен везивања антигена из антитела животиње везан за хумани константни домен (антитело иницијално изведено из нехуманог сисара у којем је употребљена технологија рекомбинантне ДНК да замени све делове споја и константних региона тешког ланца и/или константног региона лаког ланца, са одговарајућим регионима из хуманог лаког или тешког ланца имуноглобулина) (види нпр., Cabilly i sag., Патент Сједињених држава 4,816,567; Morrison i sag., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-55, 1984). Химерна антитела редукују имуногене одговоре изазване животињским антителима када се користе у хуманим клиничким третманима.

Сем тога, могу бити синтетизована рекомбинантна "хуманизована" антитела. Хуманизована антитела су антитела која су иницијално изведена из не хуманих сисара у којима је употребљена технологија рекомбинантне ДНК да се супституишу неке или све аминокиселине које нису потребне за везивање антигена са аминокиселинама из одговарајућих региона лаког или тешког ланца хуманог имуноглобулина. То значи да су они химере које већином садрже секвенце хуманог имуноглобулина у које су убачени региони одговорни за

специфично везивање антигена (види нпр., РСТ патентну пријаву WO 94/04679). Животиње су имунизоване са жељеним антигеном, одговарајућа антитела су изолована и део секвенци варијабилног региона одговорног за везивање специфичног антигена је уклоњен. Региони везивања антигена који су изведени из животиња су клонирани на одговарајућу позицију гена хуманог антитела у којем су региони за које се везује антиген били делетирани. Хуманизована антитела минимизују употребу хетерологих (међу врстама) секвенци у антителима за употребу у хуманим терапијама, и мање је вероватно да побуде нежељене имуне одговоре. Приматизована антитела могу бити продукована на сличан начин.

Други облик проналаска укључује употребу хуманих антитела, која могу бити продукована код нехуманих животиња, као што су трансгене животиње носиоци једног или више хуманих имуноглобулин трансгена. Такве животиње могу бити коришћене као извор за спленоците за производњу хибридома, као што је описано у US Патенту 5,569,825.

Фрагменти антитела и унивалентна антитела такође се могу употребити у поступцима и препаратима овог проналаска. Унивалентна антитела садрже димер тешког ланца/лаки ланац везан за Fc (или стем) регион другог тешког ланца. "Fab регион" односи се на оне делове ланца који су приближно еквивалентни, или аналогни секвенцама које садрже делове Y гране тешког ланца и лаког ланца у целини, и за које је заједно (у агрегатима) показано да испољавају активност антитела. Fab протеин укључује агрегате једног тешког и једног лаког ланца (обично познатог као Fab'), као и тетрамере који одговарају сегментима две гране Y антитела, (обично познатог као F(ab)<sub>2</sub>), било да је било који од горе поменутих ковалентно или не-ковалентно у агрегатима, све док су агрегације способне да специфично реагују са одређеним антигеном или породицом антигена.

Било које од антитела проналаска може по потреби бити коњуговано са хемотерапеутиком, као што је ниже дефинисано.

Како се овде користи, термин "везивање" значи физичку или хемијску интеракцију између два протеина или једињења или везаних протеина или



једињења или њихових комбинација, укључујући интеракцију између антитела и протеина. Везивање укључује јонске, не-јонске, водоничне везе, Van der Waals, хидрофобне интеракције, итд. Физичка интеракција, везивање, може бити или директна или индиректна, индиректна кроз или због ефеката другог протеина или једињења. Директно везивање се односи на интеракције које се не одигравају кроз или због ефекта другог протеина или једињења већ уместо тога без других битних хемијских интермедијера. Везивање се може детектовати на много различитих начина. Поступци детектовања везивања добро су познати онима са искуством у пракси.

Онако како се користи овде, "антитело способно да интернализује Cripto" означава антитело које улази у ћелију док се уклања Cripto са ћелијске површине. Може се обавити скрининг за Cripto антитела која су способна да интернализују Cripto користећи флуоресцентно обележена Cripto моноклонална антитела. Са циљем да се одреди која антитела интернализују у Cripto позитивне ћелије могу се тестирати на узимање флуоресцентног сигнала антитела од стране ћелија путем прегледања ћелија под флуоресцентним микроскопом и/или конфокалним микроскопом. Она антитела која постају интернализована биће препозната као флуоресцентни сигнали у цитоплазматичним и или ћелијским везикулама. Неограничавајући примери Cripto антитела способних да интернализују Cripto укључују A27F6.1 и B3F6.17.

Онако како се користи овде, термин "једињење" означава било коју хемикалију или молекул који се могу идентификовати, укључујући али без ограничења на, јон, атом, мали молекул, пептид, протеин, шећер, нуклеотид или нуклеинску киселину, и такво једињење може бити природно или синтетичко.

Онако како се користи овде, термин "модулише" или "модификује" означава повећање или смањење количине, квалитета или ефекта одређене активности протеина.

Онако како се овде користи термин "модулише сигнализирање Cripto" означава повећање или смањење количине, квалитета или ефекта Cripto активности за око 5%, пожељно 10%, још пожељније 20%, још пожељније 30%, још пожељније 40%, још пожељније 50%, још пожељније 60%, још пожељније

70%, још пожељније 80%, још пожељније 90% и најпожељније 100%. Активност може бити мерена тестирањем познатим у пракси, као што је тест нулте ћелије приказан у примеру 3. У другом облику протеинска интеракција између Cripto и другог протеина је слично регулисана нисходно преко везивања антитела проналаска.

Онако како се користи овде термин "блокирање интеракције између Cripto и ALK 4" означава повећање или смањење интеракције, тј везивање између Cripto и ALK 4 за око 5%, пожељно 10%, још пожељније 20%, још пожељније 30%, још пожељније 40%, још пожељније 50%, још пожељније 60%, још пожељније 70%, још пожељније 80%, још пожељније 90% и најпожељније 100%. Активност може бити мерена тестом познатим у пракси, као што је тест везивања приказан у примеру 8.

Онако како се користи овде термин "модулише раст ћелија тумора *in vitro*" означава повећање или смањење броја ћелија тумора, *in vitro*, за око 5%, пожељно 10%, још пожељније 20%, још пожељније 30%, још пожељније 40%, још пожељније 50%, још пожељније 60%, још пожељније 70%, још пожељније 80%, још пожељније 90% и најпожељније 100%. *In vitro* модулација раста ћелија тумора може бити мерена тестовима познатим у пракси, као што је GEO тест ћелија на меком агару приказаном у примеру 4.

Онако како се користи овде термин "модулише раст ћелија тумора *in vivo*" означава повећање или смањење броја ћелија тумора, *in vivo*, за око 5%, пожељно 10%, још пожељније 20%, још пожељније 30%, још пожељније 40%, још пожељније 50%, још пожељније 60%, још пожељније 70%, још пожељније 80%, још пожељније 90% и најпожељније 100%. *In vivo* регулација раста ћелија тумора може бити мерена тестовима познатим у пракси, као што онај приказаном у примеру 5.

Термин "спречавање" односи се на смањење вероватноће да организам добије или развије абнормално стање.

Термин "третирање" односи се на то да има терапеутски ефект и најмање делимично ублажава или анулира абнормално стање у организму. Третирање укључује одржавање инхибираног раста тумора и индукцију ремисије.

Термин "терапеутски ефекат" односи се на инхибицију абнормалног стања. Терапеутски ефекти у неком обиму ублажују један или више симптома абнормалног стања. У односу на третман абнормалних стања, терапеутски ефект може се односити на једно или више од следећих: (а) повећање или смањење пролиферације, раста, и/или диференцијације ћелија; (б) инхибицију (тј., успоравање или заустављање) или промоцију смрти ћелије; (ц) инхибицију дегенерације; (д) олакшавање до неког степена једног или више симптома везаних са абнормалним стањем; и (е) појачавања функције популације ћелија. Једињења која показују ефикасност против абнормалних стања могу бити идентификована као што је овде описано.

Термин "давање" односи се на поступак инкорпорирања једињења у ћелије или ткива организма. Абнормално стање може се спречити или третирати када ћелије или ткива организма постоје у организму или изван организма. Ћелије које постоје изван организма могу се одржавати или расти у посудама за културу ћелија, или у другом организму. За ћелије које су смештене у организму у пракси постоји много техника да им се дају једињења, укључујући (али без ограничења на) орално, парентерално, дермално, ињекцијом, и применом аеросола. За ћелије које су изван организма, у пракси постоје многобројне технике за давање једињења укључујући (али без ограничења на) технике микроинекције ћелија, технике трансформације и технике носача. Давање се може обавити на много начина познатих у пракси, нпр., орално, интравенски, интраперитонеално, интрамускуларно, и томе слично. Када се користи терапија ин виво, антитела предметног проналаска дају се пацијенту у ефективним количинама. Онако како се овде користи "ефективна количина" је количина која је довољна да изазове корисне или жељене клиничке резултате (тј., количине које елиминишу или редукују тежину тумора пацијента). Ефективна количина се може давати путем једног или више давања. За сврхе овог проналаска, ефективна количина антитела предметног проналаска је количина антитела која је довољна да побољша, стабилизује или одложи развијање Сrpto-везаног болесног стања, посебно Сrpto-везаних тумора. Детекција и мерење ових индикатора ефикасности дискутовани су ниже. Пример режима типичног третмана укључује давање субјекту интравенском инфузијом антитела

проналаска по недељној процедури у дози око 2-5 mg/kg. Антитела су давана пацијенту инфузијом изван хемоинфузионе јединице, сем ако пацијенту није била потребна хоспитализација. Обухваћени су такође и други режими давања познати у пракси.

Абнормално стање се такође може спречити или третирати давањем антитела проналаска групи ћелија које имају аберацију у путу трансдукције сигнала. Ефекат давања једињења на функционисање организма се може затим пратити. Организам је пожељно човек.

"Прекомерна експресија Crip1" је предвиђена да означи експресију Crip1 од стране ткива такву де је експресија већа од експресије Crip1 суседног нормалног ткива у статистички значајној количини.

"Хемотерапеутици" односи се на било који агенс предвиђен у пракси да има терапеутске ефекте на инхибицију раста тумора, одржавање инхибираног раста тумора, и/или индукцију ремисије, као што су природна једињења, синтетичка једињења, протеини, модифииковани протеини, и радиоактивна једињења. Хемотерапеутски агенси замишљени овде укључују агенсе који се могу коњуговати са антителима предметног проналаска или алтернативно агенсе који се могу употребити у комбинацији са антителима предметног проналаска без да се коњугују са антителима. Примерни хемотерапеутици који се могу коњуговати са антителима предметног проналаска укључују, али нису ограничени на, радиокоњугате ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ , и остали), тумор-активирани пролекови (маитансиноиде, СС-1065 аналоге, деривате клихеамицина, антрациклина, винка алкалоиде), рицин, токсин дифтерије, егзотоксин *pseudomonasa*.

Хемотерапеутски агенси могу се употребити у комбинацији са антителима проналаска, радије него да се коњугују са њима (тј. некоњуговани хемотерапеутици), укључују, али нису ограничени на следеће: платинуми (тј. цис платинум), антрациклина, аналоге нуклеозида (пурин и пиримидин), таксане, камптотецине, епиподофилотоксине, алкилирајуће агенсе ДНК, антагонисте фолата, винка алкалоиде, инхибиторе рибонуклеотид редуктазе, инхибиторе естрогена, инхибиторе прогестерона, инхибиторе андрогена,

инхибиторе ароматазе, интерфероне, интерлеукине, моноклонална антитела, таксол, камптосар, адриамицин (dox), 5-FU и гемцитабин. Такви хемотерапеутици могу се употребити у пракси проналаска у комбинацији са антителима проналаска заједничким давањем антитела и некођугованог хемотерапеутика.

"Фармацеутски прихватљив носач или ексципијент" односи се на биолошки инертно једињење познато у пракси и употребљено за давање антитела проналаска. Прихватљиви носачи су добро познати у пракси и описани, на пример, у Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, izd., Mack Publishing Co., 1990. Прихватљиви носачи могу укључити биокомпатибилне, инертне или биоапсорбабилне соли, пуферске агенсе, олиго- или полисахариде, полимере, вискоеластична једињења као што је хијалуронска киселина, агенсе за поправљање вискозности, презервативи, и томе слично.

"Субјект" се односи на кичмењаке, посебно чланове сисарских врста, и укључује али није ограничен на домаће животиње, животиње за спорт и примате, укључујући људе.

### **Антитела проналаска**

Антитела проналаска специфично се везују за Сripto: онако како се користи овде Сripto укључује CR-1 Сripto протеин, CR-3 Сripto протеин, и њихове фрагменте. Такви фрагменти могу бити цели домени, као што су ванћелијски или унутарћелијски домени, EGF-слични домени, cis-богати домени, домени везивања рецептора, и томе слично. Такви фрагменти могу такође укључити континуиране или неkontинуиране епитопе у било ком домену Сripto протеина.

Секвенца од 188 аминокиселина за CR-1 је дата у SEQ ID NO: 1.

Секвенца од 188 аминокиселина за CR-3 је дата у SEQ ID NO: 2.

EGF-налик домен обухвата од око 75 аминокиселинских остатака до око 112 аминокиселинских остатака зрелог Сripto протеина. Епитопи у EGF-налик домену могу садржати линеарна или нелинеарна подручја остатака аминокиселина.

киселина. Пример размотрених линеарних епитопа укључује али није ограничен на остатке 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105, 100-110, или 105-112.

Cis-богати домен обухвата од око 114 аминокиселинских остатака до око 150 аминокиселинских остатака зрелог CripTo протеина. Епитопи у cis-богатом домену могу садржати линеарна или не линеарна подручја остатака аминокиселина. Обухваћени примери линеарних епитопа укључују али нису ограничени на остатке 114-125, 120-130, 125-135, 130-140, 135-145 или 140-150.

Онда када су антители генерисана, везивање антители за CripTo може се тестирати коришћењем стандардних техника познатих у пракси, као што је ELISA, док присуство CripTo на површини ћелија може бити тестирано користећи проточну цитометрију (FACS), као што је приказано у примеру 2. Било које друге технике мерења таквог везивања могу се употребити алтернативно.

Предметни проналазак обезбеђује антители (нпр., моноклонална и поликлонална антители, једноланчана антители, химерна антители, бифункционална/биспецифична антители, хуманизована антители, хумана антители, и комплементарни детерминишући регион (CDR)-графтована антители, укључујући једињења која укључују CDR секвенце која специфично препознају полипептид проналаска) специфична за CripTo или његове фрагменте. Фрагменти антители, укључујући Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, и Fv, су такође обезбеђена проналаском. Термини "специфични" и "селективни" када се користе да опишу везивање антители проналаска, назначавају да варијабилни региони антители проналаска препознају и везују CripTo полипептиде. Биће схваћено да специфична антители проналаска могу такође интерреаговати са другим протеинима (на пример, протеин A S. aureus или друга антители у ELISA техникама) путем интеракција са секвенцама изван варијабилног региона антители и, посебно, у константном региону молекула. У пракси су добро познати тестови за прегледање да се одреди специфично везивање антители проналаска (тј. антители која се специфично везују за епитоп домена везивања лиганд/рецептор и домен који обухвата аминокиселинске остатке 46-62) добро

су познати и рутински примењивани у пракси. За свеобухватну дискусију оваквих огледа види Harlow i sar. (Izd.), Antitela, Laboratorijski praktikum; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Поглавље 6. Антитела која препознају и везују фрагменте Сrpto протеина такође су обухваћена, под условом да су антитела специфична за Сrpto полипептиде. Антитела проналаска могу се продуковати коришћењем било ког поступка који се рутински користи у пракси.

Специфичност антитела је описана са више детаља ниже. Међутим, мора се истаћи да антитела која се могу генерисати из других полипептида који су претходно описани у литератури и која су способна да случајно реагују унакрсно са Сrpto (нпр., захваљујући случајном постојању сличног епитопа у оба полипептида) сматрају се "унакрсно-реактивним" антителима. Таква унакрснореагујућа антитела нису антитела која су "специфична" за Сrpto. Одређивање да ли се антитело специфично везује за епитоп Сrpto ради се користећи било који од неколико тестова, као што је Western blotting тест, који је добро познат у пракси. Да би се идентификовале ћелије које експримирају Сrpto и да би се такође регулисала активност везивања лиганд/рецептор, посебно су корисна антитела која се специфично везују за ванћелијски епитоп Сrpto протеина (тј., делове Сrpto протеина који се налазе изван ћелије).

У једном облику проналазак обезбеђује препарат без ћелија који садржи поликлонална антитела, при чему је најмање једно од антитела, антитело проналаска специфично за Сrpto. Антисерум изолован из животиње је примерни препарат, као што је препарат који садржи фракцију антитела антисерума која је ресуспендована у води или у другом растварачу, ексципијенту или носачу.

У другом облику, проналазак обезбеђује моноклонална антитела. Моноклонална антитела су високо специфична, пошто су усмерена против појединачног антигеног места. Даље, на супрот поликлоналним препаратима које обично укључују различита антитела усмерена против различитих епитопа, свако моноклонално антитело је усмерено против појединачног детерминанта на антигену. Моноклонална антитела су корисна да побољшају селективност и специфичност поступака дијагностичких и аналитичких огледа користећи

везивање антиген-антитело. Друга предност моноклоналних антитела је у томе што се синтетизују у хибридома културама, неконтaминирaнa другим имуноглобулинимa. Хибридоми који продукују таквa антителa такође су обухвaћени кaо аспекти проналаскa.

У још једном сродном облику, проналазак обезбеђује анти-идиотипско антитело специфично за антитело које је специфично за Сrіpto. За детаљнију дискусију о анти-идиотипским антителима, види, нпр., U.S. Патенте 6,063,379 и 5,780,029.

Добро је познато да антитела садрже релативно мале домене везивања антигена који могу бити изоловани хемијски или рекомбинантним техникама. Такви домени су сами по себи корисни Сrіpto везујући молекули, и такође се могу поново увести у хумана антитела, или фузионисати за хемотерапеутик или полипептид. Тако, у још једном облику, проналазак обезбеђује полипептид који садржи фрагмент Сrіpto-специфичног антитела, где се фрагмент и везани молекул, ако га има, везују за Сrіpto. Путем неограничавајућег примера, проналазак обезбеђује полипептиде који су једноланчана антитела и CDR-графтована антитела. За детаљнију дискусију о CDR-графтованим антителима, види, нпр., U.S. Патент 5,859,205.

У једном облику проналаска проналазак даје антитела одабрана из групе која се састоји од A10B2.18 (ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3311) и B3F6.17 (ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3319).

У још једном облику проналаска дата је аминокиселинска секвенца антитела B3F6.17, депонованог кaо ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3319. Антитело B3F6.17 обухвата варијабилни део лаког ланца дат у SEQ ID NO 3, и варијабилни део тешког ланца дат у SEQ ID NO 4. Варијабилни лаки ланац B3F6.17 обухвата три CDR региона CDR1, CDR2 и CDR3. CDR1 лаког ланца је са SEQ ID NO 5, CDR2 је са SEQ ID NO 6 и CDR3 је са SEQ ID NO 7. Варијабилни тешки ланац B3F6.17 обухвата три CDR региона, CDR1, CDR2 и CDR3. CDR1 тешког ланца је са SEQ ID NO 8, CDR2 са SEQ ID NO 9 и CDR3 је дат у SEQ ID NO 10.



У другом облику, не-хумана антитела могу бити хуманизована било којим од поступака познатих у пракси. Хуманизована антитела корисна су за терапеутске примене *in vivo*. Сем тога могу бити синтетизована рекомбинантна "хуманизована" антитела. Хуманизована антитела су антитела која су иницијално изведена од сисара, сем човека, у којима је употребљена технологија рекомбинантне ДНК да се супституишу неке или све аминокиселине које нису потребне за везивање антигена са аминокиселинама из одговарајућих региона хуманог лаког или тешког ланца имуноглобулина. Према томе они су химере које садрже углавном хумане имуноглобулинске секвенце у које су региони одговорни за специфично везивање антигена убачени (види, нпр., РСТ патентну пријаву WO 94/04679). Животиње су имунизоване са жељеним антигеном, одговарајућа антитела су изолована и део секвенци варијабилног региона одговоран за специфично везивање антигена је уклоњен. Затим су региони специфични за везивање антигена изведени од животиња клонирани на одговарајуће позиције гена хуманог антитела у којима су региони везивања антигена били делецирани. Хуманизована антитела минимизују употребу хетерологих (међу-врстама) секвенци у антителима за употребу у хуманој терапији, и мање је вероватно да ће изазвати нежељене имуне одговоре. Приматизована антитела могу се продуковати на сличан начин користећи гене антитела примата (нпр., резус, бабун и шимпанза). Даље промене могу се затим увести у оквирне регионе антитела да се регулише афинитет или имуногеност. Види, нпр., U.S. патенте бр. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 и 6,180,370.

Други облик проналаска укључује употребу хуманих антитела, која се могу продуковати у животињама сем човека, као што су трансгене животиње које носе један или више хуманих имуно-глобулинских трансгена. Такве животиње могу се употребити као извор спленоцита за продуковање хибридома, као што је описано у патенту Сједињених Држава 5,569,852, WO 00076310, WO 00058499 и WO 00037504.

### **Регулација сигнала**

У другом облику, антитела проналаска везују се за Сrpto, и регулишу Сrpto сигналирање или Сrpto-протеин интеракције. Прекомерна експресија

Cripto активности може довести до стања де-диференцијације промовишући карактеристике мезенхималних ћелија, повећану пролиферацију, и ћелијску миграцију (Salomon i sar., *BioEssays* 21: 61-70, 1999; Ciardiello i sar., *Oncogene* 9: 291-298, 1994; i Baldassarre i sar., *Int. J. Cancer* 66:538-543, 1996), фенотипове асоциране са трансформацијом која се јавља код неоплазије.

Један поступак за тестирање активности анти-Cripto антитела и њихове способности да регулишу Cripto сигнализирање је помоћу F9-Cripto knock-out (КО) ћелијске линије (Minchiotti i sar., *Mech. Dev.* 90: 133-142, 2000). Cripto стимулише фосфорилацију smad2 и транскрипциони фактор FAST код ембриона *Xenopus*-а, и активност транскрипционог фактора FAST може бити праћена мерењем активности луциферазе из репортер гена регулаторног FAST елемента луциферазе (Saijoh i sar., *Mol. Cell* 5:35-47, 2000). F9-Cripto КО ћелије су делетиране за Cripto ген па су, према томе, нулте за Cripto и Cripto-зависно сигнализирање (Minchiotti i sar., *Mech. Dev.* 90: 133-142, 2000). Cripto сигнализирање може се проценити у F9 Cripto КО ћелијама трансфектовањем у Cripto, FAST, и генски конструкт регулаторног FAST елемента луциферазе. Неће бити виђена активност Cripto зависне FAST луциферазе у овим ћелијским линијама све све док се у њих не трансфектују Cripto цДНК, и FAST цДНК. Антитела способна да блокирају Cripto-зависно Nodal сигнализирање су антитела која блокирају функцију Cripto сигнализирања.

Други тестови који су у стању да мере активност Cripto могу бити употребљени од стране оних који имају искуство у пракси, као што је тест раста на меком агару (види Пример 4 доле). Способност ћелија да расту на меком агару је везана са трансформацијом ћелија и тест је класичан *in vitro* тест за мерење инхибиције раста ћелија тумора. Други тестови који су корисни у одређивању инхибиције активности укључују *in vitro* тестове на пластици и томе слично.

### **Терапеутске употребе**

Антитела проналаска такође су корисна за терапеутске намене, као што су регулација раста ћелија тумора, дијагностичке намене да се детектује или квантификује количина Cripto и пречишћавање Cripto.

У једном облику проналаска, обезбеђена су антитела која су у стању да се специфично везују за Cripto и која регулишу раст ћелија тумора код пацијента. У једном облику ћелије тумора су тестикуларне, ћелије дојке, дебелог црева, плућа, оваријума, бешике, уретре, цервикса, панкреаса, и туморске ћелије желуца.

У другом облику, обезбеђена су антитела која су у стању да се вежу посебно за Cripto и која регулишу раст ћелија тумора које прекомерно експримирају Cripto. У једном облику, ћелије тумора су ћелијске линије које прекомерно експримирају Cripto, као што су ћелијске линије изведене из тумора дојке, ткива тестиса, дебелог црева, плућа, оваријума, бешике, утеруса, цервикса, панкреаса и желуца.

Анти-Cripto антитела могу се скринovati на активност *in vivo* као потенцијални антиканцерски агенси следећи стандардне протоколе које користе они са искуством у пракси, као што је то илустровано у Примеру 4 ниже. Примери таквих протокола су истакнути од стране Националног института за канцер (NCI) у њиховим "in vivo модели скрининга канцера" протоколима, NIH публикација број 84-2635 (фебруар 1984).

У другом облику проналаска, антитела проналаска се користе да се третира пацијент који има канцерогени тумор.

Антитела предметног проналаска могу се комбиновати са фармацеутски прихватљивим ексципијентом и давати у терапеутски ефективној дози пацијенту. За дискусију поступака инхибиције раста тумора, види, нпр., U.S. патент 6.165,464.

Такође су обухваћени поступци третирања субјекта који пати од поремећаја везаног са абнормалним нивоима (тј., повишеним или осиромашеним) Cripto при чему поступак садржи давање субјекту ефективне количине антитела која се специфично везују за епитоп Cripto.

Такође су обухваћени поступци третирања субјекта који пати од поремећаја везаног са абнормалним нивоима (нпр., повишеним или осиромашеним) Cripto при чему поступак садржи давање субјекту ефективне количине антитела која специфично формира комплекс са Cripto и усмерена је

на епитопе на који су усмерена антитела одабрана из групе која се састоји од A10B2.18 (ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3311) и B3F6.17 (ATCC PRISTUPNI BR. PTA-3319).

Дијагноза путем детекције Cripto је омогућена путем стандардних тестова везивања користећи нова антитела проналаска, омогућујући онима са искуством у пракси да детектују присуство Cripto специфично у мноштву узорака, култура и томе слично.

Китови који садрже антитело проналаска за било коју од намена која је овде описана такође су обухваћени. Генерално, кит проналаска такође укључује контролни антиген за који је антитело имуноспецифично. Облици укључују китове који садрже све реагенсе и упутства за њихову употребу.

Додатне карактеристике проналаска биће очигледне из илустративних примера који следе.

## Примери

### Пример 1: Експресија и пречишћавање Cripto

Експресиони плазмид означен рSGS480 конструисан је субклонирањем цДНК која кодира остатке аминокиселина хуманог Cripto 1 до 169 од Cripto [аминокиселине 1-169 SEQ ID NO: 1], фузионисан за хумани IgG1 Fc домен (тј., "CR(del C)-Fc") у вектор рEAG1100. За детаљнији опис овог вектора, види U.S. патентну пријаву серијски бр. 60/233,148, поднету 18 Септембра 2000. Вектор рEAG1100 је дериват GIBCO-BRL Life Technologies плазида рCMV-Sport-betagal, чија је употреба у СНО привременим трансфекцијама била описана од стране Schifferli i sar., 1999, Focus 21: 16. Направљен је уклањањем NotI фрагмента репортер гена бетагалактозидазе из плазида рCMV-Sport-Betagal (каталогски број 10586-014) на следећи начин: плазмид је дигестиран са NotI и EcoRV, главни фрагмент од 4.38 kb NotI вектора је пречишћен из гела и повезан. Лигирана ДНК је трансформисана у компетентни E.coli DH5alpha. рEAG1100 је изолован као плазмид који је садржао жељени рекомбинант из изоловане

појединачне колоније. Секвенца рEAG1100 која је обухватала промотор, полилинкер, и транскрипциони терминациони сигнал је потврђена.

Плазмид рSGS480 је пролазно трансфектован у CHO ћелије и ћелије су гајене на 28°C током 7 дана. Присуство CR(del C)-Fc протеина у овим ћелијама и у кондиционираном медијуму је испитано помоћу Western blot анализе. За Western blot анализу, кондиционирани медијум и ћелије од Cripto трансфектованих ћелија су подвргнуте SDS-PAGE на геловима са 4-20% градиента под редукованим условима, пренете електрофоретски на нитроцелулозу и Cripto фузиони протеин је детектован са зечјим поликлоналним антисерумом добијеним против Cripto 17-мерног пептида (садржи остатке 97-113 од SEQ ID NO: 1)- хемоцијанин пужа прилепка (keyhole limpet) коњугата. Након центрифугирања да се уклоне ћелије, Western blot анализа показала је да је CR(del C)-Fc протеин ефективно излучен у кондиционираном медијуму (супернатант). Супернатант је нанет на Протеин А-Sepharose (Pharmacia), и везани протеин је елуиран са 25 mM натријум фосфата рН 2.8, 100 mM NaCl. Елуирани протеин је неутрализован са 0.5 M натријум фосфата на рН 8.6, и анализиран на укупни садржај протеина на основу мерења апсорбанце на 240-340 nm, и у односу на чистоћу помоћу SDS-PAGE. Елуирани протеин је филтриран кроз 0.2 микронски филтер, и чуван на -70°C.

## **Пример 2: Генерисање и скрининг антитела**

Испрани CR(del C)-Fc протеин је ињектиран у мишеве и стандардне хибридома технике, познате онима са искуством у пракси, су употребљене да се генеришу моноклонална антитела.

### **А. Генерисање антитела**

Посебно, женке Robertsonovih мишева (Jackson Labs) су имунизоване интраперитонеално са 25 µg пречишћеног хуманог CR del C-Fc емулзификованог са комплетним фреундовим ађувансом (GibcoBRL #15721-012). Оне су имунизоване (бустер) два пута интраперитонеално са 25 µg CR del

C-Fc емулзификованог са некомплетним фреундовим адјувансом (GibcoBRL #15721-012) и једном на Протеин А перлицама. Серум је скринован и 3 недеље након последње бустер имунизације миш са најбољим титром је имунизован интраперитонеално са 50  $\mu\text{g}$  растворљивог CR del C-Fc три дана пре фузије. Миш је имунизован интравенски са 50  $\mu\text{g}$  CR del C-Fc један дан пре фузије. Ћелије слезине миша су фузионисане са FL653 миелома ћелијама у односу једна ћелија слезине: 6 миелома и засејане 100,000, 33,000 и 11,000 ћелија по бунарчићу у плоче са 96 бунарчића за културу ткива у селективни медијум. Бунарчићи позитивни на раст су скриновани са FACS и ELISA једну недељу касније. Обављене су две фузије.

## **Б. Скрининг антитета**

Супернатанти који су настали из прве и друге фузије су скриновани прво на ELISA плочама ради препознавања Cripto del C и/или Cripto EGF-сличног домена протеина. Контролни фузиони протеин (LT-beta рецептор-Fc) је нанешен на ELISA плоче да би се одбацила моноклонална антитета која су препознала хумани Fc епитоп. ELISA је обављена као што је описано ниже у секцији Ц. У првој фузији, примарни супернатанти су такође скриновани у односу на њихову способност да препознају Cripto протеин на ћелијској површини тестикуларне тумор ћелијске линије, NCCIT помоћу FACS. У случају друге фузије, способност супернатанта да препознају Cripto на две туморске ћелијске линије, NCCIT и ћелијској линији канцера дојке, DU4475 помоћу FAC-a је анализирана. Секундарни скринови укључили су тестирање способности супернатаната моноклоналног антитета да препознају Cripto на површини ћелије на панелу туморских ћелијских линија (за резултате види табеле 1 и 2), способност моноклоналног антитета да препозна хумани Cripto имунохистохемијски на исечцима ткива хумане дојке и тумора дебелог црева, способност моноклоналног антитета да блокира Cripto-Nodal тест сигнализације, способност да блокира раст туморске ћелијске линије на пластици или тестовима у меком агару, и способност да интернализују површински Cripto.

## Ц. ELISA

ELISA тестови изведени су на следећи начин:

Материјали:

Плоче: Costar високо-везујуће лако-испирајуће 96W плоче  
(07-200-642)

2' антитело: Pierce Gt anti-Ms IgG (H+L)- HRP (P131430)

Супстрат: Pierce TMB Supstrat Kit (34021)

Стоп раствор: 1N H<sub>2</sub>S<sub>04</sub>

Пуфери:

Пуфер за везивање: 0.1 M NaHPO<sub>4</sub> pH 9.0

Пуфер за блокирање: PBS + 10% донорски телећи серум

Пуфер за испирање: PBS + 0.1% tween-20

Антигени CR-del-C-Fc и CR-EGF-fc, контролни hu IgG1 фузиони протеин разблажени су у пуферу за везивање до 500 ng/ml. Додато је 100 µl по бунарчићу и инкубирано током 1 h на 37°C или преко ноћи на 4°C. Течност је одливена и плоча је обрнута и блотована док се није осушила. Затим је додано 250 µl пуфера за блокирање по бунарчићу, а након тога инкубирано током 30 min на 37°C. Течност је поново одливена и плоча обрнута и блотована све док се није осушила. Супернатанти су разблажени 1:50 у пуферу за испирање, и засејани у 50 µl/по бунарчићу, након чега је уследила инкубација од 1 часа на собној температури. Плоче су испране снажно 3X са 250 µl пуфера за испирање по бунарчићу. Затим је додато 100 µl/по бунарчићу 2' антитела разблаженог у пуферу за испирање у односу 1:10,000, након чега је уследила инкубација од 30 min на собној температури. Плоче су затим снажно испране 3X са 250 µl пуфера за испирање по бунарчићу, затим је додато 100 µl супстрата по бунарчићу. Остављено је да се боја развије све док није била довољно тамна, затим је додато 100 µl раствора за заустављање по бунарчићу и плоче су очитане у односу на апсорпцију на 450 nm.

## Д. Проточна цитометрија

Cripto позитивне ћелијске линије могу се употребити да се тестирају моноклонална антитела на везивање Crypto користећи бојење површине ћелије и проточну цитометрију на следећи начин:

Ослободи ћелије из T162 фласкова са 2 ml PBS са 5 mM EDTA, 10 min., 37° C. Узми 20 ml са медијумом који садржи серум, испипетирај горе доле неколико пута да се раздвоје гомиле ћелија. Центрифугирај на 1200 rpm током 5 min. Испери ћелије са 5-10 ml 4°С PBS са 0.1% BSA (пуфер за испирање). Центрифугирај на 1200 rpm током 5 min. Ресуспендуј на 4x10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>/ml у пуферу за испирање. Држи на леду.

Припреми антитела за бојење. Пречишћена антитела су разблажена до 1-10 µg/ml у пуферу за испирање. Додај 50 µl ћелија у Linbro плочу од 96 бунарчића са V дном (ICN 7632105). Стави у по један бунарчић ћелије за сваку контролу за сваку ћелијску линију која треба да се анализира, укључујући ћелије за антитело, 2° антитело само, хибридома медијум, супернатант позитивног контролног антитела, ако је доступан, или пречишћен и контролу IgG субкласе (ако се користе пречишћена антитела).

Засеј по један бунарчић ћелија за сваки експериментални узорак за сваку ћелијску линију која треба да се анализира. Центрифугирај плочу на 1200 rpm током 5 min, користећи стону центрифугу на 4° C. Нагло одспи пуфер обртањем плоче и протресањем све док се течност готово потпуно не одлије. Додај 40-50 µl антители (или пуфера за испирање не-антитела и 2° антитела само контролним бунарчићима) бунарчићима. Инкубирај најмање 30 min - 1 часа на 4° C. Центрифугирај плочу на 1200 rpm током 5 min. Нагло одспи раствор антитела. Испери бунарчиће два пута са 200 µl пуфера за испирање по бунарчићу, уз центрифугирање након сваког испирања. Одспи пуфер.

Ресуспендуј ћелије у сваком бунарчићу у 50 µl од 1:200 разблажења (у пуферу за испирање) од R-PE обележеног козјег анти-миш IgG, Fc специфичног (Jackson Immunoresearch Laboratories Cat# 115-116-071). Инкубирај 20 min, 4° C у мраку. Додај 150 µl пуфера за испирање ћелија по сваком бунарчићу. Центрифугирај плочу на 1200 rpm током 5 min. Испери два пута са 200 µl



пуфера за испирање по бунарчићу. Ресуспендуј ћелије у 150  $\mu$ l 1 % PFA у PBS. Пренеси садржај сваког бунарчића у одвојене тубе (Falcon полистиренске тубе од 5 ml са округлим дном - 352052). Умотај тубе у танку фолију.

Садржај туба се затим читава путем проточне цитометрије.

Резултати два скрининга моноклоналних антитела продуктованих овим поступком дали су следеће резултате, сумиране на табелама 1 и 2 ниже, где прва колона даје означене називе за хибридома субклонове, следеће две колоне показују резултате ELISA скринова и преостале колоне показују резултате анализе проточном цитометријом за крипто-позитивне ћелијске линије. Резултати су дати у јединицама средње вредности индекса флуоресценције (MFI).

Табела 1: Карактеризација анти-Cripto моноклоналних антитела

хибридома субклон	ATCC депозитни број	ELISA Cripto delC Sups	ELISA Cripto EGF сличан домен Sups	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Контрола- ELISA		0.06	0.07				
Контрола- Мишји Ig				14	9	37	18
A6C12.11		2.21	0.07	11	35	29	8
A6F8.6	PTA-3318	2.32	0.08	11	50	29	10
A7H1.19		2.14	0.09	14	34	27	12
A8F1.30		2.15	0.1	17	27	32	28
A8G3.5	PTA-3317	2.39	0.09	9	30	25	15
A8H3.1	PTA-3315	2.4	1.7	9	44	23	10
A8H3.2		2.54	0.07	13	13	16	14
A19A10.30		2.02	0.09	9	40	20	10
A10B2.18	PTA-3311	2.36	0.07	40	63	100	43
A27F6.1	PTA-3310	2.28	1.19	9	44	26	17
A40G12.8	PTA-3316	2.27	1.59	10	47	26	16

Табела 2: Карактеризација анти-Cripto моноклоналних антитела

хибридома субклон	АТСС депозитни број	ELISA Cripto delC	ELISA Cripto EGF сличан домен	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Контрола- ELISA		0.05	0.05				
Контрола- Мишји Ig				10	6	4	6
A2D3.23		0.93	0.90	73	138	37	27
A7A10.29		1.37	0.07	75	83	33	83
A9G9.9		1.39	0.07	52	62	32	82
A15C12.10		1.42	0.06	46	55	25	93
A15E4.14		1.38	0.06	50	63	23	95
A17A2.16		1.40	0.06	76	97	41	81
A17C12.28		0.96	0.97	6	16	3	22
A17G12.1	РТА-3314	1.30	1.37	61	66	28	78
A17H6.1		1.38	0.05	35	30	5	28
A18B3.11	РТА-3312	1.36	1.38	50	42	33	65
A19E2.7		1.40	0.06	53	59	26	99
B3F6.17	РТА-3319	1.37	0.06	77	51	39	89
B6G7.10	РТА-3313	1.38	1.40	28	22	22	56
B11H8.4		1.41	0.06	59	101	39	107
B12C12.5		1.10	1.04	27	14	23	59
B15A2.6		1.40	0.06	36	44	22	59
C4A2.16		1.40	0.06	24	36	22	65

**Пример 3: Тест нулте ћелије (null cell) за инхибицију Cripto сигнализирања**

Следеће описује F9 Cripto тест сигнализирања нулте ћелије употребљен да се одреди инхибиција Cripto сигнализирања.

*Дан 0* Обложити плоче са 6 бунарчића са 0.1% желатином 2 ml/бунарчићу на 37° C 15 min. Засеј ћелије на  $6 \times 10^5$  F9 CRIPTO NULL ћелија по бунарчићу.

*Дан 1* Трансфекција:

Сваки од следећих узорака је додат у 300  $\mu$ l OptiMem1 да се добије Раствор А за сваки узорак:

Узорак 1: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе FAST репортер цДНК плус 1.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 2: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g FAST и 1  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 3: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto ADD 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 4: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto, 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 5: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto, 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 6: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto, 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 7: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto, 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 8: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Узорак 9: 0.5  $\mu$ g (N<sub>2</sub>)<sub>7</sub> луциферазе, 0.5  $\mu$ g Cripto ADD 0.5 FAST, и 0.5  $\mu$ g празног вектора цДНК.

Раствор В садржи 30  $\mu$ l Lipofectamine плус 270  $\mu$ l OptiMem1.

За сваки узорак помешај раствор А и раствор Б заједно. Инкубирај 45 min на собној температури. Испери бунарчиће са 2 ml/бунарчићу OptiMem1. Аспирирај непосредно пре следећег корака.

Додај 2.4 ml OptiMem1 свакој мешавини раствора А+В, помешај, додај 1.5 ml/бунарчићу да се удвоструче бунарчићи. Инкубирај 5 сати на 37°C. Додај 1.5 ml/бунарчићу DMEM+20% FCS, 2 mM Gln, P/S бунарчићима који су примили узорке 1-3. Додај анти-Cripto антитета на следећи начин: узорак 4 бунарчића: A27F26.1, 10 µg/ml; узорак 5 бунарчића: A27F6.1, 2 µg/ml; узорак 6 бунарчићу: A40G12.8, 10 µg/ml; узорак 7 бунарчића: A40G12.8, 2 µg/ml; узорак 8 бунарчића: A10B2.18, 10 µg/ml; узорак 9 бунарчића: A10B2.18, 2 µg/ml.

Дан 2 Уклони медијум. испери ћелије са l'US. 2 ml бунарчић. Додај DMKMf 0.5% FCS. 2 mM Gln. P/S са истим количинама Crypto антитела као и претходног дана у исте бунарчиће.

Дан 3 Развијање сигнала луциферазе. Испери бунарчиће са PBS + Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, 2 ml/бунарчићу. Употреби LucLite kit, Packard cat# 6016911. Доведи пуфер и супстрат до собне температуре. Угаси светла. Реконституиши супстрат са 10 ml пуфера. Разблажи 1:1 са PBS+ Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Аспирирај бунарчиће. Брзо додај 250 µl разблаженог супстарата по бунарчићу користећи поновљиви пипетор. Промешај раствор и пренеси 200 µl у бунарчиће на плочу са 96 бунарчића са замраченим дном, Falcon 35-3296. Очитај плочу на луминометру користећи Winglow, пребаци податке у Excel.

Резултати овог теста су сумаризовани испод у табели 3.

Табела 3: Тест Crypto сигнализирања: инхибиција са анти-Cripto моноклоналним антителима

Трансфектоване цДНК	Анти-Cripto антители	Релат. јединице луминесценције
(N2)7 luc	Ништа	123
(N2)7 luc, FAST	Ништа	259
(N2)7 luc, FAST, Crypto	Ништа	3091

(N2)7 luc, FAST, Cripto	A27F6.1 10 µg/ml	1507
(N2)7 luc, FAST, Cripto	A27F6.1 2 µg/ml	2297
(N2)7 luc, FAST, Cripto	A40G12.8 10 µg/ml	1213
(N2)7 luc, FAST, Cripto	A40G12.8 2 µg/ml	2626
(N2)7 luc, FAST, Cripto	A10B2.18 10 µg/ml	3466
(N2)7 luc, FAST, Cripto	A10B2.18 2 µg/ml	3103

#### Пример 4: Тест за инхибицију раста ћелија тумора *in vitro*

Инхибиција Cripto сигнализирања може се такође тестирати мерењем раста GEO ћелија на меком агару. Види, нпр., Ciardiello *i sar.*, *Oncogene*. 1994 Jan; 9(1): 291-8; Ciardiello *i sar.*, *CancerRes*. 1991 Feb 1; 51(3): 1051-4.

Прво, отопи 3% бакто агара. Држи на 42°C у воденом купатилу. Затим помешај 3% раствора бакто агара са претходно загрејаним комплетним медијумом да се направи раствор од 0.6% бакто агара, одржавајући га на 42°C. Нанеси на плочу 4 ml раствора у посуду од 6 cm и остави да се охлади током најмање 30 min да се оформи слој агара на дну. Трипсинизирај GEO ћелије и ресуспендуј до 105 ћелија/ml у комплетном медијуму. Додај антитела, која треба да се тестирају или контроле, суспензији ћелија, титруј антитела од 20 µg до 1 µg. Помешај подједнаке запремине суспензије GEO ћелија и 0.6% бактоагара и постави 2 ml на површину слоја агара који је на дну. Остави да се хлади најмање 1 час. Инкубирај током 14 дана на 37°C у CO2 инкубатору. Прebroј видљиве колоније без употребе микроскопа. Одсуство колонија, у поређењу са негативним контролама, назначава да третирано антитело инхибира раст ћелија тумора *in vitro*.

Овај тест је употребљен да би се добили резултати приказани у табели 4, за антитела A27F6.1 и B6G7.10, који оба показују способност да смање раст колонија GEO ћелија.

Табела 4: Резултати раста у тесту на меком агару

Антитело	Просечан број колонија
----------	------------------------

ништа	109.0
ништа	104.3
A27.F6 20 µg/ml	82.0
A27F6.1 10 µg/ml	78.3
A27F6.1 5 µg/ml	79.0
A27F6.1 1 µg/ml	108.7
B6G7.10 20 µg ml	102.3
B6G7.10 10 µg/ml	71.7

### Пример 5: Тест за Инхибицију раста ћелија тумора *in vivo*

Да се одреди инхибиција раста ћелија тумора, ћелијска линија хуманог тумора је имплантирана субкутано у атимичне голе мишеве и посматрани су ефекти антитела проналаска, са и без додатних хемотерапеутских третмана који могу обезбедити синергистичке или додатне ефекте на инхибицију тумора.

Овај оглед се може алтернативно извести користећи различите туморске ћелијске линије, као што су, на пример, GEO (добро диференцирана ћелијска линија хуманог канцера дебелог црева *in vitro*, добијена је од American Tissue Type Collection (ATCC)), DU-4475 (ћелијска линија канцера дојке *in vitro* добијена од ATCC), NCCIT (тестикуларна туморска ћелијска линија добијена од ATCC), или друге познате у пракси. Један пример таквих тестова је онај који следи:

Животиње су појединачно маркиране бушењем ушију. Ћелијска линија GEO је одгајена *in vitro* или *in vivo* током 1-4 пасажа. Животиње су имплантиране са GEO ћелијама субкутано у подручју десног бока. Могу се употребити следеће групе животиња:

Група #	Третман	# Мишева
1.	Физиолошки раствор контрола, 0.2 ml/миш, <i>i.p.</i> три пута недељно(M,W,F)	20
2.	mAb, ниска доза, <i>i.p.</i>	10
3.	mAb, средња доза, <i>i.p.</i>	10

4.	mAb, висока доза, i.p.	10
5.	5-FU, 30 mg/kg/inj, i.p., 3 Rx/wk (M,W,F)	10
6.	Cisplatin, 2 mg/kg/inj. s.c. 3 Rx/wk (M.W.F)	10
7.	Adriamicin, 1.6 mg/kg/inj, i.p., 3 Rx/wk (M.W,F)	10
8.	Irinotekan, 10 mg/kg/inj., i.p., 5 Rx/wk (M-F)	10
9.	mAb, ниска доза, i.p. + 5-FU (интермедијерна доза)	10
10.	mAb, средња доза, i.p. + 5-FU (интермедијерна доза)	10
11.	mAb, висока доза, i.p. + 5-FU (интермедијерна доза)	10
12.	mAb, ниска доза, i.p. + Cisplatin (интермедијерна доза)	10
13.	mAb, средња доза, i.p. + Cisplatin (интермедијерна доза)	10
14.	mAb, висока доза, i.p. + Cisplatin (интермедијерна доза)	10
15.	mAb, ниска доза, i.p. + Adriamicin (интермедијерна доза)	10
16.	mAb, средња доза, i.p. + Adriamicin (интермедијерна доза)	10
17.	mAb, висока доза, i.p. + Adriamicin (интермедијерна доза)	10
18.	mAb, ниска доза, i.p. + Irinotecan (интермедијерна доза)	10
19.	mAb, средња доза, i.p. + Irinotecan (интермедијерна доза)	10
20.	mAb, висока доза, i.p. + Irinotecan (интермедијерна доза)	10

Дан 0: Имплантирај тумор, забележи почетну телесну тежину животиња.

Дан 1: Започни третмане као што је назначено горе.

Дан 5: Започни мерења величине тумора и телесне тежине и продужи два пута недељно све до завршетка експеримента.

Иницијална телесна тежина, мерења величине тумора и телесне тежине, хистологија након жртвовања, и анализа имунохистохемије на туморима су испитани, анализирани за Cripto експресију, раст тумора, и њихову инхибицију.

#### **Пример 6: In vivo ксенограф туморски модел - cis-богати домен блокирајуће анти-Cripto антитело**

Да се добије одговор на NCCIT, хумана ћелијска линија карцинома тестиса је имплантирана субкутано са антителом које се везује за cis-богати домен Cripto. Експериментални поступци су набројани ниже. Резултати су приказани на слици 1.

## Поступци и материјали

Животиње: Употребљени су мужјаци атимичних голих мишева.

Животиње су појединачно нумерисане бушењем ушију.

Тумор: NCCIT, медијастиналне помешане герм ћелије хумане ћелијске линије карцинома тестиса *in vitro* American Tissue Type Collection. Ћелијска линија је одгајена *in vitro* током шест пасажа у RPMI-1640/ 10% FBS без антибиотика. Животиње су инплантиране субкутано са  $5 \times 10^6$  ћелија / 0.2 ml матригела на десни бок животиње.

Група #	Треатман	# Мишева
1.	Контролни носач, (25 mM натријум фосфата, 100 mM натријум хлорида, pH 7.2), 0.2 ml/миш. <i>i.p.</i> , Q14D третмани почињу дана -1	20
2.	A8G3.5, 1 mg/kg/inj, <i>i.p.</i> , Q14D третмани почињу дана -1 са дозом пуњења од 2.6 mg/kg/миш	10
3	A8G3.5, 3 mg/kg/inj, <i>i.p.</i> , Q14D третмани почињу дана -1 са дозом пуњења од 2.6 mg/kg/миш	10
4.	A8G3.5, 10 mg/kg/inj, <i>i.p.</i> , Q14D третмани почињу дана -1	10
5.	Cis-platinum, 2 mg/kg/inj, <i>s.c.</i> , 3 x/ ned (M, W, F) за 6 третмана Третмани почињу дана 1.	10

## Процедура тестирања

Дан -1: Раздељени су мишеви по принципу случајности у контролне групе и групе за третман. Забележена је почетна тежина животиња. Дати су први третмани групама са антителима. Направљени су раствори доза. Третмани су били слепо обележени за техничаре све док оглед није завршен.



Дан 0: Тумор је имплантиран. Постављене су бактеријске културе на тумор имплантиран у мишевима.

Дан 1: Дат је први третман позитивној хемотерапеутској групи.

Дан 4: Забележена су почетна мерења величине тумора за полазну основу на матригелу. Продужено је да се бележи величина тумора и телесне тежине на мишевима 2x / недељно. Испитивање је праћено дневно и прављене су прибелешке о неубичајеним запажањима на животињама.

Крајње тачке: Иницијална тежина тела

Величина тумора и мерења телесне тежине.

### **Пример 7: Модел ксенографт тумора *in vivo* - EFG сличан домен блокирајуће анти-Cripto антителио**

Да се утврди одговор NCCIT, ћелијска линија хуманог тестикуларног карцинома је имплантирана субкутано са антителиом које се везује за EFG-налик домен Crypto. Експериментални поступци су наведени ниже. Резултати су приказани на слици 2.

#### Поступци и материјали

Животиње: Употребљени су мужјаци атимичних голих мишева.

Животиње су појединачно нумерисане бушењем ушију.

Тумор: NCCIT, медијастиналне помешане герм ћелије хумане ћелијске линије *in vitro* карцинома тестиса су оригинално добијене од American Tissue Type Collection. Ћелијска линија је одгајена *in vitro* током осам пасажа у RPMI-1640/ 10% FBS без антибиотика. Животиње су имплантиране субкутано са 5x10<sup>6</sup> ћелија / 0.2 ml матригела на десни бок животиње.

Група #      Третман # Мишева

---

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Контролни носач, (25 mM натријум фосфата, 100 mM натријум хлорид, рН 7.2), 0.2 ml/миш, i.p., Q14D третмани почињу дана -1 | 18 |
| 2. | A27F6.1, 1 mg/kg/inj, i.p. Q14D, третмани почињу дана -1 са дозом пуњења од 2. 6 mg/kg/миш                                | 10 |
| 3. | A27F6.1, 10 mg/kg/inj, i.p, Q14D третмани почињу дана -1 са дозом пуњења од 21.2 mg/kg/миш                                | 10 |
| 4. | Cis-platinum, 2 mg/kg/inj. s.c, 3 x/нед (M,W, F) за 6 третмана<br>Третмани почињу дана 1.                                 | 10 |

#### Процедура тестирања

Дан -1: Раздељени су мишеви по принципу случајности у контролне групе и групе за третман. Забележена је почетна тежина животиња. Дати су први третмани групама са антителима. Направљени су раствори доза. Третмани су били слеп обележени за техничаре све док оглед није завршен.

Дан 0: Тумор је имплантиран. Постављене су бактеријске културе на тумор имплантиран у мишевима. Бактеријске културе су биле негативне на контаминацију на накнадним сакупљањима у 24 и 48 часова.

Дан 1: Дат је први третман позитивној хемотерапеутској групи.

Дан 4: Забележена су почетна мерења величине тумора за полазну основу на матригелу. Продужено је да се бележи величина тумора и телесне тежине на мишевима 2x / недељи. Испитивање је праћено дневно и прављене су прибелешке о неубичајеним запажањима на животињама.

Крајње тачке: Иницијална тежина тела

Величина тумора и мерења телесне тежине.

### Пример 8: Cripto mab-ови који блокирају ALK4 везивање

Са циљем да се одреди да ли Cripto-специфична моноклонална антитета могу да интерферирају са способношћу Cripto да се везује за Alk4, активин рецептор типа I, ми смо употребили анализу проточном цитометријом користећи ћелијску линију 293 која стабилно експримира Alk4. Да се генерише ова ћелијска линија, 293 ћелије су котрансфектоване са плазмидом који експримира Alk4 усмерен на С-терминус са HA епитопом и плазмид који експримира лек, пурамицин, у односу 10:1. Трансфектоване ћелије су затим селекционисане у пурамицину све док се нису формирале колоније. Колоније су затим покупљене, експандиране и затим анализирани на експресију Alk4 користећи Western Blotting анализу за HA. Нађено је да клон 21 (293-Alk4-21) експримира високе нивое Alk4 у поређењу са контролом нетрансфектованим 293 ћелијама.

Да се анализира везивање Cripto-Alk4 путем проточне цитометрије, употребљен је пречишћени, растворљиви облик хуманог Cripto (aa 1-169) фузионисан за Fc део хуманог IgG (CrdelC-Fc). Приближно 5 µg/ml CrdelC-Fc или контролног Fc протеина је инкубирано са 3x10<sup>5</sup> 293-Alk4-21 ћелија на леду током 30 minuta у 50 µl укупне запремине FACS пуфера (PBS са 0.1% BSA). За узорке који су садржали анти-Cripto антитета, 5 µg/ml CrdelC-Fc је преинкубирано са 50 µg/ml од сваког Cripto антитета (A10.B2.18, A40.G12.8, A27.F6.1, A8.H3.1, A19.A10.30, A6.F8.6, A8.G3.5, A6.C12.11) на леду пре додавања ћелијама. Ћелије су затим испране у FACS пуферу и везани Fc протеин је детектован инкубирањем ћелија са R-фикоеритерин-коњугованим козијим анти-хуманим IgG (специфични Fc фрагмент) од Jackson Immunologics. Узорци су затим поново испрани, фиксирани у 1% параформалдехиду у PBS, и анализирани стандардним процедурама проточне цитометрије. Резултати FACS теста су приказани на слици 3.

Неки од облика проналаска описаних горе истакнути су доле и укључују, али нису ограничени на, следеће облике. Као што ће они са искуством у пракси

схватити, могу се направити многобројне промене и модификације са различитим облицима проналаска. Намера је да се све такве варијације ставе у обим проналаска.

Потпис подносиоца пријаве

---

**LISTING SEKVENCI**

<110> Biogen, Inc.

Sanicola-Nadel, Michele Williams, Kevin Schiffer, Susan  
Rayhorn, Paul

<120> Antitela Koja blokiraju Cripto i njihova upotreba

<130> A117 PCT

<140> nije još određeno

<141> 2002-04-16

<150> 60/286,782

<151> 2001-04-26

<150> 60/293,020

<151> 2001-05-17

<150> 60/301,091

<151> 2001-06-26

<150> 60/367,002

<151> 2002-03-22

<160> 10

<170> FastSEQ za Windows Verzija 4.0

<210> 1

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile

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

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Met Asp Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile  
 1                      5                      10                      15

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

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                   20                                  25                                  30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
                   35                                  40                                  45  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                                  55                                  60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala  
                                   85                                  90                                  95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                                   100                                  105

<210>4

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr  
                   20                                  25                                  30  
 Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
           35                                  40                                  45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
   50                                  55                                  60  
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                                  90                                  95  
 Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                                   100                                  105                                  110  
 Thr Val Ser Ser  
                                   115

<210> 5



<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1                    5                    10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr

1                    5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala

1                    5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His

1                    5                    10

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr

1

5

**Патентни захтеви**

1. Антитело које се специфично везује за епитоп Cripto који је садржан у домену који обухвата аминокиселинске остатке од 46 до 62 аминокиселине у SEQ ID NO: 1 или 2, назначено тиме што антитело обухвата три CDR региона лаког ланца где је CDR1 са SEQ ID NO 5, CDR2 са SEQ ID NO 6 и CDR3 са SEQ ID NO 7, и три CDR региона тешког ланца где је CDR1 дат у SEQ ID NO 8, CDR2 је дат у SEQ ID NO 9 и CDR3 је дат у SEQ ID NO 10.
2. Антитело према захтеву 1, назначено тиме што обухвата варијабилни регион лаког ланца са SEQ ID NO 3 и варијабилни регион тешког ланца са SEQ ID NO 4.
3. Антитело према захтеву 1, назначено тиме што је то антитело које продукује хибридома В3F6.17 са АТСС приступним бројем РТА-3319.
4. Антитело према захтеву 1-3, назначено тиме што је способно да интернализује Cripto.
5. Антитело према било ком од захтева 1-4, назначено тиме што је антитело фрагмент одабран из групе која се састоји од Fab, Fab' и F(ab)<sub>2</sub> фрагмента.
6. Антитело према било ком од захтева 1-4, назначено тиме што је антитело пуне дужине.
7. Антитело према било ком од захтева 1-4, назначено тиме што је антитело појединачног ланца.
8. Антитело према било ком од захтева 1-7, назначено тиме што је коњуговано за хемотерапеутик.
9. Антитело према захтеву 8, назначено тиме што је хемотерапеутски агенс одабран из групе која се састоји из тумор активираних пролека,

радионуклида и токсина који је изабран из групе која се састоји од рицина, токсина дифтерије и егзотоксина псеудомонаса.

10. Антитело према захтеву 8-9, назначено тиме што је хемотерапеутик маитансиноид.
11. Антитело према било ком од захтева 1-10, назначено тиме што је човечије.
12. Антитело према било ком од захтева 1-11, назначено тиме што је моноклонално.
13. Антитело према било ком од захтева 1-12, назначено тиме што је хуманизовано.
14. Фармацеутски препарат, назначен тиме што садржи најмање једно од антитела према било ком од захтева 1-13 и опционо носач.
15. Фармацеутски препарат према захтеву 14, назначен тиме што даље садржи некоњуговани хемотерапеутик.
16. Фармацеутски препарат према захтеву 14 или 15, назначен тиме што је антитело хуманизовани В3F6.17 из хибридома са АТСС приступним бројем РТА-3319.
17. Антитело према било ком од захтева 1-13 или фармацеутски препарат према било ком од захтева 14-16, за употребу као лек.
18. Антитело према било ком од захтева 1-13 или фармацеутски препарат према било ком од захтева 14-16, за употребу за смањење раста тумора.
19. Антитело или фармацеутски препарат за употребу према захтеву 18 назначено тиме да је туморска ћелија одабрана из групе која се састоји из туморских ћелија дојке, тестиса, дебелог црева, плућа, оваријума, мокраћне бешике, утеруса, цервикса, панкреаса и желуца.

Потпис подносиоца пријаве

---

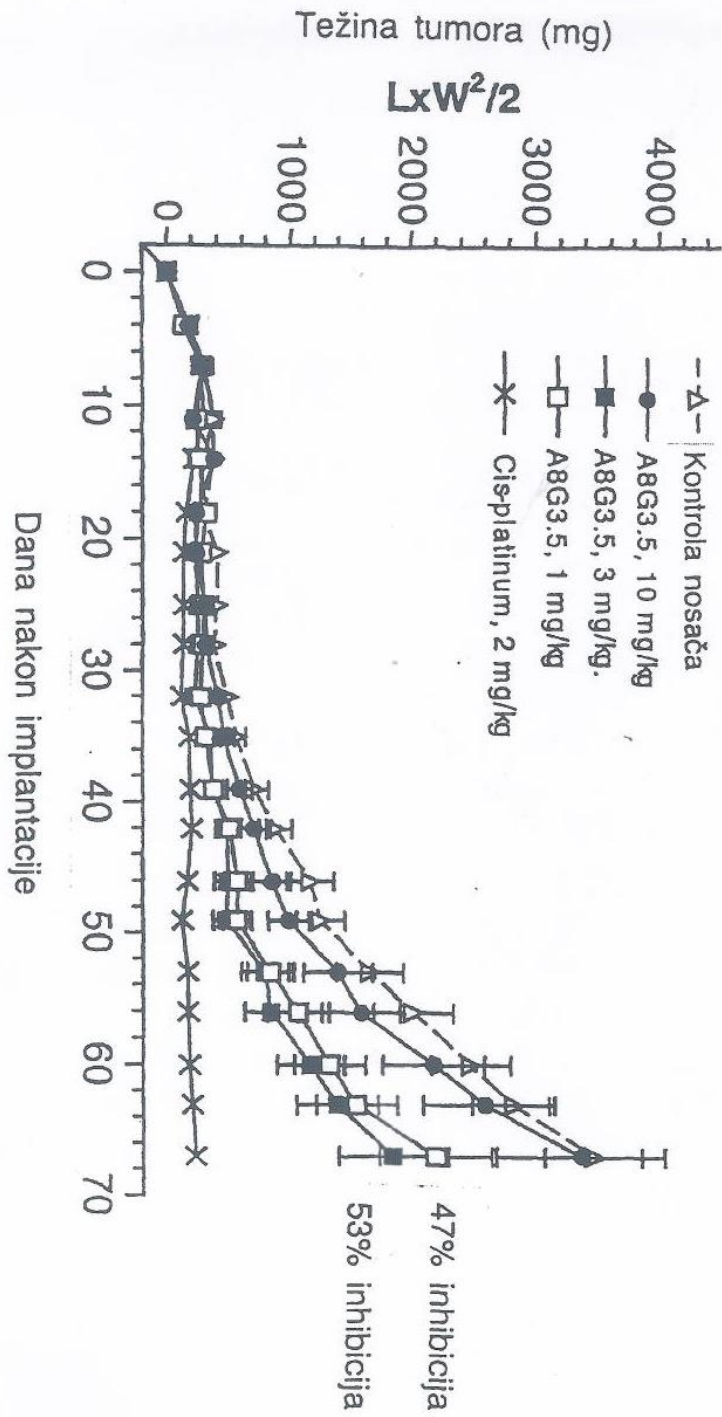
**Апстракт**

Предметни проналазак се односи на антитело које се специфично везује за епитоп Cripto који је садржан у домену који обухвата аминокиселинске остатке од 46 до 62 аминокиселине у SEQ ID NO: 1 или 2. Проналазак се даље односи на фармацеутски препарат, који садржи најмање једно од антитела и опционо носач. Проналазак се такође односи и на употребу антитела или препарата за припремање фармацеутског препарата за смањење раста тумора, као и за третман нежељене пролиферације ћелија. На крају предметни проналазак се односи и на поступак за регулисање раста ћелија тумора *in vitro* у узорку.

Потпис подносиоца пријаве

---

---



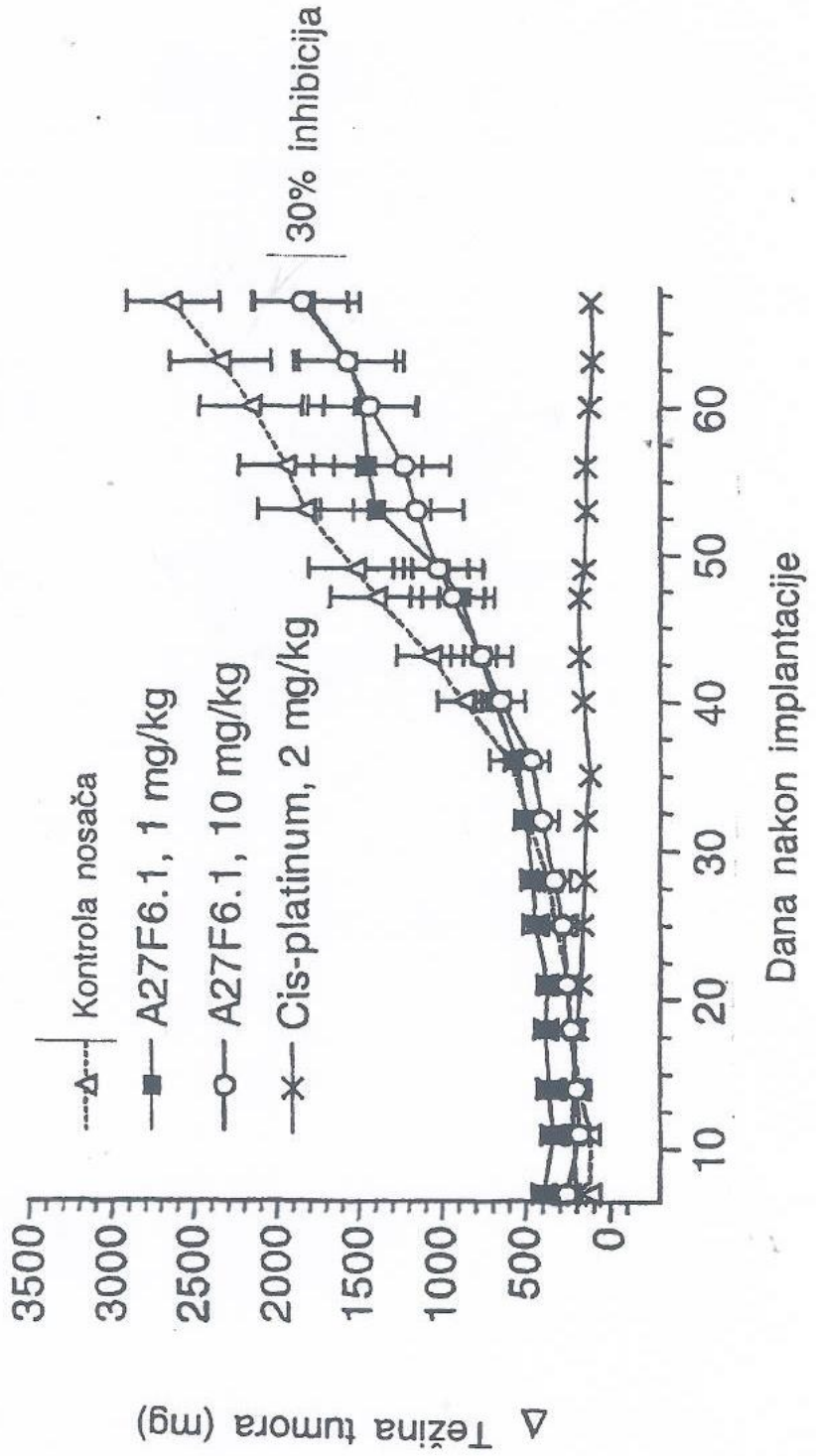
Slika 1

Odgovor NCCIT, ćelijske linije humanog  
 Testikularnogkarcinoma, na anti-CFC  
 blokiranje Stripo mAb A8G3.5

Потпис подносиоца пријаве

Slika 2

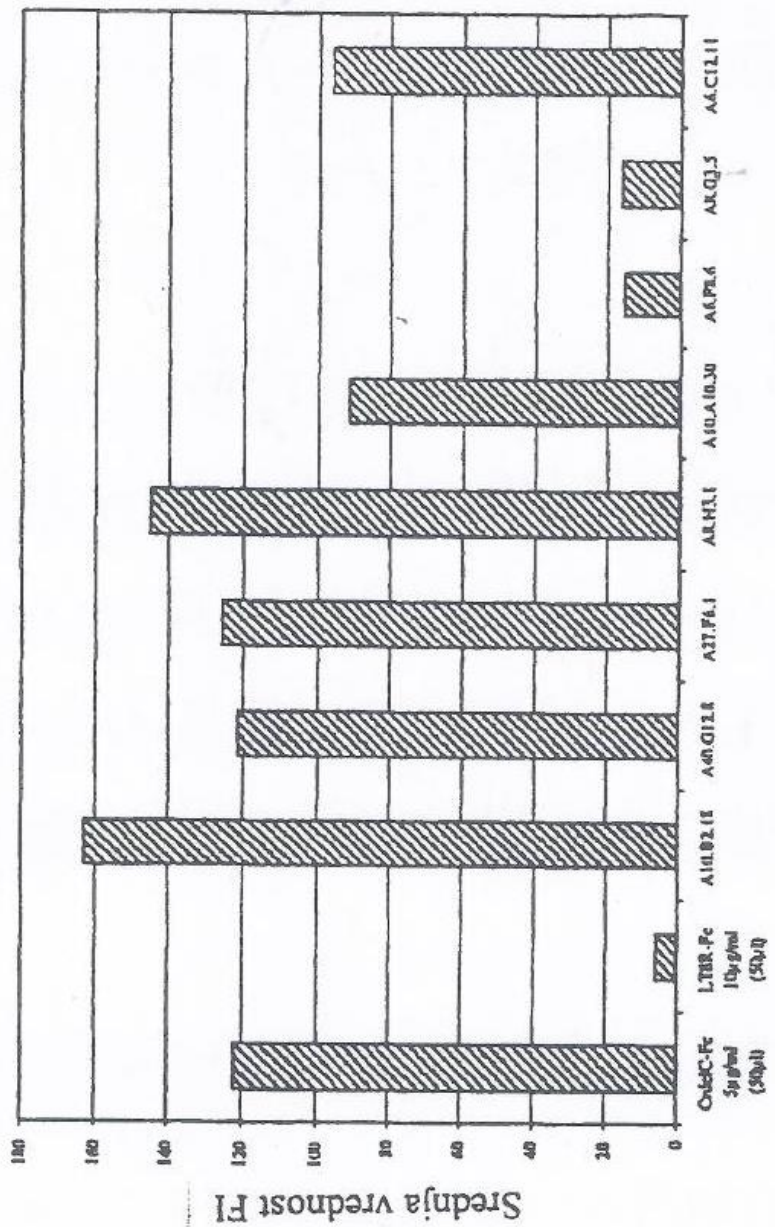
Odgovor NCCIT, ćelijske linije humanog Testikulamogkarcinoma, na anti-EGF blokiranje Cripto mAb A27F6.1



Потпис подносиоца пријаве

Slika 3

# FACS: 293/ALK4 ćelija koje vezuju CR-Fc



Потпис подносиоца пријаве

---