

(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2016-510411

(P2016-510411A)

(43) 公表日 平成28年4月7日(2016.4.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/68	2 G045
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4 B063
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4 C084
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D 4 C085
A61K 31/663 (2006.01)	A61K 39/395	N 4 C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-556203 (P2015-556203)	(71) 出願人	308031072 オンコメッド ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッドシティ チェサピーク ドライブ 800
(86) (22) 出願日	平成26年2月3日 (2014.2.3)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成27年9月29日 (2015.9.29)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/014443	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02014/121196	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成26年8月7日 (2014.8.7)		
(31) 優先権主張番号	61/760,523		
(32) 優先日	平成25年2月4日 (2013.2.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 WNT経路インヒビターによる処置の方法およびモニタリング

(57) 【要約】

Wnt経路インヒビターを単独で、または他の抗がん剤と組み合わせて投与する工程を含む、がんなどの疾患を処置するための方法、ならびに骨格関連の副作用および/または毒性についてモニタリングするための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および
 (b) 該骨吸収バイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、該対象をWnt経路インヒビターによる処置のために選択する工程
 を含む、Wnt経路インヒビターによる処置のために対象を選択する方法であって、Wnt経路インヒビターが
 (i) 少なくとも1種のfrizzled (FZD) タンパク質に特異的に結合する抗体、または
 (ii) ヒトFZD8のFriドメインを含む可溶性受容体
 である、方法。

10

【請求項 2】

(a) 対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および
 (b) 該骨吸収バイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、該対象を、Wnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する工程
 を含む、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する方法であって、Wnt経路インヒビターが
 (i) 少なくとも1種のfrizzled (FZD) タンパク質に特異的に結合する抗体、または
 (ii) ヒトFZD8のFriドメインを含む可溶性受容体
 である、方法。

20

【請求項 3】

骨吸収バイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、対象にWnt経路インヒビターを投与する工程を含む、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

(a) 対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および
 (b) 該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程
 を含む、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を同定するための方法であって、該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが該所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される、方法。

30

【請求項 5】

(a) 対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および
 (b) 該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程
 を含む、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性をモニタリングするための方法であって、該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが該所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される、方法。

【請求項 6】

骨吸収バイオマーカーが -CTXである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7】

-CTXの所定のレベルが、
 (a) 以前の時点において決定された -CTXのレベル、
 (b) 初期スクリーニングにおいて決定された -CTXのレベル、
 (c) 処置に先だって決定された -CTXのレベル、
 (d) ベースラインレベル、または
 (e) 約1000pg/ml以下

である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

骨吸収バイオマーカーレベルが

50

- (a) いずれか一つの試料について、所定のレベルを上回っているか、または
- (b) 所定のレベルを2倍以上上回っている

場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される、請求項4～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

- (a) 対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、
 - (b) 該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、および
 - (c) 該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが該骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、該対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程
- を含む、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を低減するための方法。

10

【請求項 10】

- (a) Wnt経路インヒビターによる処置に先だって、対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、
 - (b) 該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、
 - (c) 該対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程、および
 - (d) 該対象にWnt経路インヒビターを投与する工程
- を含む、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を防止または減弱する方法。

20

【請求項 11】

- (a) 対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および
 - (b) 該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程であって、該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが該骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、該対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある、工程
- を含む、Wnt経路インヒビターによる処置からの骨格関連の副作用および/または毒性のリスクについて対象をスクリーニングする方法。

30

【請求項 12】

- (a) 対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、および
 - (b) 該対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程
- を含む、がんの処置を必要とする対象においてがんを処置する方法。

【請求項 13】

- (c) 試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程であって、該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが該骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/もしくは毒性のリスクがある、工程、または

- (c) 試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程であって、該試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが該骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される、工程

40

をさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

生物学的試料が血液、血清、または血漿である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

骨吸収バイオマーカーが -CTX である、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

-CTX レベルが所定のレベルと比較して2倍以上である場合に、対象に治療有効量の骨

50

吸收抑制薬が投与される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある場合に、該対象に、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって、治療有効量の骨吸收抑制薬が投与される、請求項11または請求項13に記載の方法。

【請求項 18】

Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を低減するための方法であって、対象に治療有効量の骨吸收抑制薬を投与する工程を含む、方法。

【請求項 19】

Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を防止または減弱する方法であって、対象に治療有効量の骨吸收抑制薬を投与する工程を含む、方法。

10

【請求項 20】

骨格関連の副作用および/または毒性が、骨折、骨減少症、または骨粗鬆症のリスクの増加である、請求項4～11または13～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

Wnt経路インヒビターが

(a)

GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)

20

を含む重鎖CDR1、

VISGDGGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

を含む重鎖CDR2、および

NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR3、ならびに

(b)

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

を含む軽鎖CDR1、

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、および

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR3

を含む抗体である、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 22】

Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:7を含む重鎖可変領域と、SEQ ID NO:8を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

抗体が、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、または抗原結合部位を含む抗体フラグメントである、請求項21または請求項22に記載の方法。

40

【請求項 24】

Wnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法

。

【請求項 25】

Wnt経路インヒビターが、ヒトFZD8タンパク質のFriドメインを含む可溶性受容体である、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

ヒトFZDタンパク質のFriドメインがSEQ ID NO:20を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

50

可溶性受容体がヒトFc領域を含む、請求項25または請求項26に記載の方法。

【請求項28】

Wnt経路インヒビターがSEQ ID NO:41を含む、請求項1～20または25～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

Wnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28である、請求項1～20または25～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

骨吸収抑制薬がビスホスホネートまたはデノスマブである、請求項8～10または13～29のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項31】

ビスホスホネートが、ゾレドロン酸、エチドロネート、クロドロネート、チルドロネート、パミドロネート、ネリドロネート(neridronate)、オルパドロネート(olpadronate)、アレンドロネート、イバンドロネート、およびリセドロネートからなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

対象ががんを有する、請求項1～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

がんが、肺がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、膵がん、胃腸がん、腎がん(renal cancer)、卵巣がん、神経内分泌がん、肝がん、子宮内膜がん、腎がん(kidney cancer)、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、神経膠腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、胃がん、膀胱がん、ヘパトーマ、および頭頸部がんからなる群より選択される、請求項32に記載の方法。

20

【請求項34】

対象が、1種または複数種の追加の抗がん剤と組み合わされたWnt経路インヒビターで処置される、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

骨格関連の副作用および/または毒性がWnt経路インヒビターに関係する、請求項4～11または13～34のいずれか一項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2013年2月4日に出願された米国仮出願第61/760,523号の優先権の恩典を主張し、これにより、前記仮出願は参照により本明細書にそのまま組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、Wnt経路インヒビターで疾患を処置する分野に関する。より具体的には、本発明は、Wnt経路インヒビターを単独で、または他の抗がん剤と組み合わせて投与する工程を含む、がんを処置するための方法、ならびに副作用および/または毒性をモニタリングするための方法を提供する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

がんは先進諸国における主な死亡原因の一つであり、米国だけで毎年100万人を越える人々ががんと診断され、500,000人が死亡している。全体として、3人に1人以上がその生涯のうちに何らかの形態のがんを発生させると見積もられる。がんには200を越える異なるタイプがあり、そのうちの4つ、すなわち乳がん、肺がん、結腸直腸がん、および前立腺がんが、全新規症例のほとんど半分を占める(Siegel et al., 2011, CA: A Cancer J. Clin. 61:212-236(非特許文献1))。

50

【0004】

シグナリング経路は、通常、細胞外のシグナルを核へと接続することで、細胞の成長、分化、生存、および死を直接的または間接的に制御する遺伝子の発現につながる。多種多様ながんにおいて、シグナリング経路は調節不全を起こしており、腫瘍のイニシエーションおよび/または進行と関連づけることができる。ヒト腫瘍形成と関係があるとされているシグナリング経路には、Wnt経路、Ras-Raf-MEK-ERK経路すなわちMAPK経路、PI3K-AKT経路、CDKN2A/CDK4経路、Bcl-2/TP53経路、およびNotch経路などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0005】

Wntシグナリング経路は、がん治療法の潜在的ターゲットと同定されている。Wntシグナリング経路は、胚パターン形成、後胚期の組織維持、および幹細胞生物学のいくつかの決定的調節因子の一つである。より具体的に述べると、Wntシグナリングは、細胞極性の生成および幹細胞集団による自己再生を含む細胞運命指定に、重要な役割を果たす。Wnt経路の無秩序な活性化は数多くのヒトがんと関連し、そのようなヒトがんでは、その活性化が細胞の発生運命を変化させうると考えられる。Wnt経路の活性化は腫瘍細胞を未分化状態に維持し、かつ/または無制御な増殖につながる。こうして、正常な発生および組織修復を制御するホメオスタシス機構を凌駕することによって、発がんが進行しうる(Reya & Clevers, 2005, *Nature*, 434:843-50(非特許文献2); Beachy et al., 2004, *Nature*, 432:324-31(非特許文献3)に総説がある)。

10

【0006】

Wntシグナリング経路は、最初は、ショウジョウバエ(*Drosophila*)発生ミュータントwingless(*wg*)において、またマウスがん原遺伝子int-1(現在はWnt1)から解明された(Nusse & Varmus, 1982, *Cell*, 31:99-109(非特許文献4); Van Ooyen & Nusse, 1984, *Cell*, 39:233-40(非特許文献5); Cabrera et al., 1987, *Cell*, 50:659-63(非特許文献6); Rijsewijk et al., 1987, *Cell*, 50:649-57(非特許文献7))。Wnt遺伝子は分泌脂質修飾糖タンパク質をコードし、そのうちの19種類が哺乳動物において同定されている。これらの分泌リガンドは、Frizzled(FZD)受容体ファミリーメンバーと低密度リポタンパク質(LDL)受容体関連タンパク質5または6(LRP5/6)とからなる受容体複合体を活性化する。FZD受容体はGタンパク質共役受容体(GPCR)スーパーファミリーの7回膜貫通ドメインタンパク質であって、10個の保存されたシステインを持つ大きな細胞外N末端リガンド結合ドメインを含有しており、このドメインはシステインリッチドメイン(CRD)またはFrzドメインと呼ばれている。ヒトFZD受容体には、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10の10種類がある。異なるFZD CRDは特異的Wntタンパク質に対して異なる結合アフィニティを有し(Wu & Nusse, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:41762-9(非特許文献8))、FZD受容体は古典的-カテニン経路を活性化するものと、非古典的経路を活性化するものとに分類されている(Miller et al., 1999, *Oncogene*, 18:7860-72(非特許文献9))。

20

30

【0007】

がんにおけるWntシグナリングの役割は、マウスウイルスの近傍挿入によって形質転換された乳房腫瘍において、Wnt1(元々はint1)ががん遺伝子として同定されたことで、初めて明らかになった(Nusse & Varmus, 1982, *Cell*, 31:99-109(非特許文献4))。それ以来、乳がんにおけるWntシグナリングの役割を示すさらなる証拠が蓄積してきた。例えば、乳腺における-カテニンのトランスジェニック過剰発現は過形成および腺癌をもたらし(Imbert et al., 2001, *J. Cell Biol.*, 153:555-68(非特許文献10); Michaelson & Leder, 2001, *Oncogene*, 20:5093-9(非特許文献11))、一方、Wntシグナリングの喪失は正常な乳腺発生を妨害する(Tepera et al., 2003, *J. Cell Sci.*, 116:1137-49(非特許文献12); Hatsell et al., 2003, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 8:145-58(非特許文献13))。ヒト乳がんでは、-カテニン蓄積が、50%を越える癌において、活性化されたWntシグナリングを暗に示し、特異的変異は同定されていないものの、Frizzled受容体発現の上方制御が観察されている(Brennan & Brown, 2004, *J. Mammary Gland*

40

50

Biol. Neoplasia, 9:119-31 (非特許文献14) ; Malovanovic et al., 2004, Int. J. Oncol, 25:1337-42 (非特許文献15))。

【0008】

Wnt経路の活性化は結腸直腸がんとも関連する。全結腸直腸がんの約5~10%が遺伝性であり、その主要形態の一つは家族性大腸腺腫症(FAP)である。これは、常染色体優性疾患であり、罹患個体の約80%は、大腸腺腫症(APC)遺伝子に生殖細胞系変異を含有している。変異は、アキシンや β -カテニンを含む他のWnt経路構成要素にも同定されている。個々の腺腫は第2の不活性化アレルを含有する上皮細胞のクローニング増殖物であり、多数のFAP腺腫がん遺伝子および/または腫瘍抑制遺伝子の付加的変異により、不可避的に腺癌の発生をもたらす。さらにまた、APCにおける機能喪失型変異や β -カテニンにおける安定化型変異を含むWntシグナリング経路の活性化は、マウスモデルにおいて過形成発生と腫瘍成長を誘発することができる(Oshima et al., 1997, Cancer Res., 57:1644-9 (非特許文献16) ; Harada et al., 1999, EMBO J., 18:5931-42 (非特許文献17))。

10

【0009】

乳がんおよび結腸がんと同様に、メラノーマでも、 β -カテニンの核内蓄積によって示されるとおり、Wnt経路が構成的に活性化していることが多い。一部のメラノーマ腫瘍およびメラノーマ細胞株におけるWnt/ β -カテニン経路の活性化は、APC、ICAT、LEF1および β -カテニンなどといった経路構成要素における修飾によるものである(例えばLarue et al., 2006, Frontiers Biosci., 11:733-742 (非特許文献18) を参照されたい)。しかし、メラノーマにおけるWnt/ β -カテニンシグナリングの正確な役割については、相反する報告が文献にある。例えば、ある研究では、核内 β -カテニンレベルの上昇がメラノーマからの生存率の改善と相關すること、および活性化されたWnt/ β -カテニンシグナリングが細胞増殖の減少と関連することが見いだされた(Chien et al., 2009, PNAS, 106:1193-1198 (非特許文献19))。

20

【0010】

化学療法は数多くのがんに対して確立された治療アプローチであるが、その有効性は副作用および/または毒性による制約を受ける場合がある。加えて、抗ErbB2受容体(HER2)抗体トラスツズマブ(HERCEPTIN)、チロシンキナーゼインヒビターイマチニブ(GLEEVEC)、ダサチニブ(SPRYCEL)、ニロチニブ(nilotinib)(TASIGNA)、スニチニブ(SUTENT)、ソラフェニブ(NEXAVAR)、抗VEGF抗体ベバシズマブ(AVASTIN)、ならびに抗血管新生薬スニチニブ(SUTENT)およびソラフェニブ(NEXAVAR)などの標的療法は、それらの投与を受けた対象において副作用および/または毒性を引き起こすことが知られているか、副作用および/または毒性を引き起こす可能性が高い。したがって、有効ながん治療を続けることができるように、薬剤性副作用を同定し、それらの副作用をモニタリングし、かつ/またはそれらの副作用を緩和するための新しい方法が、依然として必要とされている。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Siegel et al., 2011, CA: A Cancer J. Clin. 61:212-236

40

【非特許文献2】Reya & Clevers, 2005, Nature, 434:843-50

【非特許文献3】Beachy et al., 2004, Nature, 432:324-31

【非特許文献4】Nusse & Varmus, 1982, Cell, 31:99-109

【非特許文献5】Van Ooyen & Nusse, 1984, Cell, 39:233-40

【非特許文献6】Cabrera et al., 1987, Cell, 50:659-63

【非特許文献7】Rijsewijk et al., 1987, Cell, 50:649-57

【非特許文献8】Wu & Nusse, 2002, J. Biol. Chem., 277:41762-9

【非特許文献9】Miller et al., 1999, Oncogene, 18:7860-72

【非特許文献10】Imbert et al., 2001, J. Cell Biol., 153:555-68

【非特許文献11】Michaelson & Leder, 2001, Oncogene, 20:5093-9

50

【非特許文献 12】Tepera et al., 2003, J. Cell Sci., 116:1137-49

【非特許文献 13】Hatsell et al., 2003, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 8:145-58

【非特許文献 14】Brennan & Brown, 2004, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 9:119-31

【非特許文献 15】Malovanovic et al., 2004, Int. J. Oncol., 25:1337-42

【非特許文献 16】Oshima et al., 1997, Cancer Res., 57:1644-9

【非特許文献 17】Harada et al., 1999, EMBO J., 18:5931-42

【非特許文献 18】Larue et al., 2006, Frontiers Biosci., 11:733-742

【非特許文献 19】Chien et al., 2009, PNAS, 106:1193-1198

10

【発明の概要】

【0012】

本発明は、治療有効量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程を含む、疾患を処置するための改良された方法を提供する。例えば、一局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置に関係する骨格関連の副作用および/または毒性を検出し、同定し、モニタリングし、低減し、防止し、減弱し、かつ/または緩和するためのスクリーニングの方法を提供する。いくつかの態様では、本方法は、例えば限定するわけではないが抗Frizzled (FZD) 抗体または可溶性FZD受容体などといったWnt経路インヒビターによる初回処置または追加処置を受けた、またはそのような処置を受けている、またはそのような処置を受ける予定である、またはそのような処置が検討されている患者からの試料における骨代謝回転マーカーのレベルを決定する工程を含む。

20

【0013】

別の局面において、本発明は、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する:対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびバイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する工程。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する方法が、以下の工程を含む:対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および骨吸収バイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する工程。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがコラーゲン1型架橋C-テロペプチド (-CTX) である。

30

【0014】

一局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象を、骨格関連の副作用および/または毒性の発生についてモニタリングする方法であって、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、バイオマーカーのレベルの増加が、骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す、方法を提供する。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象を、骨格関連の副作用および/または毒性の発生についてモニタリングする方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、骨吸収バイオマーカーのレベルの増加が、骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXである。

40

【0015】

別の局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象にお

50

ける骨格関連の副作用および/または毒性の発生を検出する方法であって、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、バイオマーカーのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す、方法を提供する。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を検出する方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、骨吸収バイオマーカーのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXである。

10

【0016】

別の局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を同定するための方法であって、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される、方法を提供する。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を同定するための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXである。

20

【0017】

別の局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性をモニタリングするための方法であって、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される、方法を提供する。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性をモニタリングするための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXである。

30

【0018】

本明細書に記載する方法のいくつかの局面および/または態様では、試料中の骨吸収バイオマーカーレベル（例えば -CTX）が、所定のレベルと比較して2倍以上増加している場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXであり、所定のレベルが約1000pg/ml未満である。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

40

【0019】

50

別の局面において、本発明はWnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を低減する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する:処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、および試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程。いくつかの態様では、吸收バイオマーカーが、骨吸収バイオマーカーの所定のレベルの約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、または約3倍以上である。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

10

【0020】

別の局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を防止または減弱する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する:Wnt経路インヒビターによる処置に先だって対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程、および対象にWnt経路インヒビターを投与する工程。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

20

【0021】

別の局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターを投与された対象における骨格関連の副作用および/または毒性を改善する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する:試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

【0022】

別の局面において、本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置からの骨格関連の副作用および/または毒性のリスクについて対象をスクリーニングする方法であって、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある、方法を提供する。いくつかの態様では、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある場合に、対象に、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって、治療有効量の、骨格関連の副作用および/または毒性に対する治療剤を投与する。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、骨格関連の副作用に対する治療剤がビスホスホネートである。

30

【0023】

別の局面において、本発明は、対象におけるがんを処置する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する:対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、および対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程。いくつかの態様では、がんを処置する方法がさらに、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含む。いくつかの態様では、がんを処置する方法がさらに、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある。いくつかの態様では、がんを処置する方法がさらに、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTX

40

50

である。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

【0024】

別の局面において、本発明は、対象における腫瘍成長を阻害する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する：対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、および対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法がさらに、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含む。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法がさらに、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法がさらに、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

10

【0025】

本明細書に記載する方法のいくつかの局面および/または態様では、生物学的試料が、血液、血清、または血漿である。いくつかの態様では、生物学的試料が「空腹時試料」である。本明細書にいう「空腹時試料」とは、少なくとも9~12時間は飲食を一切していない個体から採取された試料を指す。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において約1500pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において約1200pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において約1000pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において約800pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において約600pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において約400pg/ml以下である。いくつかの態様では、バイオマーカー（例えば骨代謝回転マーカー）の所定のレベルが、以前の日に得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー（例えば骨代謝回転マーカー）の所定のレベルが、処置に先だって得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー（例えば骨代謝回転マーカー）の所定のレベルが、初期スクリーニング時に得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー（例えば骨代謝回転マーカー）の所定のレベルが正常基準レベルである。いくつかの態様では、バイオマーカーの所定のレベルが、ベースラインレベルである。いくつかの態様では、ベースラインレベルが、初期スクリーニングにおいて（例えば処置に先だって）決定されたバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、-CTXに関する所定のレベルが、血液、血清、または血漿において約1000pg/ml以下である。

20

【0026】

本明細書に記載する方法のいくつかの局面および/または態様では、生物学的試料が、ほぼ1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、または6週間ごとに得られる。

30

【0027】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトWntタンパク質に特異的に結合する抗体である。抗Wnt抗体の非限定的な例は、例えば米国特許出願公開第2012/0027778号および国際公開公報第2011/088127号に記載されている。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトFZDタンパク質に特異的に結合する抗体である。抗FZD抗体の非限定的な例は、例えば米国特許第7,982,013号に記載されている。いくつかの態

40

50

様では、Wnt経路インヒビターが可溶性FZD受容体である。可溶性FZD受容体の非限定的な例は、例えば米国特許第7,723,477号および同第8,324,361号ならびに米国特許出願公開第2011/0305695号に記載されている。

【0028】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、(a)
GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)
を含む重鎖CDR1、

VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

を含む重鎖CDR2、および

NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR3、および/または(b)

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

を含む軽鎖CDR1、

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、および

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

10

【0029】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Wnt経路インヒビターが、(a) SEQ ID NO:7に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/または(b) SEQ ID NO:8に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である。

20

【0030】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Wnt経路インヒビターが組換え抗体である。いくつかの態様では、抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。いくつかの態様では、抗体が、抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。一定の態様では、抗体または抗体フラグメントが一価、単一特異性、または二価である。いくつかの態様では、抗体が二重特異性抗体または多重特異性抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG1抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG2抗体である。一定の態様では、抗体が単離されている。別の態様では、抗体が実質的に純粋である。

30

【0031】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトFZDに約10nM～約0.1nMの解離定数(K_D)で結合する抗体である。

【0032】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ATCCに寄託された受託番号PTA-9541のプラスミドがコードする抗体と同じ重鎖および軽鎖アミノ酸配列を含む。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ATCCに寄託された受託番号PTA-9541のプラスミドがコードする抗体と同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域アミノ酸を含む。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ブダペスト条約の規定に基づいて2008年9月29日に、20110バージニア州マナサス、ユニバーシティ・ブルーバード10801にあるAmerican Type Culture Collection (ATCC)に寄託された、ATCC受託番号PTA-9541のプラスミドによってコードされている。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ATCCに寄託された受託番号PTA-9541のプラスミドがコードする抗体と、ヒトFZDへの特異的結合に関して競合する。

40

【0033】

本明細書に記載する方法の局面および/または態様のいずれかにおいて、対象はがんを有する。いくつかの態様では、がんが、肺がん、膵がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、胃腸がん、胃がん(gastric cancer)、腎がん(renal cancer)、卵巣

50

がん、肝がん、子宮内膜がん、腎がん (kidney cancer)、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、神経膠腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、胃がん (stomach cancer)、膀胱がん、ヘパトーマ、肝細胞癌 (HCC)、神経内分泌がん、甲状腺がん、腺癌、および頭頸部がんからなる群より選択される。いくつかの態様では、がんが乳がんである。いくつかの態様では、がんが肺がんである。いくつかの態様では、がんが肺がんである。いくつかの態様では、がんが非小細胞肺がん (NSCLC) である。いくつかの態様では、がんが卵巣がんである。いくつかの態様では、がんが肝がんである。いくつかの態様では、がんがHCCである。

【0034】

本明細書に記載する方法の局面および/または態様のいずれかにおいて、対象は、1種または複数種の追加の抗がん剤と組み合わされたWnt経路インヒビターで処置される。いくつかの態様では、1種または複数種の追加の抗がん剤が化学療法剤である。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がパクリタキセルまたはアルブミン結合型パクリタキセルである。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がゲムシタビンである。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がゲムシタビンおよびアルブミン結合型パクリタキセルである。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がドセタキセルである。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がカルボプラチニンである。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がカルボプラチニンおよびパクリタキセルまたはアルブミン結合型パクリタキセルである。いくつかの態様では、追加の抗がん剤がソラフェニブである。

【0035】

本発明の局面または態様が、マーカッシュ群または他の選択肢の群の形で記載されている場合、本発明は、列挙された群全体をまとめて包含するだけではなく、その群の各メンバーも個別に包含し、主群の考えうる部分群も全て包含し、群のメンバーの1つまたは複数を欠く主群も包含する。本発明は、請求項に記載の発明における群メンバーのいずれかの1つまたは複数の明示的な排除も、想定している。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】Wnt経路インヒビターの間欠的投薬によるインビボでの乳房腫瘍成長の阻害。マウスを、パクリタキセル (- -)、パクリタキセルと組み合わせた5mg/kgのOMP-18R5 (- -)、パクリタキセルと組み合わせた10mg/kgのOMP-18R5 (- -)、パクリタキセルと組み合わせた25mg/kgのOMP-18R5 (- -)、またはパクリタキセルと組み合わせた45mg/kgのOMP-18R5 (- -)で処置した。処置後の日数に対する腫瘍体積 (mm³) としてデータを示す。OMP-18R5は、3週間ごとに1回 (矢印で示す) に腹腔内投与し、パクリタキセルは1週間に1回、10mg/kgで投与した。

【図2】Wnt経路インヒビターの間欠的投薬によるインビボでの乳房腫瘍成長の阻害。マウスを、パクリタキセル (- -)、パクリタキセルと組み合わせた4週間ごとに1回の25mg/kgのOMP-18R5 (- -)、パクリタキセルと組み合わせた2週間ごとに1回の25mg/kgのOMP-18R5 (- -)、またはパクリタキセルと組み合わせた1週間に1回の25mg/kgのOMP-18R5 (- -)で処置した。処置後の日数に対する腫瘍体積 (mm³) としてデータを示す。OMP-18R5は腹腔内投与し、パクリタキセルは1週間に1回、15mg/kgで投与した。

【図3】マウスにおける骨形成に対するOMP-18R5の効果。

【図4】OMP-18R5で処置したマウスにおける骨形成に対するゾレドロン酸の効果。

【発明を実施するための形態】

【0037】

発明の詳細な説明

本発明は、Wnt経路インヒビターによる疾患の処置に関する。より具体的には、本発明は、Wnt経路インヒビターを単独で、または他の抗がん剤と組み合わせて投与する工程を含む、がんを処置するための方法、ならびにWnt経路インヒビターに関係するものを含む骨格関連の副作用および/または毒性に関してモニタリングするための方法を提供する。

【0038】

10

20

30

40

50

抗FZD抗体OMP-18R5が、第Ia相単剤用量漸増治験において、被験者に投与された。この初期治験からのデータは、動物試験からの結果と共に、抗FZD抗体またはFZD8-Fc可溶性受容体などのWnt経路インヒビターの投与が、一定の患者において骨格関連の副作用および/または毒性をもたらしうることを示唆した。さらにまた、この第Ia相試験では、増加した-CTXレベルが、Wnt経路インヒビターで処置されている患者に骨格関連の副作用および/または毒性を発生するリスクがあることの早期指標になって、適当な薬による介入を可能にしうることが示された。

【0039】

これらの結果から、単剤としての、または追加の抗がん剤と組み合わされた、Wnt経路インヒビター（例えば抗FZD抗体または可溶性FZD受容体）による処置を受けている対象について、本明細書に記載するように、骨格関連の副作用および/または毒性に関するリスクを緩和しモニタリングする戦略を開発することが望ましくなった。

10

【0040】

I. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および表現を以下に定義する。

【0041】

本明細書において使用する「アンタゴニスト」および「アンタゴニスト性」という用語は、ターゲットおよび/またはシグナリング経路（例えばWnt経路）の生物学的活性を部分的または完全に遮断し、阻害し、低減し、または中和する任意の分子を指す。「アンタゴニスト」という用語は、本明細書においては、タンパク質（例えばFZDタンパク質またはWntタンパク質）の活性を部分的または完全に遮断し、阻害し、低減し、または中和する任意の分子を包含するために使用される。適切なアンタゴニスト分子には、具体的には、アンタゴニスト抗体、抗体フラグメント、可溶性受容体、または小分子などがあるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0042】

本明細書において使用する「調整」および「調整する」という用語は、生物学的活性の変化または改変を指す。調整には、活性を刺激することまたは活性を阻害することが含まれるが、それらに限定されるわけではない。調整は、活性の増加または減少（例えばWnt経路シグナリングの減少）、結合特徴の変化、またはタンパク質、経路、もしくは他の生物学的関心点の活性に関連する生物学的、機能的、もしくは免疫学的性質の他の任意の変化であってもよい。

30

【0043】

本明細書において使用する「抗体」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖質、ポリヌクレオチド、脂質、またはそれらの組み合わせなどといったターゲットを、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位によって認識し、それらに特異的に結合する、免疫グロブリン分子を指す。本明細書において使用する場合、この用語は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、一本鎖抗体、抗体フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')2、およびFvフラグメント）、一本鎖Fv（scFv）抗体、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体、单一特異性抗体、一価抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原結合部位を含む融合タンパク質、およびその抗体が所望の生物学的活性を呈する限り、抗原認識部位（例えば抗原結合部位）を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる重鎖定常ドメインの実体に基づく5つの主要免疫グロブリンクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）のいずれであってもよい。クラスが異なる免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造と三次元配置を有する。抗体はそのままでよいし、他の分子、例えば限定するわけではないが毒素や放射性同位体などにコンジュゲートされていてもよい。

40

【0044】

「抗体フラグメント」という用語は、インタクトな抗体の一部分を指し、インタクトな

50

抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')2、およびFvフラグメント、線状抗体 (linear antibody)、一本鎖抗体、および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体などがあるが、それらに限定されるわけではない。本明細書にいう「抗体フラグメント」は、抗原結合部位またはエピトープ結合部位を含む。

【0045】

抗体の「可変領域」という用語は、単独の、または組み合わされた、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、「超可変領域」とも呼ばれる3つの相補性決定領域 (CDR) によって接続された4つのフレームワーク領域 (FR) からなる。各鎖中のCDRはフレームワーク領域によって近接した状態にまとめられており、他方の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。CDRを決定するための技法は少なくとも2つある。すなわち(1)異種間の配列可変性に基づくアプローチ (すなわち、Kabat et al., 1991 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」5th Edition, National Institutes of Health、メリーランド州ベセスダ) および(2)抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ (Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948) である。加えて、当技術分野では、これら2つのアプローチの組み合わせを使って、CDRが決定される場合もある。

10

【0046】

本明細書において使用する「モノクローナル抗体」という用語は、单一の抗原決定基またはエピトープの著しく特異的な認識および結合に関わる均一な抗体集団を指す。これは、典型的にはさまざまな異なる抗原決定基に対する異なる抗体の混合物を含むポリクローナル抗体とは対称的である。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトな完全長モノクローナル抗体と、抗体フラグメント (例えばFab, Fab', F(ab')2, Fv)、一本鎖 (scFv) 抗体、抗体の一部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位 (抗原結合部位) を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子とを、どちらも包含する。さらにまた、「モノクローナル抗体」は、例えば限定するわけではないが、ハイブリドーマ生産、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物など、いくつもある技法によって作られた上述の抗体を指す。

20

【0047】

本明細書において使用する「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト配列を含有する特異的免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそのフラグメントである非ヒト (例えばマウス) 抗体の形態を指す。典型的には、ヒト化抗体は、CDRの残基が、所望の特異性、アフィニティ、および/または結合能を有する非ヒト種 (例えばマウス、ラット、ウサギ、またはハムスター) のCDRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリンである (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536)。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域残基が、所望の特異性、アフィニティ、および/または結合能を有する非ヒト種からの抗体中の対応する残基で置き換えられる。抗体の特異性、アフィニティ、および/または結合能を精密化し、最適化するために、Fvフレームワーク領域中の、および/または置き換えられた非ヒト残基内の、さらなる残基の置換によって、ヒト化抗体をさらに修飾することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDRの全てまたは実質上全てを含有する少なくとも1つ、典型的には2つまたは3つの可変ドメインの実質上全てを含み、一方、フレームワーク領域の全てまたは実質上全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域または定常ドメイン (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの、少なくとも一部分も含むことができる。

30

【0048】

本明細書において使用する「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって生産される抗体、またはヒトによって生産される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。ヒト抗体は、当技術分野において公知の技法のどれを使って作っててもよい。ヒト抗体のこの定義では、非ヒトCDRを含むヒト化抗体は、明確に除外される。

40

50

【0049】

本明細書において使用する「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変領域が、所望の特異性、アフィニティ、および/または結合能を有する1つの哺乳動物種（例えばマウス、ラット、ウサギなど）に由来する抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域は、別の種（通常はヒト）に由来する抗体中の配列に対応する。

【0050】

本明細書において使用する「親和性成熟抗体」という表現は、その抗体の1つまたは複数のCDR中に、改変を持たない親抗体と比較して抗原に対する抗体のアフィニティの改善をもたらす1つまたは複数の改変を有する抗体を指す。この定義には、CDR残基の改変と一緒になされた非CDR残基中の改変も含まれる。好ましい親和性成熟抗体は、ターゲット抗原に対してナノモル濃度領域、さらにはピコモル領域のアフィニティを有するであろう。親和性成熟抗体は当技術分野において公知の手法によって生産される。例えば、Marks et al., 1992, *Bio/Technology* 10:779-783には、VHドメインおよびVLドメインシャフリングによる親和性成熟が記載されている。CDR残基および/またはフレームワーク残基のランダム変異導入法は、Barbas et al., 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier et al., 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.*, 154:3310-9; およびHawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896によって記述されている。部位指定変異導入法も親和性成熟抗体を得るために使用することができる。

10

20

30

【0051】

「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は本明細書では可換的に使用され、抗原の一部分であって、特定の抗体によって認識され特異的に結合される能力を有する部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続するアミノ酸からも、タンパク質の三次フォールディングによって並置される不連続なアミノ酸からも形成されうる。連続するアミノ酸から形成されるエピトープ（線状エピトープともいう）が、典型的には、タンパク質変性後も保たれるのに対し、三次フォールディングによって形成されるエピトープ（コンフォメーションアルエピトープともいう）は、典型的には、タンパク質変性後は失われる。エピトープは、典型的には、ユニークな空間的コンフォメーションにある少なくとも3個のアミノ酸、より通常は少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。

30

【0052】

「選択的に結合する」または「特異的に結合する」という用語は、結合作用物質または抗体が、エピトープ、タンパク質、またはターゲット分子に、無関係なタンパク質または関連するタンパク質を含む代替物質よりも、より高い頻度で、またはより迅速に、またはより長い持続時間にわたって、またはより強いアフィニティで、または前記の何らかの組合せで、反応し、または会合することを意味する。一定の態様では、「特異的に結合する」が、例えば抗体がタンパク質に、約0.1mM以下、より通常は約1μM未満のK_Dで結合することを意味する。一定の態様において、「特異的に結合する」は、抗体が、ある時は少なくとも約0.1μM以下のK_Dで、またある時は少なくとも約0.01μM以下のK_Dで、そしてまたある時は少なくとも1nM以下のK_Dでターゲットに結合することを意味する。異なる種における相同タンパク質間の配列同一性ゆえに、特異的結合は、2つ以上の種のタンパク質（例えばヒトFZDとマウスFZD）を認識する抗体を包含することができる。同様に、異なるタンパク質のポリペプチド配列の一定領域内の相同性ゆえに、特異的結合は、2種以上のタンパク質を認識する抗体（または他のポリペプチドもしくは結合作用物質）を包含することができる。一定の態様では、第1のターゲットに特異的に結合する抗体または結合部分は、第2のターゲットに特異的に結合する場合も、特異的には結合しない場合もありうると理解される。したがって「特異的結合」は、排他的結合、すなわち单一ターゲットへの結合を（包含することはできるものの）必ずしもを必要とはしない。したがって、抗体は、一定の態様では、2つ以上のターゲットに特異的に結合しうる。一定の態様では、複数のターゲットが抗体上の同じ抗原結合部位によって結合されうる。例えば抗体は、一定の

40

50

例では、それぞれが2種以上のタンパク質上の同じエピトープに特異的に結合する2つの同一抗原結合部位を含みうる。いくつかの態様では、抗体が多重特異性であって、特異性が異なる少なくとも2つの抗原結合部位を含みうる。非限定的な例として、二重特異性抗体は、あるタンパク質上のあるエピトープを認識する一つの抗原結合部位を含み、さらに第2のタンパク質上の異なるエピトープを認識する第2の異なる抗原結合部位を含みうる。一般的には、結合への言及は特異的結合を意味するが、必ずしもそうとは限らない。

【0053】

本明細書において使用する「可溶性受容体」という用語は、細胞から可溶型で分泌される、受容体の第1膜貫通ドメインの前にある受容体タンパク質のN末端細胞外フラグメント（またはその一部分）を指す。

10

【0054】

本明細書において使用する「FZD可溶性受容体」または「可溶性FZD受容体」という用語は、可溶型で細胞から分泌される、受容体の第1膜貫通ドメインの前にあるFZD受容体タンパク質のN末端細胞外フラグメントを指す。この用語には、N末端細胞外ドメイン（ECD）全体を含むFZD可溶性受容体も、それより小さいフラグメントも含まれる。したがって、Friドメインを含むFZD可溶性受容体も、この用語には含まれる。

20

【0055】

「ポリペプチド」および「ペプチド」および「タンパク質」という用語は本明細書では可換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは線状でも分岐していてもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸で中断されていてもよい。これらの用語は、天然に、または介入によって、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または他の任意の操作もしくは修飾、例えばラベリング構成要素とのコンジュゲーションなどによって、修飾されたアミノ酸ポリマーも含まれる。この定義には、例えば1つまたは複数のアミノ酸類似体（例えば非天然アミノ酸など）ならびに当技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。本発明のポリペプチドは抗体に基づきうるので、一定の態様では、ポリペプチドは一本鎖として存在するか、または会合した鎖（例えば二量体）として存在しうると理解される。

20

【0056】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書では可換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを包含する。ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは修飾塩基、および/またはそれらの類似体、またはDNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼによって組み込まれうる任意の基質であることができる。

30

【0057】

2つ以上の核酸またはポリペプチドに関して「同一」またはパーセント「同一性」という用語は、比較して、どの保存的アミノ酸置換も配列同一性の一部とみなさずに一致度が最大になるように（必要であればギャップを導入して）整列した時に、同じであるか、または指定したパーセンテージの同じヌクレオチド残基もしくはアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。パーセント同一性は、配列比較用のソフトウェアまたはアルゴリズムによって、または目視検査によって測定することができる。当技術分野では、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用することができるさまざまなアルゴリズムおよびソフトウェアがよく知られている。これらには、BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package、およびそのバリエーションなどがあるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、本発明の2つの核酸またはポリペプチドが実質的に同一である。すなわち、それらは、比較して、配列比較アルゴリズムを使った測定で、または目視検査による測定で、一致度が最大になるように整列した時に、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、またいくつかの態様では、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド残基同一性またはアミノ酸残基同一性を有する。いくつかの態様では、同一性が、当該配列のうち、少なくとも約10残基長、少なくとも約20残基長、少なくとも約40

40

50

～60残基長、少なくとも約60～80残基長、またはそれらの間の任意の整数値である領域にわたって存在する。いくつかの態様では、同一性が、60～80残基より長い領域、例えば少なくとも約80～100残基の領域にわたって存在し、いくつかの態様では、比較されている配列、例えばヌクレオチド配列のコード領域の全長にわたって、配列が実質的に同一である。

【0058】

「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基を、類似する側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えるものである。当技術分野では、類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが規定されており、これには、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ-分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。例えば、フェニルアラニンによるチロシンの置換は保存的置換である。好ましくは、本発明のポリペプチドおよび抗体の配列における保存的置換は、そのアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたは抗体の抗原への結合を、すなわち当該ポリペプチドまたは抗体が結合する1種または複数種のRSPOタンパク質への結合を、抑止しない。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当技術分野では周知である。

10

20

【0059】

本明細書において使用する「ベクター」という用語は、宿主細胞に、1つまたは複数の関心対象の遺伝子または配列を送達し、通常は、それを発現させる能力を有する、コンストラクトを意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド、またはファージベクター、カチオン性凝集剤と会合したDNAまたはRNA発現ベクター、およびリポソームに封入されたDNAまたはRNA発現ベクターなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0060】

「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物とは、自然には見いだされない形態にあるポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物には、それらがもはや自然に見いだされる形態にはない程度にまで精製されたものが含まれる。いくつかの態様では、単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物が、実質的に純粋である。

【0061】

本明細書において使用する「実質的に純粋」という用語は、少なくとも50%純粋（すなわち夾雑物を含まない）、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%純粋である材料を指す。

40

【0062】

本明細書において使用する「がん」および「がん性」という用語は、細胞の集団が無秩序な細胞成長を特徴とするような哺乳動物における生理的状態を指すか、そのような生理的状態を記述している。がんの例には、癌、芽細胞腫、肉腫、ならびにリンパ腫および白血病などの血液がんなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0063】

本明細書において使用する「腫瘍」および「新生物」という用語は、良性（非がん性）であれ、前がん病巣を含む悪性（がん性）であれ、過剰な細胞成長または細胞増殖がもたらす任意の組織塊を指す。

【0064】

本明細書において使用する「転移」という用語は、がんが元の部位から身体の別の領域に伝播または移行して、新しい場所に類似するがん性病巣を発生させる過程を指す。「転

50

「**移**」細胞または「**転移性**」細胞は、近隣細胞との付着接触を失って疾患の原発部位から（例えば血流またはリンパによって）移動することで、近隣の身体構造に侵入するものである。

【0065】

「**がん幹細胞**」および「**CSC**」および「**腫瘍幹細胞**」および「**腫瘍始原細胞**」という用語は、本明細書では可換的に使用され、（1）高い増殖能を有し、（2）非対称細胞分裂を起こして増殖能または発生能が低減している1タイプまたは複数タイプの分化型細胞子孫を生成させる能力を有し、（3）自己再生または自己維持のために対称細胞分裂を起こす能力を有する、がんまたは腫瘍からの細胞を指す。これらの性質は、免疫不全宿主（例えばマウス）への累代移植時に、腫瘍を形成しえない腫瘍細胞の大部分と比べて、腫瘍またはがんを形成または確立する能力を、がん幹細胞に付与する。がん幹細胞は、自己再生と分化とを無秩序に起こすことで、変異が発生するにつれて経時的に変化しうる異常細胞タイプを伴う腫瘍を形成する。

10

【0066】

「**がん細胞**」および「**腫瘍細胞**」という用語は、がんまたは腫瘍または前がん病巣に由来する細胞の全集団を指し、がん細胞集団のバルクを構成する非腫瘍形成性細胞と、腫瘍形成性幹細胞（がん幹細胞）の両方を包含する。本明細書において使用する「**がん細胞**」または「**腫瘍細胞**」という用語は、それらの腫瘍細胞をがん幹細胞とは区別するために、再生し分化する能力を欠く細胞をもっぱら指す場合には、「**非腫瘍形成性**」という用語で修飾される。

20

【0067】

本明細書において使用する「**腫瘍形成性**」という用語は、自己再生（新たな腫瘍形成性がん幹細胞を生じさせる）性質と、増殖によって他の全ての腫瘍細胞を生成する（分化した、したがって非腫瘍形成性の腫瘍細胞を生じさせる）性質とを含む、がん幹細胞の機能的特色を指す。

【0068】

本明細書において使用する「**腫瘍形成性**」という用語は、免疫不全宿主（例えばマウス）への累代移植時に触知可能な腫瘍を形成するという、腫瘍からのランダムな細胞試料が持つ能力を指す。この定義は、免疫不全宿主（例えばマウス）への累代移植時に触知可能な腫瘍を形成する濃縮および/または単離されたがん幹細胞の集団も包含する。

30

【0069】

「**対象**」という用語は、ある特定処置の受容者となる任意の動物（例えば哺乳動物）を指し、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯類動物などを含むが、それらに限定されるわけではない。典型的には、「**対象**」および「**患者**」という用語は、ヒト対象に関して、本明細書では可換的に使用される。

【0070】

「**薬学的に許容される**」という用語は、ヒトを含む動物における使用について、連邦政府または州政府の規制当局によって承認された（または承認されうる）製品もしくは化合物、または米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に掲載されている製品もしくは化合物を指す。

40

【0071】

「**薬学的に許容される賦形剤、担体またはアジュバント**」または「**許容される医薬担体**」という用語は、少なくとも1つの本開示の結合作用物質（例えば抗体）と一緒に対象に投与することができ、結合作用物質の活性を破壊しない、賦形剤、担体またはアジュバントを指す。賦形剤、担体、またはアジュバントは、治療効果を送達するのに十分な用量で結合作用物質を投与した時に、非毒性であるべきである。

【0072】

「**有効量**」または「**治療有効量**」または「**治療効果**」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「**処置する**」のに有効な結合作用物質、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小さな有機分子、または他の薬物の量を指す。がんの場合、薬物（

50

例えば抗体)の治療有効量は、治療効果を有し、したがって、がん細胞の数を低減し、腫瘍形成性、腫瘍形成頻度、または腫瘍形成能を減少させ、がん幹細胞の数または頻度を低減し、腫瘍サイズを低減し、がん細胞集団を低減し、周辺臓器へのがん細胞の浸潤、例えば軟組織または骨へのがんの伝播を阻害および/または停止し、腫瘍細胞またはがん細胞の転移を阻害および/または停止し、腫瘍細胞またはがん細胞の成長を阻害および/または停止し、がんに関連する症状の1つまたは複数をある程度は除去し、罹病率および死亡率を低減し、生活の質を改善することができるか、またはそれらの効果の組み合わせを起こすことができる。作用物質、例えば抗体が、成長を防止し、かつ/または既存のがん細胞を殺す限りにおいて、それを、細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性と呼ぶことができる。

10

【0073】

「処置する」または「処置」または「処置すること」または「軽減する」または「軽減すること」という用語は、1)診断された病的状態または障害を治し、減退させ、その症状を減らし、かつ/またはその進行を停止させる治療的手段と、2)標的とする病的状態または障害の発生を防止し、または遅らせる予防的または防止的手段との両方を指す。したがって、処置を必要とする者には、既に前記障害を持つ者、前記障害を悪いやすい者、および前記障害を防止すべき者が含まれる。いくつかの態様では、患者が以下に挙げる効果の1つまたは複数を示すのであれば、その対象は本発明の方法によってうまく「処置され」ている:がん細胞の数の低減またはがん細胞の完全な欠如;腫瘍サイズの低減;軟組織および骨へのがん細胞の伝播を含む周辺臓器へのがん細胞浸潤の阻害または欠如;腫瘍細胞またはがん細胞の転移の阻害または欠如;がん成長の阻害または欠如;その具体的ながんに関連する1つまたは複数の症状の除去;罹病率および死亡率の低減;生活の質の改善;腫瘍形成性の低減;がん幹細胞の数または頻度の低減;または効果の何らかの組み合わせ。

20

【0074】

本開示および特許請求の範囲において使用する場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上そうでないことが明らかな場合を除き、複数形を包含する。

【0075】

本明細書において「を含む (comprising)」という言葉を使って態様が説明されている場合は常に、「からなる (consisting of)」および/または「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語で説明される、それ以外の点では類似する態様も提供されると理解される。また、本明細書において「から本質的になる」という言葉を使って態様が説明されている場合は常に、「からなる」という用語で説明される、それ以外の点では類似する態様も提供されると理解される。

30

【0076】

本明細書において「約」または「およそ」の値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータに向けられた態様を包含(そして記載)する。例えば「約X」という記載は「X」の記載を包含する。

【0077】

本明細書において「Aおよび/またはB」などの表現で使用される「および/または」という用語は、AとBの両方、AまたはB、A(のみ)、およびB(のみ)を包含するものとする。同様に、「A、B、および/またはC」などの表現で使用される「および/または」という用語も、以下の態様のそれぞれを包含するものとする:A、B、およびC;A、B、またはC;AまたはC;AまたはB;BまたはC;AおよびC;AおよびB;BおよびC;A(のみ);B(のみ);およびC(のみ)。

40

【0078】

II.Wnt経路インヒビター

本発明は、腫瘍成長を阻害する方法において使用するための、および/またはがんを処置する方法において使用するための、Wnt経路インヒビターを提供する。

【0079】

一定の態様において、Wnt経路インヒビターは、1種または複数種のヒトFrizzledタンパ

50

ク質 (FZD) に結合する作用物質である。これらの作用物質を、本明細書では、「FZD結合作用物質」という。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10種のFZDタンパク質に、特異的に結合する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群より選択される1種または複数種のFZDタンパク質に結合する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、および/またはFZD8を含む1種または複数種のFZDタンパク質に結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質がFZD7に結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質がFZD5および/またはFZD8に結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8に特異的に結合する。FZD結合作用物質の非限定的な例は米国特許第7,982,013号に見いだすことができる。

10

【0080】

一定の態様では、FZD結合作用物質がFZDアンタゴニストである。一定の態様では、FZD結合作用物質がWnt経路アンタゴニストである。一定の態様では、FZD結合作用物質がWntシグナリングを阻害する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、古典的Wntシグナリングを阻害する。

【0081】

いくつかの態様では、FZD結合作用物質が抗体である。いくつかの態様では、FZD結合作用物質がポリペプチドである。一定の態様では、FZD結合作用物質が抗体または抗原結合部位を含むポリペプチドである。一定の態様において、本明細書に記載するFZD結合抗体またはFZD結合ポリペプチドの抗原結合部位は、1、2、3、4、もしくは5種、またはそれ以上のヒトFZDタンパク質に結合する能力を有する（または結合する）。一定の態様において、FZD結合抗体またはFZD結合ポリペプチドの抗原結合部位は、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9およびFZD10からなる群より選択される1、2、3、4、または5種のヒトFZDタンパク質に特異的に結合する能力を有する。いくつかの態様において、FZD結合作用物質が2種以上のFZDタンパク質に結合する抗体である場合、それは「汎FZD抗体」と呼ぶことができる。

20

【0082】

一定の態様において、FZD結合作用物質（例えば抗体）は、それが結合する1種または複数種のヒトFZDタンパク質内の細胞外ドメイン（ECD）に、特異的に結合する。一定の態様において、FZD結合作用物質は、それが結合するヒトFZDタンパク質のFriドメイン（システインリッチドメイン（CRD）としても知られている）内に、特異的に結合する。各ヒトFZDタンパク質のFriドメインの配列は当技術分野において公知であり、それらをSEQ ID NO:13 (FZD1)、SEQ ID NO:14 (FZD2)、SEQ ID NO:15 (FZD3)、SEQ ID NO:16 (FZD4)、SEQ ID NO:17 (FZD5)、SEQ ID NO:18 (FZD6)、SEQ ID NO:19 (FZD7)、SEQ ID NO:20 (FZD)、SEQ ID NO:21 (FZD9)、およびSEQ ID NO:22 (FZD10)として記載する。

30

【0083】

一定の態様では、FZD結合作用物質が、1、2、3、4、もしくは5種、またはそれ以上のFZDタンパク質に結合する。いくつかの態様において、FZD結合作用物質は、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8からなる群より選択される1、2、3、4、または5種のFZDタンパク質に、特異的に結合する。いくつかの態様において、FZD結合作用物質は、少なくともFZD5およびFZD8に特異的に結合する。

40

【0084】

いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、少なくとも1種のヒトFZDタンパク質に、約1μM以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、約1nM以下、または約0.1nM以下の解離定数（K_D）で結合する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、少なくとも1種のFZDタンパク質に、約10nM以下のK_Dで結合する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、少なくとも1種のFZDタンパク質に、約1nM以下のK_Dで結合する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、少なくとも1種のFZDタンパク質に、約0.1nM以下のK_Dで結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8のうちの1種または複数種（例えば1、2、3、4、または5種）のそれぞれに、約40nM以下のK_D

50

で結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8のうちの1種または複数種のそれぞれに、約10nM以下のK_Dで結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8のそれぞれに、約10nMのK_Dで結合する。いくつかの態様では、FZDタンパク質に対する結合作用物質（例えば抗体）のK_Dが、Biacoreチップ上に固定化されたFZD細胞外ドメインまたはFZD-Fcドメインの少なくとも一部分を含むFZD-Fc融合タンパク質を使って決定されるK_Dである。

【0085】

一定の態様では、FZD結合作用物質が、1種または複数種の（例えば2種以上、3種以上、または4種以上の）ヒトFZDタンパク質に、約1μM以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下のEC₅₀で結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、2種以上のFZDタンパク質に、約40nM以下、約20nM以下、または約10nM以下のEC₅₀で結合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、以下のFZDタンパク質のうちの1種または複数種（例えば1、2、3、4、または5種）に関して、約20nM以下のEC₅₀を有する：FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8。一定の態様では、FZD結合作用物質が、以下のFZDタンパク質のうちの1種または複数種（例えば1、2、3、4、または5種）に関して、約10nM以下のEC₅₀を有する：FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8。一定の態様では、FZD結合作用物質が、FZD5および/またはFZD8の結合に関して、約40nM以下または20nM以下のEC₅₀を有する。

10

【0086】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、抗体であるFZD結合作用物質である。いくつかの態様では、抗体が組換え抗体である。いくつかの態様では、抗体がモノクローナル抗体である。いくつかの態様では、抗体がキメラ抗体である。いくつかの態様では、抗体がヒト化抗体である。いくつかの態様では、抗体がヒト抗体である。一定の態様では、抗体がIgG1抗体である。一定の態様では、抗体がIgG2抗体である。一定の態様では、抗体が、抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。いくつかの態様では、抗体が一価、単一特異性、または二価である。いくつかの態様では、抗体が二重特異性抗体または多重特異性抗体である。いくつかの態様では、抗体が細胞傷害性部分にコンジュゲートされている。いくつかの態様では、抗体が単離されている。いくつかの態様では、抗体が実質的に純粋である。

20

【0087】

本発明のFZD結合作用物質（例えば抗体）は、当技術分野において公知である任意の方法により、特異的結合に関してアッセイすることができる。使用することができるイムノアッセイには、Biacore分析、FACS分析、免疫蛍光、免疫細胞化学、ウェスタンプロット分析、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテインAイムノアッセイなどの技法を使った競合アッセイ系および非競合アッセイ系などがあるが、それらに限定されるわけではない。そのようなアッセイは当技術分野ではルーチンであり、周知である（例えばAusubel et al.編（1994～現在）「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley & Sons, Inc.、ニューヨーク州ニューヨークを参照されたい）。

30

【0088】

例えば、ヒトFZDタンパク質に対する抗体の特異的結合は、ELISAを使って決定することができる。ELISAアッセイは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイプレートのウェルを抗原でコーティングする工程、ウェルに、酵素基質（例：セイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物にコンジュゲートされたFZD結合作用物質（例えば抗体）を加える工程、ある期間にわたってインキュベートする工程、および抗原に結合したFZD結合作用物質の存在を検出する工程を含む。いくつかの態様では、FZD結合抗体またはFZD結合作用物質が、検出可能な化合物にはコンジュゲートされていないが、その代わりに、そのFZD結合抗体またはFZD結合作用物質を認識する第2のコンジュゲート抗体（例えば抗Fc抗体）がウェルに加えられる。いくつかの態様

40

50

では、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、FZD結合抗体またはFZD結合作用物質をウェルにコーティングし、検出可能な化合物にコンジュゲートされた第2の抗体を、コーティングされたウェルに抗原を加えた後に、加えることもできる。検出されるシグナルを増加させかつ/または最適化するために変更することができるパラメータ、ならびに使用しうるELISAの他のバリエーションについては、当業者にはわかるであろう。

【0089】

別の例において、ヒトFZDタンパク質に対する抗体の特異的結合は、FACSを使って決定することもできる。FACSスクリーニングアッセイは、抗原を融合タンパク質として発現させるcDNAコンストラクトを生成させる工程、前記コンストラクトを細胞中にトランスフェクトする工程、抗原を細胞の表面上に発現させる工程、FZD結合抗体または他のFZD結合作用物質をトランスフェクト細胞と混合する工程、およびある期間にわたってインキュベートする工程を含みうる。FZD結合抗体または他のFZD結合作用物質に結合された細胞は、検出可能な化合物にコンジュゲートされた二次抗体（例えばPEコンジュゲート抗Fc抗体）とフローサイトメーターとを使って同定することができる。検出されるシグナルを最適化するために変更することができるパラメータ、ならびにスクリーニング（例えば遮断抗体のスクリーニング）を強化しうるFACSの他のバリエーションについては、当業者にはわかるであろう。

10

【0090】

抗原（例えばFZDタンパク質）に対する抗体または他の結合作用物質の結合アフィニティおよび抗体-抗原相互作用のオフ速度は、競合結合アッセイによって決定することができる。競合結合アッセイの一例は、標識された抗原（例えば³Hまたは¹²⁵I）またはそのフラグメントもしくは変異体と関心対象の抗体とを、増加する量の非標識抗原の存在下でインキュベートした後、標識抗原に結合した抗体を検出する工程を含む、ラジオイムノアッセイである。抗原（例えばFZDタンパク質）に対する抗体のアフィニティおよび結合オフ速度は、データから、スキャチャードプロット解析によって決定することができる。いくつかの態様では、Biacore速度論解析を使って、抗原（例えばFZDタンパク質）に結合する抗体または作用物質の結合オン速度および結合オフ速度を決定することができる。Biacore速度論解析は、表面上に固定化抗原（例えばFZDタンパク質）を有するチップへの抗体の結合および同チップからの抗体の解離を解析する工程を含む。

20

【0091】

30

一定の態様において、本発明は、
GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)
を含む重鎖CDR1、
VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)
を含む重鎖CDR2、
NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR3を含むFZD結合作用物質（例えば抗体）である、Wnt経路インヒビターを提供する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質がさらに、

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

40

を含む軽鎖CDR1、

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、および

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

を含む軽鎖CDR1、

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、および

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR3を含む。一定の態様では、FZD結合作用物質が、(a)

50

GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)

を含む重鎖CDR1、

VISGDSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

を含む重鎖CDR2、および

NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR3、ならびに (b)

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

を含む軽鎖CDR1、

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、および

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【0092】

一定の態様において、本発明は、以下の要素を含むFZD結合作用物質（例えば抗体）を提供する：(a)

GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)

を含む重鎖CDR1、または1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含むその変異体；(b)

VISGDSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

を含む重鎖CDR2、または1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含むその変異体；(c)

NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR3、または1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含むその変異体；(d)

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

を含む軽鎖CDR1、または1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含むその変異体；(e)

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、または1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含むその変異体；および
(f)

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR3、または1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含むその変異体。一定の態様では、アミノ酸置換が保存的置換である。

【0093】

一定の態様において、本発明は、SEQ ID NO:7に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、FZD結合作用物質（例えば抗体）を提供する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:7に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。一定の態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:8に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:7に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

一定の態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:7を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO:8を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:7を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:7から本質的になる重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8から本質的になる軽鎖可変領域を含む。

【0094】

一定の態様において、本発明は、以下の要素を含むFZD結合作用物質（例えば抗体）を提供する：(a) SEQ ID NO:9（シグナル配列ありまたはシグナル配列なし）またはSEQ ID NO:11に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖；および/または(b) SEQ ID NO:10（シグナル配列ありまたはシグナル配列なし）またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも

10

20

30

40

50

90 % の配列同一性を有する軽鎖。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、以下の要素を含む：(a) SEQ ID NO:9 (シグナル配列ありまたはシグナル配列なし) またはSEQ ID NO:11に対して少なくとも95 % の配列同一性を有する重鎖；および/または(b) SEQ ID NO:10 (シグナル配列ありまたはシグナル配列なし) またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも95 % の配列同一性を有する軽鎖。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:9 (シグナル配列ありまたはシグナル配列なし) またはSEQ ID NO:11を含む重鎖、および/またはSEQ ID NO:10 (シグナル配列ありまたはシグナル配列なし) またはSEQ ID NO:12を含む軽鎖を含む。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:11を含む重鎖およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖を含む。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:9のアミノ酸20～463から本質的になる重鎖およびSEQ ID NO:10のアミノ酸20～232から本質的になる軽鎖を含む。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:11から本質的になる重鎖およびSEQ ID NO:12から本質的になる軽鎖を含む。

10

【0095】

一定の態様において、本発明は、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7および/またはFZD8のうちの少なくとも1つに特異的に結合するFZD結合作用物質（例えば抗体）であるWnt経路インヒビターであって、前記FZD結合作用物質（例えば抗体）が抗体OMP-18R5のCDRのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、および/または6つを含むものを提供する。抗体OMP-18R5（18R5およびバンチクツマブとしても知られている）は、他のFZD結合作用物質と共に、以前に米国特許第7,982,013号に記載されている。OMP-18R5 IgG2抗体の重鎖および軽鎖をコードするDNAは、2008年9月29日にブダペスト条約の規定の下にATCCに寄託され、ATCC受託番号PT A-9541が割り当てられた。いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、OMP-18R5のCDRのうちの1つまたは複数、OMP-18R5のCDRのうちの2つ以上、OMP-18R5のCDRのうちの3つ以上、OMP-18R5のCDRのうちの4つ以上、OMP-18R5のCDRのうちの5つ以上、またはOMP-18R5のCDRの6つ全てを含む。

20

【0096】

本発明は、Wnt経路インヒビターであるポリペプチドを提供する。本ポリペプチドには、ヒトFZDタンパク質に特異的に結合する抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、ポリペプチドが、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群より選択される1種または複数種のFZDタンパク質に結合する。いくつかの態様では、ポリペプチドが、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、および/またはFZD8に結合する。いくつかの態様では、ポリペプチドが、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8に結合する。

30

【0097】

一定の態様では、ポリペプチドが、抗体OMP-18R5のCDRのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、および/または6つを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドが、1つのCDRにつき4つまで（すなわち、0、1つ、2つ、3つ、または4つ）のアミノ酸置換を持つCDRを含む。一定の態様では、重鎖CDRが重鎖可変領域内に含まれる。一定の態様では、軽鎖CDRが軽鎖可変領域内に含まれる。

【0098】

いくつかの態様において、本発明は、1種または複数種のヒトFZDタンパク質に特異的に結合するポリペプチドであって、ポリペプチドが、SEQ ID NO:7に対して少なくとも約80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、および/またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも約80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むものを提供する。一定の態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:7に対して少なくとも約85 %、少なくとも約90 %、少なくとも約95 %、少なくとも約97 %、または少なくとも約99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一定の態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:8に対して少なくとも約85 %、少なくとも約90 %、少なくとも約95 %、少なくとも約97 %、または少なくとも約99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一定の態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:7に対して少なくとも約95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、および/またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも約95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一定の態様では、ポリペプチドが、

40

50

ペプチドが、SEQ ID NO:7を含むアミノ酸配列、および/またはSEQ ID NO:8を含むアミノ酸配列を含む。

【0099】

いくつかの態様では、FZD結合作用物質が、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、およびSEQ ID NO:12からなる群より選択される配列を含むポリペプチドを含む。

【0100】

一定の態様では、FZD結合作用物質が、OMP-18R5抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、FZD結合作用物質が、OMP-18R5抗体の重鎖および軽鎖(リーダー配列ありまたはリーダー配列なし)を含む。

10

【0101】

一定の態様では、FZD結合作用物質が、抗体OMP-18R5を含むか、抗体OMP-18R5から本質的になるか、または抗体OMP-18R5からなる。

【0102】

一定の態様では、FZD結合作用物質(例えば抗体)が、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への特異的結合に関して、SEQ ID NO:7を含む重鎖可変領域とSEQ ID NO:8を含む軽鎖可変領域とを含む抗体と競合する。一定の態様では、FZD結合作用物質(例えば抗体)が、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への特異的結合に関して、SEQ ID NO:9(シグナル配列ありまたはシグナル配列なし)を含む重鎖とSEQ ID NO:10(シグナル配列ありまたはシグナル配列なし)を含む軽鎖とを含む抗体と競合する。一定の態様では、FZD結合作用物質(例えば抗体)が、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への特異的結合に関して、SEQ ID NO:11を含む重鎖とSEQ ID NO:12を含む軽鎖とを含む抗体と競合する。一定の態様では、FZD結合作用物質(例えば抗体)が、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への特異的結合に関して、ATCCに寄託された受託番号PTA-9541のプラスミドによってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。一定の態様では、FZD結合作用物質が、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への特異的結合に関して、抗体OMP-18R5と競合する。いくつかの態様では、FZD結合作用物質またはFZD結合抗体が、インピトロ競合結合アッセイにおいて、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への特異的結合に関して競合する。

20

【0103】

一定の態様では、FZD結合作用物質(例えば抗体)が、本発明の抗体と同じ、または本質的に同じ、1種または複数種のヒトFZDタンパク質上のエピトープに結合する。別の態様において、FZD結合作用物質は、本発明の抗体が結合するFZDタンパク質上のエピトープとオーバーラップする、1種または複数種のヒトFZDタンパク質上のエピトープに結合する抗体である。一定の態様では、FZD結合作用物質(例えば抗体)が、抗体OMP-18R5と同じ、または本質的に同じ、1種または複数種のFZDタンパク質上のエピトープに結合する。別の態様において、FZD結合作用物質は、抗体OMP-18R5が結合するFZDタンパク質上のエピトープとオーバーラップする、1種または複数種のヒトFZDタンパク質上のエピトープに結合する抗体である。

30

【0104】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、1種または複数種のヒトWntタンパク質に結合する作用物質である。これらの作用物質を本明細書では「Wnt結合作用物質」という。一定の態様では、作用物質が1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10種、またはそれ以上のWntタンパク質に特異的に結合する。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、およびWnt16からなる群より選択される1種または複数種のヒトWntタンパク質に結合する。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される1種または複数種の(または2種以上、3種以上、4種以上、5種以上などの)Wntタンパク質に結合する。一定の態様では、1種または複数種の(または2種以

40

50

上、3種以上、4種以上、5種以上などのWntタンパク質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される。

【0105】

一定の態様では、Wnt結合作用物質がWntアンタゴニストである。一定の態様では、Wnt結合作用物質がWnt経路アンタゴニストである。一定の態様では、Wnt結合作用物質がWntシグナリングを阻害する。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が古典的Wntシグナリングを阻害する。

【0106】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が抗体である。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質がポリペプチドである。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、抗体または抗原結合部位を含むポリペプチドである。一定の態様では、本明細書において記載するWnt結合抗体またはWnt結合ポリペプチドの抗原結合部位が、1、2、3、4、もしくは5種、またはそれ以上のヒトWntタンパク質に結合する能力を有する（または結合する）。一定の態様では、Wnt結合抗体またはWnt結合ポリペプチドの抗原結合部位が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される1、2、3、4、または5種のヒトWntタンパク質に特異的に結合する能力を有する。Wnt結合作用物質の非限定的な例は国際公開公報第2011/088127号に見いだすことができる。

10

【0107】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、1種または複数種のヒトWntタンパク質のC末端システインリッチドメインに結合する。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、その作用物質または抗体が結合する1種または複数種のWntタンパク質内の、以下の配列からなる群より選択されるドメインに結合する：SEQ ID NO:46 (Wnt1)、SEQ ID NO:47 (Wnt2)、SEQ ID NO:48 (Wnt2b)、SEQ ID NO:49 (Wnt3)、SEQ ID NO:50 (Wnt3a)、SEQ ID NO:51 (Wnt7a)、SEQ ID NO:52 (Wnt7b)、SEQ ID NO:53 (Wnt8a)、SEQ ID NO:54 (Wnt8b)、SEQ ID NO:55 (Wnt10a)、およびSEQ ID NO:56 (Wnt10b)。

20

【0108】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、1種または複数種の（例えば2種以上、3種以上、または4種以上の）Wntタンパク質に、約1μM以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、または約10nM以下のK_Dで結合する。例えば、一定の態様では、2種以上のWntタンパク質に結合する本明細書に記載のWnt結合作用物質が、それらWntタンパク質に、約100nM以下、約20nM以下、または約10nM以下のK_Dで結合する。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、1種または複数種（例えば1、2、3、4、または5種）のWntタンパク質のそれぞれに、約40nM以下のK_Dで結合し、ここで、Wntタンパク質は、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される。いくつかの態様では、Wntタンパク質に対する結合作用物質（例えば抗体）のK_Dが、Biacoreチップ上に固定化されたWnt C末端システインリッチドメインの少なくとも一部分を含むWnt融合タンパク質を使って決定されるK_Dである。

30

【0109】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、1種または複数種の（例えば2種以上、3種以上、または4種以上の）ヒトWntタンパク質に、約1μM以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下のEC₅₀で結合する。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、2種以上のWntに、約40nM以下、約20nM以下、または約10nM以下のEC₅₀で結合する。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、Wntタンパク質Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、および/またはWnt16のうちの1種または複数種（例えば1、2、3、4、または5種）に関して、約20nM以下のEC₅₀を有する。一定の態様では、Wnt結合作用物質が、以下のWntタンパク質のうちの1種または複数種（例えば1、2、3、4、または5種）に関して、約10nM以下のEC₅₀を有する：Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、および/またはWnt10b。

40

【0110】

50

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、抗体であるWnt結合作用物質である。いくつ
かの態様では、抗体が組換え抗体である。いくつかの態様では、抗体がモノクローナル抗
体である。いくつかの態様では、抗体がキメラ抗体である。いくつかの態様では、抗体が
ヒト化抗体である。いくつかの態様では、抗体がヒト抗体である。一定の態様では、抗体
がIgG1抗体である。一定の態様では、抗体がIgG2抗体である。一定の態様では、抗体が、
抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。いくつかの態様では、抗体が一価、単一特
異性、または二価である。いくつかの態様では、抗体が二重特異性抗体または多重特異性
抗体である。いくつかの態様では、抗体が細胞傷害性部分にコンジュゲートされている。
いくつかの態様では、抗体が単離されている。いくつかの態様では、抗体が実質的に純粋
である。

10

【0111】

本発明のWnt結合作用物質（例えば抗体）は、FZD結合作用物質について本明細書に記載
するように、当技術分野において公知である任意の方法により、特異的結合に関してアッ
セイすることができる。

【0112】

例えば、ヒトWntタンパク質への抗体の特異的結合は、ELISAを使って決定することができる。
ELISAアッセイは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイプレートのウ
ェルを抗原でコーティングする工程、ウェルに、酵素基質（例：セイヨウワサビペルオキ
シダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物にコンジュゲートされ
たWnt結合作用物質（例えば抗体）を加える工程、ある期間にわたってインキュベートす
る工程、および抗原に結合したWnt結合作用物質の存在を検出する工程を含む。いくつ
かの態様では、Wnt結合抗体またはWnt結合作用物質が、検出可能な化合物にはコンジュゲー
トされていないが、その代わりに、そのWnt結合抗体またはWnt結合作用物質を認識する第
2のコンジュゲート抗体（例えば抗Fc抗体）がウェルに加えられる。いくつかの態様では
、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、Wnt結合抗体またはWnt結合作用物質をウェ
ルにコーティングし、検出可能な化合物にコンジュゲートされた第2の抗体を、コーティ
ングされたウェルに抗原を加えた後に、加えることもできる。検出されるシグナルを増加
させかつ/または最適化するために変更することができるパラメータ、ならびに使用しう
るELISAの他のバリエーションについては、当業者にはわかるであろう。

20

【0113】

別の例において、ヒトWntタンパク質に対する抗体の特異的結合は、FACSを使って決定
することもできる。FACSスクリーニングアッセイは、抗原を融合タンパク質として発現さ
せるcDNAコンストラクトを生成させる工程、前記コンストラクトを細胞中にトランスフェ
クトする工程、抗原を細胞の表面上に発現させる工程、Wnt結合抗体をトランスフェクト
細胞と混合する工程、およびある期間にわたってインキュベートする工程を含みうる。Wn
t結合抗体に結合された細胞は、検出可能な化合物にコンジュゲートされた二次抗体（例
えばPEコンジュゲート抗Fc抗体）とフローサイトメーターとを使って同定することができる。
検出されるシグナルを最適化するために変更することができるパラメータ、ならびに
スクリーニング（例えば遮断抗体のスクリーニング）を強化しうるFACSの他のバリエーシ
ョンについては、当業者にはわかるであろう。

30

【0114】

抗原（例えばWntタンパク質）に対するWnt結合作用物質の結合アフィニティおよび抗体
-抗原相互作用のオフ速度は、FZD結合作用物質に関して上述したような競合結合アッセイ
によって決定することができる。

40

【0115】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が可溶性受容体である。一定の態様では、Wnt結合作
用物質が、FZD受容体タンパク質の細胞外ドメインを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作
用物質が、FZDタンパク質のFriドメインを含む。いくつかの態様では、FZD Friドメイン
を含む可溶性受容体が、FZD ECD全体を含む可溶性受容体と比較して、改変された生物
学的活性（例えば増加したタンパク質半減期）を示すことができる。タンパク質半減期は

50

、ポリエチレングリコール(PEG)またはポリエチレンオキシド(PEO)を使った共有結合修飾によって、さらに増加させることができる。一定の態様では、FZDタンパク質がヒトFZDタンパク質である。一定の態様では、ヒトFZDタンパク質が、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、またはFZD10である。可溶性FZD受容体の非限定期的な例は、米国特許第7,723,477号および同第7,947,277号ならびに米国特許出願公開第2011/0305695号に見いだすことができる。

【0116】

ヒトFZD1～10タンパク質のそれぞれの予測FriドメインをSEQ ID NO:13～22として記載する。ヒトFZD1～10タンパク質のそれぞれの予測最小FriドメインをSEQ ID NO:23～32として記載する。さまざまなFriドメインに対応する正確なアミノ酸については、当業者間でその理解に相違が存在しうる。したがって、上記および本明細書において概説するドメインのN末端および/またはC末端には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、さらには10アミノ酸の伸長または短縮が考えられる。

10

【0117】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、ヒトFZDタンパク質のFriドメイン、または1種もしくは複数種のヒトWntタンパク質に結合するFriドメインのフラグメントもしくは変異体を含む。一定の態様では、ヒトFZDタンパク質が、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、またはFZD10である。一定の態様では、ヒトFZDタンパク質がFZD4である。一定の態様では、ヒトFZDタンパク質がFZD5である。一定の態様では、ヒトFZDタンパク質がFZD8である。一定の態様では、ヒトFZDタンパク質がFZD10である。一定の態様では、FZDタンパク質がFZD4であり、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:16を含む。一定の態様では、FZDタンパク質がFZD5であり、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:17を含む。一定の態様では、FZDタンパク質がFZD7であり、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:19を含む。一定の態様では、FZDタンパク質がFZD8であり、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:20を含む。一定の態様では、FZDタンパク質がFZD10であり、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:22を含む。一定の態様では、FZDタンパク質がFZD8であり、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:33を含む。

20

【0118】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、FZD1の最小Friドメイン(SEQ ID NO:23)、FZD2の最小Friドメイン(SEQ ID NO:24)、FZD3の最小Friドメイン(SEQ ID NO:25)、FZD4の最小Friドメイン(SEQ ID NO:26)、FZD5の最小Friドメイン(SEQ ID NO:27)、FZD6の最小Friドメイン(SEQ ID NO:28)、FZD7の最小Friドメイン(SEQ ID NO:29)、FZD8の最小Friドメイン(SEQ ID NO:30)、FZD9の最小Friドメイン(SEQ ID NO:31)、またはFZD10の最小Friドメイン(SEQ ID NO:32)を含むFriドメインを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、FZD8(SEQ ID NO:30)の最小Friドメインを含むFriドメインを含む。

30

【0119】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、FZD1のFriドメイン、FZD2のFriドメイン、FZD3のFriドメイン、FZD4のFriドメイン、FZD5のFriドメイン、FZD6のFriドメイン、FZD7のFriドメイン、FZD8のFriドメイン、FZD9のFriドメイン、またはFZD10のFriドメインから本質的になるFriドメインを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、FZD8のFriドメインから本質的になるFriドメインを含む。

40

【0120】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、以下の配列からなる群より選択される配列を含む:SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、およびSEQ ID NO:33。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:20から本質的になるFriドメインを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:33から本質的になるFriドメインを含む。

【0121】

50

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、1つまたは複数（例えば1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個など）の保存的置換を含み、Wntタンパク質に結合する能力を有する、前述のFZD Friドメイン配列のいずれか一つの変異体を含む。

【0122】

一定の態様では、Wnt結合作用物質、例えばヒトFZD受容体のFriドメインを含む作用物質が、さらに非FZDポリペプチドを含む。いくつかの態様では、FZD可溶性受容体が、他の非FZD機能および構造ポリペプチド、例えば限定するわけではないが、ヒトFc領域、タンパク質タグ（例えばmyc、FLAG、GST）、他の内在性タンパク質またはタンパク質フラグメント、またはFZD ECDもしくはFriドメインと第2のポリペプチドとの間の任意のリンク領域を含む他の任意の有用タンパク質配列などに連結された、FZD EGDまたはFriドメインを含みうる。一定の態様では、非FZDポリペプチドがヒトFc領域を含む。Fc領域は、免疫グロブリンのクラス、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgEのどれからでも得ることができる。いくつかの態様では、Fc領域がヒトIgG1 Fc領域である。いくつかの態様では、Fc領域がヒトIgG2 Fc領域である。いくつかの態様では、Fc領域が野生型Fc領域である。いくつかの態様では、Fc領域が変異型Fc領域である。いくつかの態様では、Fc領域のN末端部分が（例えばヒンジドメインにおいて）1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸分、切り詰められる。いくつかの態様では、望ましくないジスルフィド結合形成を妨害するために、ヒンジドメイン中のアミノ酸を変化させる。いくつかの態様では、望ましくないジスルフィド結合形成を妨害または阻止するために、システインがセリンに置き換えられる。いくつかの態様では、Fc領域のC末端部分が、1、2、3アミノ酸分またはそれ以上、切り詰められる。いくつかの態様では、Fc領域のC末端部分が1アミノ酸分、切り詰められる。一定の態様では、非FZDポリペプチドが、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む。一定の態様では、非FZDポリペプチドが、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38から本質的になる。一定の態様では、非FZDポリペプチドが、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37から本質的になる。

【0123】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、FZD受容体の少なくとも最小FriドメインとFc領域とを含む融合タンパク質である。本明細書にいう「融合タンパク質」は、少なくとも2種の遺伝子のスクレオチド配列を含む核酸分子によって発現されるハイブリッドタンパク質である。いくつかの態様では、第1ポリペプチドのC末端が、免疫グロブリンFc領域のN末端に連結される。いくつかの態様では、第1ポリペプチド（例えばFZD Friドメイン）が、Fc領域に直接（すなわち介在リンクなしで）連結される。いくつかの態様では、第1ポリペプチドがリンクを介してFc領域に連結される。

【0124】

本明細書において使用する「リンク」という用語は、第1ポリペプチド（例えばFZD構成要素）と第2ポリペプチド（例えばFc領域）との間に挿入されるリンクを指す。いくつかの態様では、リンクがペプチドリンクである。リンクはポリペプチドの発現、分泌または生物活性に有害な影響を及ぼしてはならない。リンクは抗原性であってはならず、免疫応答を誘発してはならない。適切なリンクは当業者には公知であり、グリシン残基とセリン残基との組み合わせを含むことが多く、立体障害の少ないアミノ酸を含むことが多い。有用なリンクに組み込むことができる他のアミノ酸には、スレオニン残基およびアラニン残基がある。リンクの長さは、例えば1~50アミノ酸長、1~22アミノ酸長、1~10アミノ酸長、1~5アミノ酸長、または1~3アミノ酸長の範囲をとることができる。リンクとしては、SerGly、GGSG、GSGS、GGGS、S(GGS)_n（式中nは1~7である）、GRA、ポリ(Gly)、ポリ(Ala)、ESGGGGVT (SEQ ID NO:57), LESGGGGVT

(SEQ ID NO:58), GRAQVT (SEQ ID NO:59), WRAQVT (SEQ ID NO:60), およびARGRAQVT (SEQ ID NO:61)

10

20

30

40

50

を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。本明細書にいうリンカーは、第1ポリペプチド（例えばFZD Friドメイン）のC末端からのアミノ酸残基も第2ポリペプチド（例えばFc領域）のN末端からのアミノ酸残基も含まない介在ペプチド配列である。

【0125】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、FZD Friドメインと、Fc領域と、FZD FriドメインをFc領域につなぐリンカーとを含む。いくつかの態様では、FZD Friドメインが、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、またはSEQ ID NO:33を含む。いくつかの態様では、リンカーが

ESGGGGVT (SEQ ID NO:57) またはLESGGGGVT (SEQ ID NO:58)

10

を含む。

【0126】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、またはSEQ ID NO:33を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含み、第1ポリペプチドは第2ポリペプチドに直接連結されている。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:20を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:20を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:20から本質的になる第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37から本質的になる第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:30を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:30を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号33を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号33を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:35を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号33から本質的になる第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:35から本質的になる第2ポリペプチドとを含む。

20

【0127】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、またはSEQ ID NO:33を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含み、第1ポリペプチドはリンカーによって第2ポリペプチドに接続されている。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号20を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号20から本質的になる第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号20から本質的になる第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号30を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号30から本質的になる第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号30を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:37を含む第2ポリペプチドとを含む。

30

40

50

6、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号33を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号33を含む第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:35を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、配列番号33から本質的になる第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:35から本質的になる第2ポリペプチドとを含む。

【0128】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、またはSEQ ID NO:33に対して少なくとも95%同一である第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含み、第1ポリペプチドは第2ポリペプチドに直接連結されている。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:20に対して少なくとも95%同一である第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:33に対して少なくとも95%同一である第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。

【0129】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、またはSEQ ID NO:33に対して少なくとも95%同一である第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含み、第1ポリペプチドは、リンカーによって第2ポリペプチドに接続されている。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:20に対して少なくとも95%同一である第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:33に対して少なくとも95%同一である第1ポリペプチドと、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはSEQ ID NO:38を含む第2ポリペプチドとを含む。

【0130】

FZDタンパク質は、タンパク質の輸送を指示するシグナル配列を含有する。シグナル配列（シグナルペプチドまたはリーダー配列ともいう）は、新生ポリペプチドのN末端に位置する。それらはポリペプチドを小胞体に向かわせ、タンパク質はそれぞれの行き先に、例えば細胞小器官の内部空間、内膜、細胞外膜、または分泌により細胞外部へと、分別される。大半のシグナル配列は、タンパク質が小胞体に輸送された後に、シグナルペプチダーゼによってタンパク質から切除される。ポリペプチドからのシグナル配列の切除は、通常、アミノ酸配列中の特異的部位で起こり、シグナル配列内のアミノ酸残基に依存する。特異的切断部位は通常は1つであるが、2つ以上の切断部位がシグナルペプチダーゼによって認識され、かつ/または使用されて、ポリペプチドのN末端が不均一になる場合がある。

例えば、シグナル配列内の異なる切断部位が使用されることにより、発現されるポリペプチドのN末端アミノ酸が異なることになりうる。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載するポリペプチドは、異なるN末端を持つポリペプチドの混合物を含みうる。いくつかの態様では、N末端が長さで1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10アミノ酸、またはそれ以上異なる。いくつかの態様では、N末端が長さで1、2、3、4、または5アミノ酸異なる。いくつかの態様では、ポリペプチドが実質的に均一、すなわちポリペプチドが同じN末端を有する。いくつかの態様では、ポリペプチドのシグナル配列が、1つまたは複数（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）のアミノ酸置換および/またはアミノ酸欠失を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドのシグナル配列が、1つの切断部位を優勢にすることで1種類のN末端を持つ実質的に均一なポリペプチドをもたらすことを可能にするアミノ酸置換および/またはアミノ酸欠失を含む。

10

【0131】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、およびSEQ ID NO:45からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0132】

一定の態様では、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:39の配列を含む。一定の態様では、作用物質が、1つまたは複数（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）の保存的置換を含むSEQ ID NO:39の配列を含む。一定の態様では、作用物質が、SEQ ID NO:39と少なくとも約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有する配列を含む。一定の態様では、SEQ ID NO:39の変異体が、1種または複数種のヒトWntタンパク質に結合する能力を維持している。

20

【0133】

一定の態様では、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:40の配列を含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:40である。一定の代替態様では、作用物質が、1つまたは複数（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）の保存的置換を含むSEQ ID NO:40の配列を含む。一定の態様では、作用物質が、SEQ ID NO:40と少なくとも約90%、約95%または約98%の配列同一性を有する配列を含む。一定の態様では、SEQ ID NO:40の変異体が、1種または複数種のヒトWntタンパク質に結合する能力を維持している。

30

【0134】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:41の配列を含む。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質がSEQ ID NO:41である。一定の代替態様では、作用物質が、1つまたは複数（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）の保存的置換を含むSEQ ID NO:41の配列を含む。一定の態様では、作用物質が、SEQ ID NO:41と少なくとも約90%、約95%、または約98%の配列同一性を有する配列を含む。一定の態様では、SEQ ID NO:41の変異体が、1種または複数種のヒトWntタンパク質に結合する能力を維持している。

30

【0135】

いくつかの態様では、Wnt結合作用物質がOMP-54F28（54F28ともいう）である。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質がOMP-54F28ではない。

40

【0136】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、およびSEQ ID NO:45からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。一定の態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的になる。一定の態様では、ポリペプチドがSEQ ID NO:39のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドがSEQ ID NO:40のアミノ酸配列を含む。一定の態様では、ポリペプチドがSEQ ID NO:42のアミノ酸配列を含む。一定の態様では、ポリペプチドがSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含む。一定の態様では、

50

ポリペプチドがSEQ ID NO:44のアミノ酸配列を含む。一定の態様では、ポリペプチドがSEQ ID NO:45のアミノ酸配列を含む。

【0137】

いくつかの態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む実質的に精製されたポリペプチドである。いくつかの態様では、ポリペプチドが、SEQ ID NO:41を含む実質的に精製されたポリペプチドである。一定の態様では、実質的に精製されたポリペプチドが、少なくとも90%の、ASAというN末端配列を有するポリペプチドからなる。いくつかの態様では、新生ポリペプチドが、1種類のN末端配列を持つ実質的に均一なポリペプチド産物をもたらすシグナル配列を含む。

10

【0138】

一定の態様では、Wnt結合作用物質が、免疫グロブリンのFc領域を含む。本発明の結合作用物質のいくつかが、ネイティブの、すなわち改変されていない定常領域を含む、ほぼ同じ免疫原性の融合タンパク質と比較した場合に、所望の生化学的特徴、例えば増加したがん細胞局在、増加した腫瘍浸透、低減した血清中半減期、または増加した血清中半減期を与えることができるよう、Fc領域の少なくとも一部分が欠失しているか、または他の形で改変されている融合タンパク質を含むことは、当業者には理解されるであろう。Fc領域の修飾は、1つまたは複数のドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含みうる。本明細書に開示する修飾融合タンパク質は、2つある重鎖定常ドメイン(CH2またはCH3)のうちの1つまたは複数の改変もしくは変更、またはヒンジ領域の改変もしくは変更を含みうる。別の態様では、CH2ドメイン全体を除去することもできる(CH2コンストラクト)。いくつかの態様では、省かれた定常領域ドメインが、欠如している定常領域ドメインによって通例付与されている分子の可動性の一部を提供する短いアミノ酸スペーサー(例えば10aa残基)で置き換えられる。

20

【0139】

いくつかの態様において、修飾融合タンパク質は、CH3ドメインをヒンジ領域に直接連結するように工学的に操作されている。別の態様では、ヒンジ領域と修飾CH2および/またはCH3ドメインとの間にペプチドスペーサーが挿入されている。例えば、CH2ドメインが欠失していて、残ったCH3ドメイン(修飾または無修飾)が5~20アミノ酸のスペーサーでヒンジ領域に接合されているコンストラクトを、発現させることができる。そのようなスペーサーは、定常ドメインの調節要素が自由かつアクセス可能な状態を保っていることまたはヒンジ領域が可動性を保っていることを保証するために、付加することができる。しかし、アミノ酸スペーサーは、場合によっては、免疫原性であって、コンストラクトに対する望まれない免疫応答を誘発することになりうる点に注意すべきである。したがって一定の態様では、コンストラクトに付加されるスペーサーはいずれも、融合タンパク質の望ましい生物学的品質が維持されるように、比較的非免疫原性であるだろう。

30

【0140】

いくつかの態様では、修飾融合タンパク質が、定常ドメインの部分的でしかない欠失を有するか、小数の、あるいは一つだけのアミノ酸の置換を有しうる。例えば、CH2ドメインの選択された区域における単一アミノ酸の変異は、Fc結合を実質的に低減させ、よってがん細胞局在および/または腫瘍浸透を増加させるのに十分でありうる。同様に、1つまたは複数の定常領域ドメインのうち、特異的エフェクター機能(例えば補体C1q結合)を制御する部分を、単純に欠失させることができ望ましい場合もありうる。そのような定常領域の部分的欠失は、対象定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能を損なわずに残したまま、結合作用物質の選ばれた特徴(例えば血清中半減期)を改良しうる。そのうえ、上記で言及したように、本開示の融合タンパク質の定常領域は、結果として得られるコンストラクトのプロファイルを強化する1つまたは複数のアミノ酸の変異または置換によって修飾してもよい。この点で、修飾融合タンパク質の立体配置および免疫原性プロファイルを実質的に維持したまま、保存された結合部位が与える活性(例えばFc結合)を妨害することが可能になりうる。一定の態様では、修飾融合タンパク質が、エフェクター機能の減少

40

50

または増加などといった望ましい特徴を強化するために、またはより多くの細胞毒もしくは糖質取り付け部位を設けるために、定常領域への1つまたは複数のアミノ酸の付加を含む。

【0141】

定常領域が数種類のエフェクター機能を媒介することは、当技術分野において公知である。例えば(抗原に結合した) IgG抗体またはIgM抗体のFc領域への補体のC1構成要素の結合は、補体系を活性化する。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化および溶解において重要である。補体の活性化は炎症応答も刺激し、自己免疫過敏症にも関与しうる。加えて、免疫グロブリンのFc領域は、Fc受容体(FcR)を発現する細胞に結合することができる。IgG(ガンマ受容体)、IgE(イプシロン受容体)、IgA(アルファ受容体)およびIgM(ミュー受容体)など、異なる抗体クラスに特異的なFc受容体がいくつがある。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体被覆粒子の貪食と破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆ターゲット細胞の溶解、炎症性メディエーターの放出、胎盤移行、および免疫グロブリン生産の制御などといった、いくつかの重要な多様な生物学的応答の引き金を引く。

10

【0142】

いくつかの態様では、修飾融合タンパク質が改変されたエフェクター機能を与え、それが、結果として、投与された作用物質の生物学的プロファイルに影響を及ぼす。例えば、いくつかの態様において、定常領域ドメインの欠失または(点変異もしくは他の手段による)不活性化は、循環修飾作用物質のFc受容体結合を低減し、それによってがん細胞局在および/または腫瘍浸透を増加させうる。別の態様では、定常領域修飾が作用物質の血清中半減期を増加または低減させる。いくつかの態様では、ジスルフィド連結またはオリゴ糖部分が排除されるように、定常領域が修飾される。

20

【0143】

一定の態様では、修飾融合タンパク質が、通常はFc領域に関連する1つまたは複数のエフェクター機能を持たない。いくつかの態様では、作用物質が、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)活性、および/または補体依存性細胞傷害(CDC)活性を持たない。一定の態様では、作用物質が、Fc受容体および/または補体因子に結合しない。一定の態様では、作用物質はエフェクター機能を持たない。

30

【0144】

いくつかの態様において、本明細書に記載するWnt結合作用物質(例えば可溶性受容体)は、免疫原性が低減するように修飾されている。一般に、完全に正常なヒトタンパク質に対する免疫応答は、それらのタンパク質を治療薬として使用する場合には稀である。しかし、多くの融合タンパク質は自然界に見いだされる配列と同じポリペプチド配列を含むものの、いくつかの治療用融合タンパク質は、哺乳動物において免疫原性であることが示されている。いくつかの研究では、リンカーを含む融合タンパク質は、リンカーを含有しない融合タンパク質より免疫原性が高いことが見いだされている。したがって、いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、免疫原性を予測するために、計算的手法によって解析される。いくつかの態様では、ポリペプチドが、T細胞エピトープおよび/またはB細胞エピトープの存在について解析される。T細胞エピトープまたはB細胞エピトープが同定され、かつ/または予測されたら、そのエピトープを妨害または破壊するために、それらの領域に修飾(例えばアミノ酸置換)を加えることができる。T細胞エピトープおよび/またはB細胞エピトープを予測するために使用することができるアルゴリズムおよびソフトウェアは、当技術分野では種々知られている。例えば、ソフトウェアプログラムSYFP EITHI、HLA Bind、PEPVAC、RANKPEP、DiscoTope、ElliPro、およびAntibody Epitope Predictionは、いずれも公的に利用することができる。

40

【0145】

いくつかの態様では、本明細書に記載するWnt結合作用物質(例えば可溶性受容体)またはWnt結合ポリペプチドのいずれかを生産する細胞が提供される。いくつかの態様では、本明細書に記載するWnt結合作用物質(例えば可溶性受容体)またはWnt結合ポリペプチ

50

ドのいずれかを含む組成物が提供される。いくつかの態様では、組成物が、少なくとも80%、90%、95%、97%、98%、または99%のポリペプチドがASAというN末端配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様では、組成物が、100%のポリペプチドがASAというN末端配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様では、組成物が、少なくとも80%のポリペプチドがASAというN末端配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様では、組成物が、少なくとも90%のポリペプチドがASAというN末端配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様では、組成物が、少なくとも95%のポリペプチドがASAというN末端配列を有するポリペプチドを含む。

【0146】

本明細書に記載するポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであることができる。本発明の一部のアミノ酸配列を、タンパク質の構造または機能に著しい影響を及ぼさずに変化させうることは、当技術分野では認識されるであろう。そのような配列の相違が考えられる場合は、タンパク質上には活性を決定する重要な区域があるだろうということに留意すべきである。したがって本発明はさらに、FZDタンパク質の実質的な活性を示す、またはFZDタンパク質の領域、例えば本明細書において論述するタンパク質部分を含む、ポリペプチドのバリエーションを包含する。そのようなミュータントは、欠失、挿入、逆位、反復、およびタイプ置換 (type substitution) を含む。

【0147】

もちろん、当業者が行うであろうアミノ酸置換の数は、上述したものを含む多くの因子に依存する。一定の態様では、任意の所与の可溶性受容体ポリペプチドについて、置換の数は、50、40、30、25、20、15、10、5または3個以下であるだろう。

【0148】

本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分は、対応する完全長ポリペプチドをペプチド合成によって生産するために使用することができる。それゆえに、フラグメントは、完全長ポリペプチドを生産するための中間体として使用することができる。ポリペプチドのこれらのフラグメントまたは部分を「タンパク質フラグメント」または「ポリペプチドフラグメント」ということもできる。

【0149】

本発明の「タンパク質フラグメント」は、1種もしくは複数種のヒトWntタンパク質または1種もしくは複数種のヒトFZDタンパク質に結合する能力を有するタンパク質の一部分または全部である。いくつかの態様では、フラグメントが、1種または複数種のヒトWntタンパク質に対して高いアフィニティを有する。いくつかの態様では、フラグメントが、1種または複数種のヒトFZDタンパク質に対して高いアフィニティを有する。本明細書に記載するWnt結合作用物質のいくつかのフラグメントは、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部（例えばFc領域）に連結されたFZDタンパク質の細胞外部分の少なくとも一部を含むタンパク質フラグメントである。タンパク質フラグメントの結合アフィニティは約 $10^{-11} \sim 10^{-12}$ Mの範囲内にありうる。ただし、フラグメントのサイズが変わると、アフィニティはかなり変動して、 $10^{-7} \sim 10^{-13}$ Mの範囲に及びうる。いくつかの態様では、フラグメントが約100～約200アミノ酸長であり、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部に連結された結合ドメインを含む。

【0150】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は任意の公知の方法によって調製することができる。いくつかの態様では、関心対象の抗原（例えば精製されたペプチドフラグメント、完全長組換えタンパク質、または融合タンパク質）を皮下または腹腔内に複数回注射することで動物（例えばウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ロバ）を免疫することにより、ポリクローナル抗体を生じさせる。抗原は、任意で、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) または血清アルブミンなどの担体にコンジュゲートすることができる。抗原（担体タンパク質ありまたは担体タンパク質なし）を滅菌食塩水に希釈し、通常はアジュバント（例えば完全フロイントアジュバン

10

20

30

40

50

トまたは不完全フロイントアジュvant)と混和することで、安定なエマルションを形成させる。十分な期間の後、免疫された動物の血液および/または腹水からポリクローナル抗体が回収される。ポリクローナル抗体は当技術分野における標準的方法によって、例えれば限定するわけではないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および透析などによって、血清または腹水から精製することができる。

【0151】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知のハイブリドーマ法を使って調製することができる(例えはKohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497を参照されたい)。ハイブリドーマ法を使用するいくつかの態様では、マウス、ハムスター、または他の適当な宿主動物を上述のように免疫することで、免疫抗原に特異的に結合するであろう抗体の生産をリンパ球から引き出す。いくつかの態様では、リンパ球をインビトロで免疫することができる。いくつかの態様において、免疫抗原はヒトタンパク質またはその一部分であることができる。いくつかの態様において、免疫抗原はマウスタンパク質またはその一部分であることができる。

10

【0152】

免疫後に、リンパ球を単離し、適切な骨髄腫細胞株と例えはポリエチレングリコールを使って融合させることで、ハイブリドーマ細胞を形成させ、次にそれを、未融合のリンパ球および骨髄腫細胞から選び出すことができる。選んだ抗原を特異的に指向するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは、例えは限定するわけではないが、免疫沈降、免疫プロッティング、およびインビトロ結合アッセイ(例えはフローサイトメトリー、FACS、ELISA、およびラジオイムノアッセイ)を含むさまざまな方法によって同定することができる。ハイブリドーマは、インビトロ培養において標準的方法を使って増殖させるか(J.W. Goding, 1996 'Monoclonal Antibodies: Principles and Practice' 3rd Edition, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ)またはインビボで動物における腹水腫瘍として増殖させることができる。モノクローナル抗体は、例えは限定するわけではないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および透析を含む当技術分野における標準的方法に従って、培養培地または腹水から精製することができる。

20

【0153】

一定の態様では、当業者に公知の組換えDNA技法を使って、モノクローナル抗体を作ることができる。抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使ったRT-PCRなどによって、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、それらの配列を従来の技法を使って決定する。次に、重鎖および軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを、本来であれば免疫グロブリンタンパク質を生産しない大腸菌(*E. coli*)、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞などの宿主動物にトランسفェクトした時にモノクローナル抗体を生産する適切な発現ベクターにクローニングする。別の態様では、組換えモノクローナル抗体、またはそのフラグメントを、ファージディスプレイライブリーから単離することができる(例えはMcCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; およびMarks et al., 1991, *J Mol. Biol.*, 222:581-597を参照されたい)。

30

【0154】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、代替抗体を生成させるために、組換えDNA技術を使って、いくつかの異なる方法で、さらに修飾することができる。いくつかの態様では、例えはマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインで、例えはヒト抗体の同領域を置換することで、キメラ抗体を生成させるか、または非免疫グロブリンポリペプチドを置換することで、融合抗体を生成させることができる。いくつかの態様では、定常領域を切り詰めるか除去することで、モノクローナル抗体の所望の抗体

40

50

フラグメントを生成させる。モノクローナル抗体の特異性、アフィニティなどを最適化するため、可変領域の部位指定変異導入または高密度変異導入を使用することができる。

【0155】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがヒト化抗体である。典型的には、ヒト化抗体は、CDRの残基が、当業者に公知の方法を使って、所望の特異性、アフィニティ、および/または結合能を有する非ヒト種（例えはマウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど）のCDRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリンである。いくつかの態様では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域残基を、所望の特異性、アフィニティ、および/または結合能を有する非ヒト種からの抗体中の対応する残基で置き換える。いくつかの態様では、抗体の特異性、アフィニティ、および/または能力を精密化し最適化するために、Fvフレームワーク領域中および/または置き換えられた非ヒト残基内のさらなる残基の置換によって、ヒト化抗体をさらに修飾することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDRの全てまたは実質的に全てを含有する少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメイン領域の実質的に全てを含むであろうが、その一方で、フレームワーク領域の全て、または実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域または定常ドメイン（Fc）の少なくとも一部分（典型的にはヒト免疫グロブリンのもの）も含むことができる。一定の態様では、そのようなヒト化抗体が治療に使用される。なぜなら、それらはヒト対象に投与された場合の抗原性およびHAMA（ヒト抗マウス抗体）応答を低減しうるからである。

10

20

30

40

【0156】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターがヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野において公知のさまざまな技法を使って、直接的に調製することができる。いくつかの態様では、ターゲット抗原に対する抗体を生産する、インビトロで免疫した、または免疫個体から単離した、不死化ヒトBリンパ球を、生成させることができる（例えはCole et al., 1985「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」Alan R. Liss, p.77;Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147:86-95;ならびに米国特許第5,750,373号；同第5,567,610号；および同第5,229,275号を参照されたい）。いくつかの態様では、ヒト抗体を発現するファージライブラーから、ヒト抗体を選択することができる（Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314;Sheets et al., 1998, PNAS, 95:6157-6162;Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381;Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581）。あるいは、免疫されていないドナーの免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーから、ファージディスプレイ技術を使って、ヒト抗体および抗体フラグメントをインビトロで生産することもできる。抗体ファージライブラーの生成と使用のための技法は、米国特許第5,969,108号；同第6,172,197号；同第5,885,793号；同第6,521,404号；同第6,544,731号；同第6,555,313号；同第6,582,915号；同第6,593,081号；同第6,300,064号；同第6,653,068号；同第6,706,484号；および同第7,264,963号；ならびにRothe et al., 2008, J. Mol. Biol., 376:1182-1200に記載されている。限定するわけではないが鎖シャフリング（Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783）や部位指定変異導入などといった親和性成熟戦略は、当技術分野では公知であり、高アフィニティヒト抗体の生成に使用することができる。

【0157】

いくつかの態様では、ヒト免疫グロブリン座を持つトランスジェニックマウスにおいて、ヒト抗体を作ることができる。これらのマウスは、免疫すると、内在性免疫グロブリン生産の非存在下で、ヒト抗体の全レパートリーを生産する能力を有する。このアプローチは、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；および同第5,661,016号に記載されている。

【0158】

本発明は、少なくとも1種のヒトFZDタンパク質または少なくとも1種のWntタンパク質を特異的に認識する二重特異性抗体も包含する。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異な

50

るエピトープを特異的に認識し、それらに結合する能力を有する。異なるエピトープは同じ分子内にあってもよいし（例えばヒトFZD5上の2つの異なるエピトープ）、異なる分子上にあってもよい（例えばFZD5上の1つのエピトープと第2のタンパク質上の異なるエピトープ）。いくつかの態様では、二重特異性抗体がモノクローナルヒト抗体またはモノクローナルヒト化抗体である。いくつかの態様において、抗体は、第1抗原ターゲットを発現する細胞に細胞性防御機構を集中させるために、第1抗原ターゲット（例えばFZDタンパク質）と、第2抗原ターゲット、例えば白血球上のエフェクター分子（例えばCD2、CD3、CD28、CD80、またはCD86）またはFc受容体（例えばCD64、CD32、またはCD16）とを特異的に認識し、それらに結合することができる。いくつかの態様では、抗体を使って、細胞傷害性作用物質を、特定のターゲット抗原を発現する細胞に向かわせることができる。これらの抗体は、抗原結合アームと、細胞傷害性作用物質または放射性核種キレーター、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETAなどに結合するアームとを有する。

10

【0159】

二重特異性抗体を作るための技法は、当業者には公知である。例えばMillstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol*, 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; 米国特許第5,731,168号；および米国特許出願公開第2011/0123532号を参照されたい。二重特異性抗体は、インタクトな抗体または抗体フラグメントであることができる。3つ以上の結合価を有する抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる（Tutt et al., 1991, *J. Immunol.*, 147:60）。したがって、一定の態様では、抗体が多重特異性である。

20

【0160】

一定の態様において、本明細書に記載する抗体（または他のポリペプチド）は、単一特異性であることができる。例えば、一定の態様では、抗体が含有する1つまたは複数の抗原結合部位のそれぞれが、異なるタンパク質上の相同エピトープを結合する能力を有する（または結合する）。一定の態様において、本明細書に記載する単一特異性抗体の抗原結合部位は、例えばFZD5およびFZD7に結合する能力を有する（または結合する）（すなわち、同じエピトープがFZD5タンパク質にもFZD7タンパク質にも見いだされる）。

30

【0161】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。抗体フラグメントは、インタクトな抗体とは異なる機能または能力を有しうる。例えば抗体フラグメントは増加した腫瘍浸透性を有しうる。抗体フラグメントを生産するための技法は、例えば限定するわけではないがインタクトな抗体のタンパク質分解消化を含めて、種々知られている。いくつかの態様において、抗体フラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって生産されるF(ab')2フラグメントが含まれる。いくつかの態様において、抗体フラグメントには、F(ab')2フラグメントのジスルフィド橋を還元することによって生成するFabフラグメントが含まれる。別の態様において、抗体フラグメントには、抗体分子をパパインと還元剤で処理することによって生成するFabフラグメントが含まれる。一定の態様では、抗体フラグメントが組換え生産される。いくつかの態様において、抗体フラグメントには、Fvフラグメントまたは一本鎖Fv（scFv）フラグメントが含まれる。Fab、Fv、およびscFv抗体フラグメントは、大腸菌または他の宿主細胞中で発現させ、そこから分泌させることができ、それにより、これらのフラグメントを大量に生産することが可能になる。いくつかの態様では、抗体フラグメントが、本明細書において論じる抗体ファージライブライアリーカーから単離される。例えば、FZDタンパク質もしくはWntタンパク質またはそれらの誘導体、フラグメント、類似体または相同体に対して所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にするために、Fab発現ライブライアリーを構築するための方法を使用することができる（Huse et al., 1989, *Science*, 246:1275-1281）。いくつかの態様では、抗体フラグメントが線状抗体フラグメントである。一定の態様では、抗体フラグメントが単一特異性または二重特異性である。一定

40

50

の態様では、Wnt経路インヒビターがscFvである。1種もしくは複数種のヒトFZDタンパク質または1種もしくは複数種のヒトWntタンパク質に特異的な一本鎖抗体の生産には、さまざまな技法を使用することができる。

【0162】

さらに、抗体をその血清中半減期を増加させるために修飾することが、抗体フラグメントの場合は特に、好ましい場合がある。これは、例えば、抗体フラグメント中の適当な領域への変異導入によって抗体フラグメントにサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことによって、または前記エピトープをペプチドタグに組み込んでから、それを抗体フラグメントの一端または中央に（例えばDNA合成またはペプチド合成で）融合することによって、達成することができる。いくつかの態様において、抗体は、その血清中半減期が減少するように、修飾される。

10

【0163】

ヘテロコンジュゲート抗体も本発明の範囲に含まれる。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合で接合された2つの抗体から構成される。そのような抗体は、例えば免疫細胞を望まれない細胞にターゲティングするために提唱されている（米国特許第4,676,980号）。ヘテロコンジュゲート抗体を、合成タンパク質化学における公知の方法、例えば架橋剤を必要とするものを使って、インピトロで調製することもできると考えられる。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応を使って、またはチオエーテル結合を形成させることによって、構築することができる。この目的に適した試薬の例には、イミノチオレートや、メチル-4-メルカプトブチルイミデートがある。

20

【0164】

本発明の目的上、修飾抗体が、抗体とターゲット（すなわちヒトFZDタンパク質またはヒトWntタンパク質）との会合をもたらす任意のタイプの可変領域を含みうることは、理解されるはずである。これに関連して、可変領域は、体液性応答のマウントと所望の腫瘍関連抗原に対する免疫グロブリンの生成とを誘発することができる任意のタイプの哺乳動物を含みうる、またはその哺乳動物に由来しうる。したがって、修飾抗体の可変領域は、例えばヒト、マウス、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル、マカクなど）由来またはウサギ由来であることができる。いくつかの態様では、修飾免疫グロブリンの可変領域と定常領域がどちらもヒトの領域である。別の態様では、その分子の結合特性を改良し、または免疫原性を低減するために、適合する抗体（通常は非ヒト供給源に由来するもの）の可変領域を工学的に操作または特異的に加工することができる。この点で、本発明において有用な可変領域は、ヒト化されたもの、またはインポートされたアミノ酸配列を含めることにより、他の形で改変されたものでありうる。

30

【0165】

一定の態様では、重鎖および軽鎖の可変ドメインがどちらも、1つまたは複数のCDRの少なくとも部分的な置き換えによって、そして必要であれば、部分的なフレームワーク領域の置き換えならびに配列修飾および/または配列改変によって、改変される。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラス、さらには同じサブクラスの抗体に由来しうるが、CDRは、好ましくは、異なる種からの抗体に由来するであろうと考えられる。一つの可変ドメインの抗原結合能をもう一つの可変ドメインに移すために、CDRの全てをドナー可変領域からのCDRの全てで置き換える必要はないであろう。むしろ、抗原結合部位の活性を維持するのに必要な残基を移す必要しかないであろう。

40

【0166】

可変領域の改変とは別に、本発明の修飾抗体が、ネイティブの、すなわち改変されていない定常領域を含む、ほぼ同じ免疫原性の抗体と比較した場合に、所望の生化学的特徴、例えば増加した腫瘍局在および/または増加した血清中半減期が得られるように、定常領域ドメインの1つまたは複数の少なくとも断片が欠失しているかまたは他の形で改変されている抗体（例えば完全長抗体またはその免疫反応性フラグメント）を含むであろうことは、当業者には理解されるだろう。いくつかの態様では、修飾抗体の定常領域はヒト定常領域を含むであろう。本発明と適合する定常領域の修飾は、1つまたは複数のドメインに

50

おける1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失または置換を含む。本明細書において開示する修飾抗体は、3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2またはCH3）の1つまたは複数への、かつ/または軽鎖定常ドメイン（CL）への改変または修飾を含みうる。いくつかの態様では、1つまたは複数のドメインを、修飾抗体の定常領域から部分的にまたは完全に欠失させる。いくつかの態様では、修飾抗体が、CH2ドメイン全体が除去されたドメイン欠失コンストラクトまたはドメイン欠失変異体（CH2コンストラクト）を含むであろう。いくつかの態様では、省かれた定常領域ドメインが、欠如している定常領域ドメインによって通常付与されている分子の可動性の一部を提供する短いアミノ酸スペーサー（例えば10アミノ酸残基）で置き換えられる。

【0167】

10

いくつかの態様において、修飾抗体は、CH3ドメインを抗体のヒンジ領域に直接融合するように、工学的に操作される。別の態様では、ヒンジ領域と修飾CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインの間にペプチドスペーサーが挿入される。例えば、CH2ドメインが欠失していて、残ったCH3ドメイン（修飾または無修飾）が5~20アミノ酸のスペーサーでヒンジ領域に接合されているコンストラクトを、発現させることができる。そのようなスペーサーは、定常ドメインの調節要素が自由かつアクセス可能な状態を保っていることまたはヒンジ領域が可動性を保っていることを保証するために、付加することができる。しかし、アミノ酸スペーサーは、場合によっては、免疫原性であって、コンストラクトに対する望まれない免疫応答を誘発することになりうる点に注意すべきである。したがって一定の態様では、コンストラクトに付加されるスペーサーはいずれも、修飾抗体の望ましい生物学的品質が維持されるように、比較的非免疫原性であるだろう。

20

【0168】

30

いくつかの態様では、修飾抗体が、定常ドメインの部分的でしかない欠失を有するか、小数の、あるいは一つだけのアミノ酸の置換を有しうる。例えば、CH2ドメインの選択された区域における單一アミノ酸の変異は、Fc結合を実質的に低減させ、よってがん細胞局在および/または腫瘍浸透を増加させるのに十分でありうる。同様に、1つまたは複数の定常領域ドメインのうち、特異的エフェクター機能（例えば補体C1q結合）を制御する部分を、単純に欠失させることができ望ましい場合もありうる。そのような定常領域の部分的欠失は、対象定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能を損なわずに残したまま、抗体の選ばれた特徴（血清中半減期）を改良しうる。そのうえ、上記で言及したように、本開示の抗体の定常領域は、結果として得られるコンストラクトのプロファイルを強化する1つまたは複数のアミノ酸の変異または置換によって修飾してもよい。この点で、修飾抗体の立体配置および免疫原性プロファイルを実質的に維持したまま、保存された結合部位が与える活性（例えばFc結合）を妨害することが可能になりうる。一定の態様では、修飾抗体が、エフェクター機能の減少または増加などといった望ましい特徴を強化するために、またはより多くの細胞毒もしくは糖質取り付け部位を設けるために、定常領域への1つまたは複数のアミノ酸の付加を含む。

30

【0169】

40

定常領域が数種類のエフェクター機能を媒介することは、当技術分野において公知である。例えば（抗原に結合した）IgG抗体またはIgM抗体のFc領域への補体のC1構成要素の結合は、補体系を活性化する。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化および溶解において重要である。補体の活性化は炎症応答も刺激し、自己免疫過敏症にも関与しうる。加えて、抗体のFc領域は、Fc受容体（FcR）を発現する細胞に結合することができる。IgG（ガンマ受容体）、IgE（イプシロン受容体）、IgA（アルファ受容体）およびIgM（ミュー受容体）など、異なる抗体クラスに特異的なFc受容体がいくつかある。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体被覆粒子の貪食と破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆ターゲット細胞の溶解、炎症性メディエーターの放出、胎盤移行、および免疫グロブリン生産の制御などといった、いくつかの重要な多様な生物学的応答の引き金を引く。

【0170】

50

一定の態様において、Wnt経路インヒビターは、改変されたエフェクター機能を与える抗体である。これらの改変されたエフェクター機能は、投与された抗体の生物学的プロファイルに影響を及ぼしうる。例えば、いくつかの態様において、定常領域ドメインの欠失または（点変異もしくは他の手段による）不活性化は、循環修飾抗体（例えば抗FZD抗体）のFc受容体結合を低減し、それによってがん細胞局在および/または腫瘍浸透を増加させうる。別の態様では、定常領域修飾が抗体の血清中半減期を増加または低減させる。いくつかの態様では、ジスルフィド連結またはオリゴ糖部分が排除されるように、定常領域が修飾される。本発明による定常領域の修飾は、当業者によく理解されている周知の生化学的技法または分子工学的手法を使って、容易に行うことができる。

【0171】

10

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが1つまたは複数のエフェクター機能を持たない抗体である。例えば、いくつかの態様では、抗体がADCC活性、および/またはCDC活性を持たない。一定の態様では、抗体がFc受容体および/または補体因子に結合しない。一定の態様では、抗体がエフェクター機能を持たない。

【0172】

本発明はさらに、本明細書において説明するキメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体、またはそれらの抗体フラグメントに実質的に相同な変異体および等価物を包含する。これらは、例えば保存的置換変異、すなわち1つまたは複数のアミノ酸の類似するアミノ酸による置換を含有することができる。例えば、保存的置換とは、同じ一般クラス内で、あるアミノ酸を別のアミノ酸で置換すること、例えばある酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸で置換すること、ある塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸で置換すること、またはある中性アミノ酸を別の中性アミノ酸で置換することなどを指す。保存的アミノ酸置換が意図するものは、当技術分野において周知であり、本明細書でも説明する。

20

【0173】

したがって本発明は、抗体を生産するための方法を提供する。いくつかの態様では、抗体を生産するための方法が、ハイブリドーマ技法を使用する工程を含む。いくつかの態様では、ヒトFZDタンパク質に結合する抗体を生産するための方法が提供される。いくつかの態様では、ヒトWntタンパク質に結合する抗体を生産するための方法が提供される。いくつかの態様では、抗体を生成させる方法が、ヒトファージライブラリーをスクリーニングする工程を含む。いくつかの態様では、単一の抗原結合部位を含む膜結合型ヘテロ二量体分子を使って、抗体が同定される。いくつかの非限定的態様では、抗体が米国特許出願公開第2011/0287979号に記載の方法およびポリペプチドを使って同定される。

30

【0174】

本発明はさらに、少なくとも1種のFZDタンパク質に結合する抗体を同定する方法を提供する。いくつかの態様では、FZDタンパク質またはその一部分への結合に関するFACSによるスクリーニングで、抗体が同定される。いくつかの態様では、FZDタンパク質への結合に関するELISAを使ったスクリーニングによって、抗体が同定される。いくつかの態様では、ヒトWntタンパク質へのFZDタンパク質の結合の遮断に関するFACSによるスクリーニングで、抗体が同定される。いくつかの態様では、抗体が、Wnt経路シグナリングの阻害または遮断に関するスクリーニングによって同定される。

40

【0175】

本発明はさらに、少なくとも1種のWntタンパク質に結合する抗体を同定する方法を提供する。いくつかの態様では、Wntタンパク質またはその一部分への結合に関するFACSによるスクリーニングで、抗体が同定される。いくつかの態様では、Wntタンパク質への結合に関するELISAを用いるスクリーニングによって、抗体が同定される。いくつかの態様では、ヒトFZDタンパク質へのWntタンパク質の結合の遮断に関するFACSによるスクリーニングで、抗体が同定される。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングの阻害または遮断に関するスクリーニングによって、抗体が同定される。

【0176】

いくつかの態様では、少なくとも1種のヒトFZDタンパク質に対する抗体を生成させる方

50

法が、ヒトFZDタンパク質に結合する抗体に関して、抗体発現ライブラリーをスクリーニングする工程を含む。いくつかの態様では、抗体発現ライブラリーがファージライブラリーである。いくつかの態様では、抗体発現ライブラリーが哺乳動物細胞ライブラリーである。いくつかの態様では、スクリーニングがパンニングを含む。いくつかの態様では、第1スクリーニングにおいて同定される抗体に、異なるFZDタンパク質を使ったスクリーニングを再び行い、それによって、第1FZDタンパク質および第2FZDタンパク質に結合する抗体を同定する。いくつかの態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体が第1FZDタンパク質および少なくとも1種の他のFZDタンパク質に結合する。一定の態様では、少なくとも1種の他のFZDタンパク質が、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群より選択される。一定の態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体が、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8に結合する。いくつかの態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体が、FZDアンタゴニストである。いくつかの態様では、本明細書に記載する方法によって同定される抗体が、Wnt経路を阻害する。いくつかの態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体が - カテニンシグナリングを阻害する。

10

【0177】

いくつかの態様では、少なくとも1種のヒトWntタンパク質に対する抗体を生成する方法が、ヒトWntタンパク質に結合する抗体に関して、抗体発現ライブラリーをスクリーニングする工程を含む。いくつかの態様では、抗体発現ライブラリーがファージライブラリーである。いくつかの態様では、抗体発現ライブラリーが哺乳動物細胞ライブラリーである。いくつかの態様では、スクリーニングがパンニングを含む。いくつかの態様では、第1スクリーニングにおいて同定される抗体に、異なるWntタンパク質を使ったスクリーニングを再び行い、それによって、第1Wntタンパク質および第2Wntタンパク質に結合する抗体を同定する。いくつかの態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体が第1Wntタンパク質および少なくとも1種の他のWntタンパク質に結合する。一定の態様では、少なくとも1種の他のFZDタンパク質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される。いくつかの態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体がWntアンタゴニストである。いくつかの態様では、本明細書に記載する方法によって同定される抗体がWnt経路を阻害する。いくつかの態様では、スクリーニングにおいて同定される抗体が - カテニンシグナリングを阻害する。

20

【0178】

一定の態様では、本明細書に記載する抗体が単離されている。一定の態様では、本明細書に記載する抗体が実質的に純粋である。

30

【0179】

本発明のいくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがポリペプチドである。ポリペプチドは、少なくとも1種のヒトFZDタンパク質または少なくとも1種のWntタンパク質に結合する、抗体またはそのフラグメントを含む、組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドができる。本発明のいくつかのアミノ酸配列を、タンパク質の構造または機能に著しい影響を及ぼさずに変化させることは、当技術分野では認識されるであろう。したがって本発明はさらに、ヒトFZDタンパク質またはWntタンパク質に対する抗体またはそのフラグメントの実質的活性を示すか、同抗体またはそのフラグメントの領域を含む、ポリペプチドのバリエーションを包含する。いくつかの態様では、FZD結合ポリペプチドまたはWnt結合ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションが、欠失、挿入、逆位、反復、および/または他のタイプの置換を含む。

40

【0180】

ポリペプチド、その類似体および変異体はさらに、通常はポリペプチドの一部ではない追加の化学部分を含有するように修飾することができる。誘導体化された部分は、ポリペプチドの溶解度、生物学的半減期および/または吸収を改善することができる。これらの部分は、ポリペプチドおよび変異体の望ましくない任意の副作用を低減または排除することができる。化学部分に関する総説は「Remington: The Science and Practice of Pharm

50

acy」22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press(ロンドン)に見いだすことができる。

【0181】

本明細書に記載する単離されたポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって生産することができる。そのような方法は、直接タンパク質合成法から、ポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築してその配列を適切な宿主内で発現させる方法まで、さまざまである。いくつかの態様では、関心対象の野生型タンパク質をコードするDNAを単離または合成することにより、組換え技術を使ってDNA配列を構築する。任意で、部位特異的変異導入法によって配列に変異を導入することで、その機能的類似体を得ることもできる。

10

【0182】

いくつかの態様では、関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列を、オリゴヌクレオチド合成装置を使って、化学合成によって構築することができる。オリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、関心対象の組換えポリペプチドの生産を行う予定の宿主細胞において好まれるコドンを選択することによって設計される。標準的方法を適用することで、単離された関心対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使って、逆翻訳遺伝子を構築することができる。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成してから、それらをライゲートすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的アセンブリのために、5'または3'オーバーハンギングを含有する。

20

【0183】

(合成、部位指定変異導入法、または他の方法による)アセンブリが終わったら、関心対象の特定ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、発現ベクターに挿入して、所望の宿主におけるタンパク質の発現に適した発現制御配列に作動的に連結することができる。適正なアセンブリは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、および/または適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現によって確かめることができる。当技術分野においては周知であるように、宿主においてトランスフェクトされた遺伝子の高い発現レベルを得るには、選んだ発現宿主において機能的な転写および翻訳発現制御配列に遺伝子が作動的に連結されていなければならない。

30

【0184】

一定の態様では、組換え発現ベクターを使って、ヒトFZDタンパク質またはWntタンパク質に対する結合作用物質(例えば抗体または可溶性受容体)またはそのフラグメントをコードするDNAを増幅し、発現させる。例えば組換え発現ベクターは、哺乳動物遺伝子、微生物遺伝子、ウイルス遺伝子または昆虫遺伝子に由来する適切な転写および/または翻訳調節要素に作動的に連結された、FZD結合作用物質、Wnt結合作用物質、抗FZD抗体もしくはそのフラグメント、抗Wnt抗体もしくはそのフラグメント、またはFZD-Fc可溶性受容体のポリペプチド鎖をコードする、合成DNAフラグメントまたはcDNA由来のDNAフラグメントを有する、複製可能なDNAコンストラクトであることができる。転写単位は、一般に、(1)遺伝子発現において調節的役割を有する1つまたは複数の遺伝要素、例えば転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造配列またはコード配列、および(3)適当な転写および翻訳開始および終結配列のアセンブリを含む。調節要素には、転写を制御するためのオペレーター配列を含めることができる。通常は複製起点によって付与される宿主内で複製する能力と、形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子を、さらに組み込むことができる。DNA領域は、それらが互いに機能的な関係にある場合に、「作動的に連結」されている。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNAは、それがあるポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現するのであれば、そのポリペプチドのDNAに作動的に連結されており、プロモーターは、それがあるコード配列の転写を制御するのであれば、そのコード配列に作動的に連結されており、あ

40

50

るいはリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするような位置にあるのであれば、コード配列に作動的に連結されている。いくつかの態様では、酵母発現系における使用を意図した構造要素が、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される別の態様では、それはN末端メチオニン残基を含みうる。この残基は、任意で、発現された組換えタンパク質から引き続いて切り離すことで、最終産物を与えることができる。

【0185】

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせを使用することができる。真核宿主用の有用な発現ベクターとしては、例えばSV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルスからの発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主用の有用な発現ベクターとしては、公知の細菌プラスミド、例えばpCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体を含む大腸菌由来のプラスミド、およびそれより宿主域が広いプラスミド、例えばM13ファージおよび他の線維状一本鎖DNAファージが挙げられる。

10

【0186】

FZD結合作用物質またはWnt結合作用物質（または抗原として使用するためのタンパク質）を発現させるための適切な宿主細胞としては、適当なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母細胞、昆虫細胞、または高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば大腸菌またはバチルス（*Bacillus*）が挙げられる。高等真核細胞としては、後述する哺乳動物由来の樹立細胞株が挙げられる。無細胞翻訳系も使用しうる。細菌宿主、真菌宿主、酵母宿主、および哺乳動物細胞宿主と共に使用するための適当なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Pouwelsらが記載している（1985「Cloning Vectors: A Laboratory Manual」Elsevier、ニューヨーク州ニューヨーク）。抗体生産を含むタンパク質生産に関する追加情報は、例えば米国特許出願公開第2008/0187954号、米国特許第6,413,746号および同第6,660,501号、ならびに国際公開公報第2004/009823号に見いだすことができる。

20

【0187】

組換えポリペプチドの発現には、さまざまな哺乳類培養系が使用される。哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現は、そのようなタンパク質が一般に正しくフォールディングされ、適切に修飾され、生物学的に機能的であることから、好ましいであろう。適切な哺乳動物宿主細胞株の例として、COS-7（サル腎臓由来）細胞株、L-929（マウス線維芽細胞由来）細胞株、C127（マウス乳房腫瘍由来）細胞株、3T3（マウス線維芽細胞由来）細胞株、CHO（チャイニーズハムスター卵巣由来）細胞株、HeLa（ヒト子宮頸がん由来）細胞株、BHK（ハムスター腎臓線維芽細胞由来）細胞株、HEK-293（ヒト胎児腎臓由来）細胞株およびそれらの変異体が挙げられる。哺乳類発現ベクターは、非転写要素、例えば複製起点、発現させようとする遺伝子に連結された適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに5'または3'非翻訳配列、例えば必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位およびスプライス受容部位、ならびに転写終結配列を含むことができる。

30

【0188】

昆虫細胞培養系（例えばバキュロウイルス）における組換えタンパク質の発現も、正しくフォールディングされた生物学的に機能的なタンパク質を生産するためのロバストな方法になる。昆虫細胞において異種タンパク質を生産するためのバキュロウイルス系は、当業者に周知である（例えばLuckow and Summers, 1988, Bio/Technology, 6:47を参照されたい）。

40

【0189】

したがって本発明は、本明細書に記載するFZD結合作用物質またはWnt結合作用物質を含む細胞を提供する。いくつかの態様では、細胞が、本明細書に記載する結合作用物質（例えば抗体または可溶性受容体）を生産する。一定の態様では、細胞が抗体を生産する。一定の態様では、細胞が抗体OMP-18R5を生産する。いくつかの態様では、細胞が可溶性受容

50

体を生産する。いくつかの態様では、細胞がFZD-Fc可溶性受容体を生産する。いくつかの態様では、細胞がFZD8-Fc可溶性受容体を生産する。いくつかの態様では、細胞がFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28を生産する。

【0190】

形質転換宿主によって生産されるタンパク質は、任意の適切な方法に従って精製することができる。標準的方法としては、クロマトグラフィー（例えばイオン交換、アフィニティ、およびサイズ分画カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差 (differential solubility)、または他の標準的なタンパク質精製技法による方法が挙げられる。適当なアフィニティカラムを通過することによる安易な精製を可能にするために、ヘキサ-ヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのアフィニティタグをタンパク質に取り付けることができる。単離されたタンパク質は、タンパク質分解、質量分析 (MS)、核磁気共鳴 (NMR)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、およびx線結晶解析などの技法を使って、物理的に特徴づけることもできる。

10

【0191】

いくつかの態様では、培養培地中に組換えタンパク質を分泌する発現系からの上清を、まず、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットなどを使って濃縮することができる。濃縮工程に続いて、濃縮物を適切な精製マトリックスに適用することができる。いくつかの態様では、アニオン交換樹脂、例えばペンドントジエチルアミノエチル (DEAE) 基を有するマトリックスまたは基材を使用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製によく使用される他のタイプであることができる。いくつかの態様では、カチオン交換工程を使用することができる。適切なカチオン交換体として、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含むさまざまな不溶性マトリックスが挙げられる。いくつかの態様では、例えば限定するわけではないがセラミックヒドロキシアパタイト (CHT) などのヒドロキシアパタイト媒体を使用することができる。一定の態様では、ペンドントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルなどといった疎水性RP-HPLC媒体を使用する1つまたは複数の逆相HPLC工程を使って、結合作用物質をさらに精製することができる。均一な組換えタンパク質を得るために、前述の精製工程の一部または全部をさまざまな組合せで使用することもできる。

20

【0192】

いくつかの態様では、細菌培養において生産された組換えタンパク質を、例えば細胞ペレットからの初回抽出後に、1つまたは複数の濃縮工程、塩析工程、水性イオン交換クロマトグラフィー工程、またはサイズ排除クロマトグラフィー工程などを行うことによって単離することができる。最終精製工程にはHPLCを使用することができる。組換えタンパク質の発現に使用される微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用などといった任意の従来法で破碎することができる。

30

【0193】

抗体および他のタンパク質を精製するための当技術分野において公知の方法として、例えば米国特許公報第2008/0312425号、同第2008/0177048号、および同第2009/0187005号に記載されているものも挙げられる。

40

【0194】

一定の態様では、Wnt結合作用物質またはFZD結合作用物質が、抗体ではないポリペプチドである。タンパク質ターゲットに高いアフィニティで結合する非抗体ポリペプチドを同定し生産するためのさまざまな方法が当技術分野では公知である。例えばSkerra, 2007, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304; Hosse et al., 2006, Protein Science, 15:14-27; Gill et al., 2006, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658; Nygren, 2008, FEBS J., 275:2668-76; およびSkerra, 2008, FEBS J., 275:2677-83を参照されたい。一定の態様では、FZD結合ポリペプチドまたはWnt結合ポリペプチドを生産し、かつ/または同定するために、ファージディスプレイ技術を使用することができる。一定の態様では、ポリペプチ

50

ドが、プロテインA、プロテインG、リポカリン、フィプロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、およびチオレドキシンからなる群より選択されるタイプのタンパク質スキャフォールドを含む。

【0195】

一定の態様では、結合作用物質を、いくつかのコンジュゲート（すなわちイムノコンジュゲートまたはラジオコンジュゲート）形態または非コンジュゲート形態のいずれか一つで使用することができる。一定の態様では、補体依存性細胞傷害および抗体依存性細胞傷害を含む対象の自然防御機構を利用して悪性細胞またはがん細胞を排除するために、抗体を非コンジュゲート形態で使用することができる。

【0196】

いくつかの態様では、結合作用物質が、細胞傷害性作用物質にコンジュゲートされる。いくつかの態様では、細胞傷害性作用物質が化学療法剤、例えば限定するわけではないが、メトトレキサート、アドリアマイシン（adriamycin）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシンまたは他の挿入剤である。いくつかの態様では、細胞傷害性作用物質が、細菌、真菌、植物、または動物由来の酵素的に活性な毒素、またはそのフラグメント、例えば限定するわけではないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolaca americana）タンパク質（PAPI、PAP II、およびPAP-S）、ニガウリ（Momordica charantia）インヒビター、クルシン、クロチン、サボウソウ（Saponaria officinalis）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin））、およびトリコテセン類である。いくつかの態様では、細胞傷害性作用物質が、ラジオコンジュゲートまたはラジオコンジュゲート抗体を生産するための放射性同位体である。ラジオコンジュゲート抗体の生産にはさまざまな放射性核種、例えば限定するわけではないが、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹²³I、¹¹¹In、¹³¹In、¹⁰⁵Rh、¹⁵³Sm、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Reおよび²¹²Biなどを利用することができる。いくつかの態様では、抗体と、1つまたは複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコテン（trichothene）、およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体とのコンジュゲートを生産することができる。一定の態様では、抗体と細胞傷害性作用物質とのコンジュゲートが、さまざまな二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばジメチルアジポイミデートHCL）、活性エステル（例えばスペリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えばトルエン2,6-ジイソシアネート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を使って作られる。

【0197】

一定の態様では、Wnt経路インヒビター（例えば抗体または可溶性受容体）が、少なくとも1種のWntタンパク質（すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10種のWntタンパク質）のアンタゴニストである。一定の態様において、Wnt経路インヒビターは、それが結合するWntタンパク質の活性を阻害する。一定の態様において、Wnt経路インヒビターは、それが結合するヒトWntタンパク質の活性を、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%阻害する。

【0198】

一定の態様では、Wnt経路インヒビター（例えば抗体または可溶性受容体）が、適当な受容体への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、1種または複数種のヒトFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntタンパク質

10

20

30

40

50

の結合を阻害する。いくつかの態様では、少なくとも1種のWntタンパク質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、およびWnt16からなる群より選択される。いくつかの態様では、1種または複数種のヒトFZDタンパク質が、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群より選択される。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD1、FZD2、FZD4、FZD5、FZD7、および/またはFZD8への1種または複数種のWntタンパク質の結合を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD8への1種または複数種のWntタンパク質の結合を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターによるFZDタンパク質への特定Wntの結合の阻害が、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%である。一定の態様では、FZDタンパク質へのWntの結合を阻害する作用物質が、Wnt経路シグナリングも阻害する。一定の態様では、ヒトWnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。一定の態様では、ヒトWnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、ヒトWnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが、FZD8-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、ヒトWnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが、可溶性受容体OMP-54F28である。

10

【0199】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビター（例えば抗体または可溶性受容体）が、少なくとも1種のヒトWntタンパク質のアンタゴニストであり、Wnt活性を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターがWnt活性を少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、1、2、3、4、もしくは5種、またはそれ以上のWntタンパク質の活性を阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、およびWnt16からなる群より選択される少なくとも1種のヒトWntタンパク質の活性を阻害する。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される少なくとも1種のWntタンパク質に結合する。一定の態様では、少なくとも1種のWntタンパク質が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt8a、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される。一定の態様では、ヒトWnt活性を阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。一定の態様では、ヒトWnt活性を阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、ヒトWnt活性を阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、ヒトWnt活性を阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体OMP-54F28である。

20

【0200】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトFZDタンパク質のアンタゴニストであり、FZD活性を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD活性を少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、1、2、3、4、もしくは5種、またはそれ以上のFZDタンパク質の活性を阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群より選択される少なくとも1種のヒトFZDタンパク質の活性を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD1、FZD2、FZD4、FZD5、FZD7、および/またはFZD8の活性を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD8の活性を阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが抗FZD抗体である。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが抗FZD抗体OMP-18R5である。

30

【0201】

40

50

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトWntタンパク質のアンタゴニストであり、Wntシグナリングを阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターがWntシグナリングを少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、1、2、3、4、もしくは5種、またはそれ以上のWntタンパク質によるシグナリングを阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、およびWnt10bからなる群より選択される少なくとも1種のWntタンパク質のシグナリングを阻害する。一定の態様では、Wntシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。一定の態様では、Wntシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体である。一定の態様では、Wntシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、Wntシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、Wntシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体OMP-54F28である。

【0202】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、-カテニンシグナリングのアンタゴニストである。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが-カテニンシグナリングを少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%阻害する。一定の態様では、-カテニンシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。一定の態様では、-カテニンシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗FZD抗体である。一定の態様では、-カテニンシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である。一定の態様では、-カテニンシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体である。一定の態様では、-カテニンシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、-カテニンシグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。

【0203】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、受容体への少なくとも1種のWntタンパク質の結合を阻害する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトWntタンパク質の、1種または複数種のその受容体への結合を阻害する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のWntタンパク質の結合を阻害する。いくつかの態様では、Wnt結合作用物質が、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、および/またはFZD10への少なくとも1種のWntタンパク質の結合を阻害する。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のWntの結合の阻害が、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターがさらに、Wnt経路シグナリングおよび/または-カテニンシグナリングを阻害する。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターが抗FZD抗体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28である。

10

20

30

40

50

【0204】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、受容体への少なくとも1種のWntの結合を遮断する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のヒトWntタンパク質の、1種または複数種のその受容体への結合を遮断する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のWntの結合を遮断する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、および/またはFZD10への少なくとも1種のWntタンパク質の結合を遮断する。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のWntの結合の遮断が、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のWntタンパク質の結合を遮断するWnt経路インヒビターがさらに、Wnt経路シグナリングおよび/または-カテニンシグナリングを阻害する。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、抗体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、抗FZD抗体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、抗体OMP-18R5である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、可溶性受容体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、FZD-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、FZD8-Fc可溶性受容体である。一定の態様では、少なくとも1種のFZDタンパク質への少なくとも1種のヒトWntの結合を遮断するWnt経路インヒビターが、可溶性受容体OMP-54F28である。

10

20

30

40

【0205】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、Wnt経路シグナリングを阻害する。Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターは、一定の態様では、Wntシグナリング経路中の1種または複数種の受容体によるシグナリングを阻害しうるが、必ずしも全ての受容体によるシグナリングを阻害しうるわけではないと理解される。一定の代替態様では、全てのヒト受容体によるWnt経路シグナリングが阻害されうる。一定の態様では、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群より選択される1種または複数種の受容体によるWnt経路シグナリングが、阻害される。一定の態様では、Wnt経路インヒビターによるWnt経路シグナリングの阻害が、Wnt経路シグナリングのレベルの少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の低減である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗FZD抗体である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路シグナリングを阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体OMP-54F28である。

30

40

【0206】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、-カテニンの活性化を阻害する。-カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターは、一定の態様では、1種または複数種の受容体による-カテニンの活性化を阻害しうるが、必ずしも全ての受容体による-カテニンの活性化を阻害しうるわけではないと理解される。一定の代替態様では、全てのヒト受容体による-カテニンの活性化が阻害されうる。一定の態様では、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、およびFZD10からなる群よ

50

り選択される1種または複数種の受容体による β -カテニンの活性化が阻害される。一定の態様では、Wnt結合作用物質による β -カテニンの活性化の阻害が、 β -カテニンの活性化のレベルの少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の低減である。いくつかの態様では、 β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターが抗体である。いくつかの態様では、

β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターが抗FZD抗体である。いくつかの態様では、 β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である。いくつかの態様では、 β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体である。いくつかの態様では、 β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、 β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、 β -カテニンの活性化を阻害するWnt経路インヒビターが可溶性受容体OMP-54F28である。

【0207】

Wnt経路インヒビターが β -カテニンシグナリングを阻害するかどうかを決定するためのインビボアッセイおよびインビトロアッセイは、当技術分野において公知である。例えば、 β -カテニンシグナリングレベルをインビトロで測定するには、ホタルルシフェラーゼリポーター遺伝子の上流に複数コピーのTCF結合ドメインを含有するTCF/Lucリポーターベクターを利用する、細胞に基づくルシフェラーゼレポーターアッセイを使用することができる(Gazit et al., 1999, Oncogene, 18:5959-66;TOPflash, Millipore、マサチューセツ州ビルリカ)。1種または複数種のWntタンパク質(例えばトランスフェクト細胞が発現するWntまたはWnt条件培地によって提供されるWnt)の存在下、結合作用物質の存在下での、 β -カテニンシグナリングのレベルを、結合作用物質が存在しない状態でのシグナリングのレベルと比較する。TCF/Lucリポーターアッセイに加えて、 β -カテニンシグナリングに対する結合作用物質(または候補作用物質)の効果は、 β -カテニンの調節を受ける遺伝子、例えばc-myc(He et al., 1998, Science, 281:1509-12)、サイクリンD1(Tetsu et al., 1999, Nature, 398:422-6)、および/またはフィプロネクチン(Gradl et al., 1999, Mol. Cell Biol., 19:5576-87)の発現のレベルに対する作用物質の効果を測定することにより、インビトロまたはインビボで測定することができる。一定の態様において、 β -カテニンシグナリングに対する結合作用物質の効果は、ディシェベルド-1、ディシェベルド-2、ディシェベルド-3、LRP5、LRP6、および/または β -カテニンのリン酸化状態に対する作用物質の効果を測定することによって評価することもできる。

【0208】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、以下の効果のうちの1つまたは複数を有する:腫瘍細胞の増殖を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減する、腫瘍の腫瘍形成性を低減する、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減することによって腫瘍の腫瘍形成性を低減する、腫瘍細胞の細胞死の引き金を引く、腫瘍中の細胞の分化を誘発する、腫瘍形成性細胞を非腫瘍形成性状態へと分化させる、腫瘍細胞における分化マーカーの発現を誘導する、腫瘍細胞の転移を防止する、または腫瘍細胞の生存を減少させる。

【0209】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、腫瘍成長を阻害する能力を有する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、インビボでの腫瘍成長を(例えば異種移植片マウスマodelにおいて、かつ/またはがんを有するヒトにおいて)阻害する能力を有する。いくつかの態様では、腫瘍が、結腸直腸腫瘍、結腸腫瘍、肺腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、肝腫瘍、肝細胞腫瘍、甲状腺腫瘍、乳房腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、胃腸腫瘍、メラノーマ、子宮頸部腫瘍、神経内分泌腫瘍、膀胱腫瘍、膠芽腫、および頭頸部腫瘍からなる群より選択される腫瘍である。一定の態様では、腫瘍がメラノーマである。一定の態様では、腫瘍が結腸直腸腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が肺腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が乳房腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が肺腫瘍である。いくつかの態様では、腫瘍が卵巣腫瘍である。いくつかの態様では、腫瘍が肝腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が神経

10

20

30

40

50

内分泌腫瘍である。一定の態様では、腫瘍がWnt依存性腫瘍である。

【0210】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、腫瘍の腫瘍形成性を低減する能力を有する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、動物モデル、例えばマウス異種移植モデルにおいて、がん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低減する能力を有する。一定の態様では、腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度が、少なくとも約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、約50分の1、約100分の1、または約1000分の1に低減する。一定の態様では、がん幹細胞の数または頻度の低減が、動物モデルを使った限界希釈アッセイによって決定される。限界希釈アッセイを使って腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度の低減を決定する工程に関するさらなる例と指針は、例えば国際公開公報第2008/042236号ならびに米国特許公報第2008/0064049号および同第2008/0178305号に見いだすことができる。

10

【0211】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、少なくとも1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間は、インビボで活性である。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間は、インビボで活性なIgG（例えばIgG1またはIgG2）抗体である。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間は、インビボで活性な融合タンパク質である。

20

【0212】

一定の態様では、本明細書に記載するWnt経路インヒビターが、マウス、カニクイザル、またはヒトにおいて、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間の循環半減期を有する。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、マウス、カニクイザル、またはヒトにおいて、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間の循環半減期を有するIgG（例えばIgG1またはIgG2）抗体である。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、マウス、カニクイザル、またはヒトにおいて、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間の循環半減期を有する融合タンパク質である。ポリペプチドおよび抗体などの作用物質の半減期を増加（または減少）させる方法は、当技術分野において公知である。例えば、IgG抗体の循環半減期を増加させる公知の方法として、新生児型Fc受容体（FcRn）への抗体のpH依存的結合をpH6.0で増加させるFc領域への変異の導入が挙げられる（例えば米国特許公報第2005/0276799号、同第2007/0148164号、および同第2007/0122403号を参照されたい）。Fc領域を欠く抗体フラグメントの循環半減期を増加させる公知の方法として、PEG化などの技法が挙げられる。

30

【0213】

III. 使用方法および薬学的組成物

本発明は、副作用および/または毒性、例えば限定するわけではないがWnt経路インヒビターに関連する骨格関連の副作用および/または毒性などを、スクリーニングし、モニタリングし、低減し、防止し、減弱し、かつ/または緩和しながら、がんなどの疾患をWnt経路インヒビターで処置する方法を提供する。がん処置に関連する副作用および/または毒性としては、疲労、嘔吐、恶心、下痢、疼痛、脱毛、好中球減少症、貧血、血小板減少症、心血管関連合併症、骨格関連合併症、およびそれらの任意の組み合わせを挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。本明細書にいう「骨格関連合併症」（例えば骨格関連の副作用および/または毒性）としては、骨減少症、骨粗鬆症、骨折（無症状骨折を含む）、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されるわけではない

40

50

ない。したがって、本明細書に記載する方法のいくつかの局面および/または態様において、骨格関連の副作用および/または毒性をスクリーニングし、モニタリングし、低減し、防止し、減弱し、かつ/または緩和するとは、骨密度損失および/または骨折リスクをスクリーニングし、モニタリングし、低減し、防止し、減弱し、かつ/または緩和することである。骨密度損失は無症候性であることが多く、かつ/または骨格関連副作用の初期徴候は、例えば骨密度スキャニングでは明白でないことが多い。

【0214】

骨代謝は、骨形成と骨破壊の連続的二重プロセスである。骨破壊は骨吸収と呼ばれ、破骨細胞によって行われ、一方、骨形成は骨芽細胞によって行われる。成体では、骨形成と骨破壊の二重プロセスのバランスがとれていて、ホメオスタシス的に制御された一定の量の骨が維持されている。骨代謝は、骨形成時および骨吸収時に放出されるバイオマーカー（例えば酵素、タンパク質、および/または分解産物）の測定によって評価し、かつ/またはモニタリングすることができる。これらのバイオマーカーはしばしば「骨代謝回転マーカー」と呼ばれ、これには骨形成マーカーと骨吸収マーカーとが含まれる。骨形成バイオマーカーとしては、血清中総アルカリホスファターゼ、血清中骨特異的アルカリホスファターゼ、血清中オステオカルシン、血清中プロコラーゲン1型アミノ末端プロペプチド（P1NP）および血清中プロコラーゲン1型カルボキシ末端プロペプチド（P1CP）が挙げられる。骨吸収バイオマーカーとしては、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン（PYD）、尿中遊離デオキシピリジノリン（DPD）、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド（NTX）、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド（CTX）、骨シアロタンパク質（BSP）、および酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bが挙げられる。

10

20

20

【0215】

骨の有機マトリックスの約90%が1型コラーゲンであり、これは分子のN末端部分およびC末端部分で架橋された、らせん状タンパク質である。骨吸収時に、破骨細胞は、C-テロペプチド（CTX）を含む分子フラグメントへとコラーゲン原線維を分解する酸性および中性プロテアーゼの混合物を分泌する。骨が加齢するにつれて、CTX中に存在する形のアスパラギン酸は形（-CTX）に転化する。-CTXは骨吸収時に血流中に放出され、成熟1型コラーゲンの分解に関する特異的マーカーとして役立つ。

【0216】

骨代謝回転マーカーは、閉経後の女性および骨減少症と診断された個体における骨吸収抑制療法（例えばホルモン補充療法およびビスホスホネート療法）をモニタリングするために使用してきた。加えて、骨代謝回転マーカーは、ホルモン薬および非ホルモン薬による治療に起因する薬剤性骨粗鬆症を評価するためにも使用することができる。これらの薬物としては、グルココルチコイド、甲状腺ホルモン、アロマターゼインヒビター、卵巣抑制剤、アンドロゲン枯渇療法、チアゾリジンジオン類、選択的セロトニン再取り込みインヒビター、抗痙攣薬、ヘパリン、経口抗凝固剤、ループ利尿剤、カルシニューリンインヒビター、抗レトロウイルス療法、およびプロトンポンプインヒビターを挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。骨代謝回転マーカーが、以前に、Wnt経路インヒビターの効果を評価するために使用されたことはない。したがって、いくつかの態様において本発明は、Wnt経路インヒビターで処置される対象における骨格関連の副作用および/または毒性をモニタリングするために骨代謝回転マーカーを使用する方法を提供する。いくつかの態様において、本方法では、骨形成バイオマーカーを使って、骨形成のレベルの減少をモニタリングし、かつ/または検出する。いくつかの態様において、本方法では、骨吸収バイオマーカーを使って、骨吸収のレベルの増加をモニタリングし、かつ/または検出する。いくつかの態様では、骨形成バイオマーカーのレベルのモニタリングにより、骨形成のレベルの減少、ならびに/または骨折、骨減少症、および/もしくは骨粗鬆症のリスクの増加が早期に示される。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーのレベルのモニタリングにより、骨吸収のレベルの増加、ならびに/または骨折、骨減少症、および/もしくは骨粗鬆症のリスクの増加が早期に示される。いくつかの態様において、本方法は、骨密度スキャンによって評価される骨格機能障害のいかなる証拠にも先だって、

30

40

50

骨格関連の副作用および/または毒性を検出する。

【0217】

一定の態様では、検出され、同定され、モニタリングされ、低減され、防止され、減弱され、および/またはスクリーニングされる骨格関連の副作用および/または毒性が、Wnt経路インヒビターの投与またはWnt経路インヒビターによる処置によって引き起こされるか、前記投与または処置に関連するか、かつ/または前記投与もしくは処置に関係する骨格関連の副作用および/または毒性である。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、Wnt経路インヒビターに関係する。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、Wnt経路インヒビターの活性に関係する。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、抗FZD抗体であるWnt経路インヒビターに関係する。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、抗FZD抗体OMP-18R5であるWnt経路インヒビターに関係する。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、FZD可溶性受容体であるWnt経路インヒビターに関係する。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、FZD8-Fc可溶性受容体であるWnt経路インヒビターに関係する。一定の態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が、FZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28であるWnt経路インヒビターに関係する。

10

【0218】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置のために対象を選択する方法であって、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびバイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、Wnt経路インヒビターによる処置のためにその対象を選択する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置のために対象を選択する方法が、対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびバイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、Wnt経路インヒビターによる処置のためにその対象を選択する工程を含む。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、骨代謝回転マーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。

20

【0219】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置のために対象を選択する方法が、対象から生物学的試料を得る工程、試料中の骨代謝回転マーカーのレベルを決定する工程、および骨代謝回転マーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、Wnt経路インヒビターによる処置のためにその対象を選択する工程を含む。いくつかの態様では、生物学的試料が、尿、血液、血清、または血漿である。いくつかの態様では、骨代謝回転マーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン(PYD)、尿中遊離デオキシピリジノリン(DPD)、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド(NTX)、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド(CTX)、骨シアロタンパク質(BSP)、または酒石酸抵抗性酸性ホスファター-5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXまたは-CTXである。したがっていくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置のために対象を選択する方法が、対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、および-CTXのレベルが所定のレベルより低い場合に、Wnt経路インヒビターによる処置のためにその対象を選択する工程を含む。

30

【0220】

本発明は、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する方法であって、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびバイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、その対象はWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する方法が、対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびバイオマーカーのレベルが所定のレベルより低い場合に、その対象はWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する

40

50

工程を含む。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン(PYD)、尿中遊離デオキシピリジノリン(DPD)、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド(NTX)、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド(CTX)、骨シアロタンパク質(BSP)、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、対象をWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する方法が、対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、および-CTXのレベルが所定のレベルより低い場合に、その対象はWnt経路インヒビターによる処置に適格であると同定する工程を含む。

10

【0221】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象を骨格関連の副作用および/または毒性の発生に関してモニタリングする方法であって、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、バイオマーカーのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す、方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象を骨格関連の副作用および/または毒性の発生に関してモニタリングする方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、バイオマーカーのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性が、骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン(PYD)、尿中遊離デオキシピリジノリン(DPD)、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド(NTX)、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド(CTX)、骨シアロタンパク質(BSP)、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象を骨格関連の副作用および/または毒性の発生に関してモニタリングする方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、および試料中の-CTXのレベルを-CTXの所定のレベルと比較する工程を含み、-CTXのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す。

20

【0222】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を検出する方法であって、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、バイオマーカーのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す、方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を検出する方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、バイオマーカーのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである

30

40

50

。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン (PYD) 、尿中遊離デオキシピリジノリン (DPD) 、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド (NTX) 、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド (CTX) 、骨シアロタンパク質 (BSP) 、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を検出する方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の -CTXのレベルを決定する工程、および試料中の -CTXのレベルを -CTXの所定のレベルと比較する工程を含み、 -CTXのレベルの増加が骨格関連の副作用および/または毒性の発生を示す。

10

【0223】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を同定するための方法であって、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される、方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を同定するための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン (PYD) 、尿中遊離デオキシピリジノリン (DPD) 、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド (NTX) 、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド (CTX) 、骨シアロタンパク質 (BSP) 、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが -CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を同定するための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の -CTXのレベルを決定する工程、および試料中の -CTXのレベルを -CTXの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の -CTXのレベルが -CTXの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。

20

【0224】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性をモニタリングするための方法であって、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される、方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性をモニタリングするための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では

30

40

50

、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン(PYD)、尿中遊離デオキシピリジノリン(DPD)、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド(NTX)、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド(CTX)、骨シアロタンパク質(BSP)、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における心臓毒性をモニタリングするための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、および試料中の-CTXのレベルを-CTXの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の-CTXのレベルが-CTXの所定のレベルより高い場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。

10

20

30

40

50

【0225】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を低減する方法であって、対象からの試料におけるバイオマーカーのレベルを決定する工程、試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量のビスホスホネートなどの骨吸収抑制薬を投与する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を低減する方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量のビスホスホネートなどの骨吸収抑制薬を投与する工程を含む。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン(PYD)、尿中遊離デオキシピリジノリン(DPD)、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド(NTX)、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド(CTX)、骨シアロタンパク質(BSP)、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性を低減するための方法が、処置を受けている対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、および試料中の-CTXのレベルを-CTXの所定のレベルと比較する工程、および試料中の-CTXのレベルが-CTXの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程を含む。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。

【0226】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を防止または減弱する方法であって、対象からの試料におけるバイオマーカーのレベルを決定する工程、試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程、および対象にWnt経路インヒビターを投与する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を防止または減弱する方法が、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程、および対象にWnt経路インヒビタ

ーを投与する工程を含む。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン(PYD)、尿中遊離デオキシピリジノリン(DPD)、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド(NTX)、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド(CTX)、骨シアロタンパク質(BSP)、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置を受けている対象における骨格関連の副作用および/または毒性の発生を防止または減弱する方法が、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、試料中の-CTXのレベルを-CTXの所定のレベルと比較する工程、試料中の-CTXのレベルが-CTXの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程、および対象にWnt経路インヒビターを投与する工程を含む。

10

【0227】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において、約1500pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において、約1200pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において、約1000pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において、約800pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において、約600pg/ml以下である。いくつかの態様では、所定のレベルが、血液、血清、または血漿試料において、約400pg/ml以下である。-CTXの所定のレベルとの関連において、「約」という用語は、言及した量±言及したその量の10%を意味する。

20

【0228】

いくつかの態様では、バイオマーカー(例えば骨吸収バイオマーカーまたは-CTX)の所定のレベルが、以前の日に得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー(例えば骨吸収バイオマーカーまたは-CTX)の所定のレベルが、初期スクリーニング時に得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー(例えば骨吸収バイオマーカーまたは-CTX)の所定のレベルが、処置に先だって得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー(例えば骨吸収バイオマーカーまたは-CTX)の所定のレベルが、初期スクリーニング時に得られた試料中のバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、バイオマーカー(例えば骨吸収バイオマーカーまたは-CTX)の所定のレベルが正常基準レベルである。いくつかの態様では、バイオマーカー(例えば骨吸収バイオマーカーまたは-CTX)の所定のレベルがベースラインレベルである。いくつかの態様では、ベースラインレベルが、初期スクリーニング時に決定されたバイオマーカーの量である。いくつかの態様では、ベースラインレベルが、処置に先だって決定されたバイオマーカーの量である。

30

【0229】

いくつかの態様では、試料中の-CTXレベルが所定のレベルと比較して2倍以上増加している場合に(すなわち倍増またはそれ以上である場合に)、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。いくつかの態様では、試料中の-CTXレベルがベースラインレベルと比較して2倍以上増加している場合に(すなわち倍増またはそれ以上である場合に)、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。

40

【0230】

本明細書に記載する方法のいずれかにおいて、生物学的試料は、およそ1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、または6週間ごとに得られる。

【0231】

50

本明細書に記載する方法のいずれかのいくつかの態様では、DEXA（二重エネルギーX線吸収測定）骨密度スキャンを使って、対象が評価される。この技法は、骨塩密度（BMD）を測定するのに最もよく使用される試験である。DEXAのアウトプットには、被験者の骨密度を30～35歳の人と比較するTスコア、および被験者の骨密度を年齢および性別が同じ人の平均骨密度と比較するZスコアが含まれる。Tスコアは、ある個人が標準尺度に従って骨減少症または骨粗鬆症を有するかどうかを決定するために使用される。-1より大きいTスコアは正常骨密度とみなされ、-1と-2.5の間のTスコアは骨減少症とみなされ、-2.5未満のTスコアは骨粗鬆症とみなされ、-2.5未満のTスコアと1つ以上の骨粗鬆症性骨折は重症（確立した）骨粗鬆症とみなされる。いくつかの態様では、Tスコアが全大腿骨または椎骨L1～L4において-2.5未満に低下する場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、Tスコアが全大腿骨または椎骨L1～L4において-2.0未満に低下する場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、Tスコアが全大腿骨または椎骨L1～L4において-1.5未満に低下する場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。いくつかの態様では、Tスコアが全大腿骨または椎骨L1～L4において-1.0未満に低下する場合に、骨格関連の副作用および/または毒性が示される。

10

【0232】

本発明は、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬を投与する工程を含む、Wnt経路インヒビターを投与された対象における骨格関連の副作用および/または毒性を改善する方法も提供する。

20

【0233】

本発明は、Wnt経路インヒビターによる処置からの骨格関連の副作用および/または毒性のリスクに関して対象をスクリーニングする方法であって、対象からの試料におけるバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある、方法も提供する。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置からの骨格関連の副作用および/または毒性のリスクに関して対象をスクリーニングする方法が、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって対象から生物学的試料を得る工程、試料中のバイオマーカーのレベルを決定する工程、および試料中のバイオマーカーのレベルをバイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中のバイオマーカーのレベルがバイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性が骨折のリスクの増加である。いくつかの態様では、骨格関連の副作用および/または毒性が骨減少症または骨粗鬆症である。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨代謝回転マーカーである。いくつかの態様では、バイオマーカーが骨吸収バイオマーカーである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが、尿中ヒドロキシプロリン、尿中総ピリジノリン（PYD）、尿中遊離デオキシピリジノリン（DPD）、尿中コラーゲン1型架橋N-テロペプチド（NTX）、尿中または血清中コラーゲン1型架橋C-テロペプチド（CTX）、骨シアロタンパク質（BSP）、または酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ5bである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーがCTXである。いくつかの態様では、骨吸収バイオマーカーが-CTXである。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターによる処置からの骨格関連の副作用および/または毒性のリスクに関して対象をスクリーニングする方法が、Wnt経路インヒビターによる処置に先だって対象から生物学的試料を得る工程、試料中の-CTXのレベルを決定する工程、および試料中の-CTXのレベルを-CTXの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の-CTXのレベルが-CTXの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある。いくつかの態様では、-CTXの所定のレベルが、初期スクリーニング時に決定された値である。いくつかの態様では、-CTXの所定のレベルが、約400～1200pg/mlである。いくつかの態様では、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある場合に、対象に、Wnt経路インヒビターによる

30

40

50

処置に先だって、治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。

【0234】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、骨吸収抑制薬がビスホスホネートである。ビスホスホネートは、破骨細胞がアポトーシスを起こすように「誘導」し、よって骨の消化を阻害することにより、骨量の損失を防止すると考えられている。いくつかの態様では、ビスホスホネートが、エチドロネート、クロドロネート、チルドロネート、パミドロネート、ネリドロネート(neridronate)、オルパドロネート(olpadronate)、アレンドロネート(FOSAMAX)、イバンドロネート(BONIVA)、リセドロネート(ACTONEL)、およびゾレドロン酸(RECLAST)からなる群より選択される。いくつかの態様では、ビスホスホネートがゾレドロン酸である。いくつかの態様では、骨吸収抑制薬が抗RANKL抗体デノスマブ(PROLIA)である。

10

【0235】

本明細書に記載する方法のいずれかにおいて、Wnt経路インヒビターは抗FZD抗体である。本明細書に記載する方法のいずれかにおいて、Wnt経路インヒビターは抗Wnt抗体である。本明細書に記載する方法のいずれかにおいて、Wnt経路インヒビターはFZD可溶性受容体である。

【0236】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様において、Wnt経路インヒビターは、

(a)

GFTFSHYTLS (SEQ ID NO:1)

20

を含む重鎖CDR1、

VISGDGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

を含む重鎖CDR2、および

NFIKYVFAN (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR3、ならびに(b)

SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO:4)

を含む軽鎖CDR1、

DKSNRPSG (SEQ ID NO:5)

を含む軽鎖CDR2、および

QSYANTLSL (SEQ ID NO:6)

30

を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

【0237】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様において、Wnt経路インヒビターは、SEQ ID NO:7を含む重鎖可変領域とSEQ ID NO:8を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である。

【0238】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、OMP-18R5と同じ重鎖可変領域配列およびOMP-18R5と同じ軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが抗体OMP-18R5である。OMP-18R5は、ヒトFZD1、FZD2、FZD5、FZD7、およびFZD8受容体に結合するIgG2ヒトモノクローナル抗体であり、以前に米国特許第7,982,013号に記載されている。

40

【0239】

一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ATCCに寄託された受託番号PTA-9541のプラスミドによってコードされる抗体と同じ重鎖および軽鎖アミノ酸配列を含む。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ブダペスト条約の規定に基づいて2008年9月29日に、2011年バージニア州マナサス、ユニバーシティ・ブルーバード10801にあるAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託された、ATCC受託番号PTA-9541のプラスミドによってコードされている。一定の態様では、Wnt経路インヒビターが、ヒトFZDへの特異的結合に関して、ATCCに寄託された受託番号PTA-9541のプラスミドによってコードされている抗体と競合する。

【0240】

50

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Wnt経路インヒビターがFZD可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、またはSEQ ID NO:33を含むFZD8可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:20を含むFZD8可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:30を含むFZD8可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:33を含むFZD8可溶性受容体である。

【0241】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Wnt経路インヒビターがFZD-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、またはSEQ ID NO:41を含むFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:39を含むFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:40を含むFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、SEQ ID NO:41を含むFZD8-Fc可溶性受容体である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがOMP-54F28である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがOMP-54F28ではない。

【0242】

いくつかの態様では、対象ががんを有する。いくつかの態様では、がんが、肺がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、膵がん、胃腸がん、腎がん（renal cancer）、卵巣がん、肝がん、肝細胞癌（HCC）、子宮内膜がん、腎がん（kidney cancer）、前立腺がん、甲状腺がん、神経内分泌がん、神経芽細胞腫、神経膠腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、胃がん、膀胱がん、ヘパトーマ、および頭頸部がんからなる群より選択される。本明細書にいう「肺がん」は、非小細胞肺がん（NSCLC）および小細胞肺がん（SCLC）を含む全ての肺がんを指す。一定の態様では、がんが、リンパ腫や白血病などの血液がんである。いくつかの態様では、がんが乳がんである。一定の態様では、がんがNSCLCである。一定の態様では、がんが卵巣がんである。一定の態様では、がんが膵がんである。いくつかの態様では、がんが肝がんである。一定の態様では、がんが神経内分泌がんではない。

【0243】

したがって本発明は、がんを処置する方法も提供する。いくつかの態様において、本方法は、がんの処置を必要とする対象においてがんを処置する方法であって、（a）対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、および（b）対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程を含む。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、（a）対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、（b）対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および（c）試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含む。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、（a）対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、（b）対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および（c）試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、（a）対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、（b）対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および（c）試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。

【0244】

本発明は、腫瘍成長を阻害する方法も提供する。いくつかの態様において、本方法は、腫瘍成長を阻害する必要がある対象において腫瘍成長を阻害する方法であって、（a）対

10

20

30

40

50

象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、および(b)対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程を含む方法を含む。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、(a)対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、(b)対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および(c)試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含む。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、(a)対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、(b)対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に骨格関連の副作用および/または毒性のリスクがある。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、(a)対象に治療有効量のWnt経路インヒビターを投与する工程、(b)対象からの試料における骨吸収バイオマーカーのレベルを決定する工程、および(c)試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルを骨吸収バイオマーカーの所定のレベルと比較する工程を含み、試料中の骨吸収バイオマーカーのレベルが骨吸収バイオマーカーの所定のレベルより高い場合に、対象に治療有効量の骨吸収抑制薬が投与される。

【0245】

いくつかの態様では、生物学的試料が体液である。いくつかの態様では、生物学的試料が血液、血漿、血清、または尿である。いくつかの態様では、生物学的試料が静脈全血検体である。いくつかの態様では、生物学的試料が、EDTAまたはヘパリンを抗凝固剤として使用する静脈全血検体である。いくつかの態様では、生物学的試料が血漿検体である。いくつかの態様では、生物学的試料がEDTAまたはヘパリンを抗凝固剤として使用する血漿検体である。体液の試料は、当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。いくつかの態様では、生物学的試料が凍結組織試料または新鮮組織試料である。

【0246】

試料中の骨吸収バイオマーカー(例えば-CTX)のレベルを測定または決定するためのアッセイは、当業者には公知である。例えばいくつかの態様では、全血検体または血漿検体中の-CTXを定量的に測定するイムノアッセイが使用される。いくつかの態様では、試料がEDTAを抗凝固剤として含有する。いくつかの態様では、試料がヘパリンを抗凝固剤として含有する。いくつかの態様において、イムノアッセイは、アスパラギン酸残基が異性化している-CTXのEKAHD-GGRのアミノ酸配列に対する2種の高度に特異的なモノクローナル抗体を含む。イムノアッセイにおいて特異的シグナルを得るには、2本のEKAHD-GGR鎖が架橋されていなければならない。いくつかの態様では、試料と適当な対照とをストレプトアビジン被覆マイクロタイターウェルに入れ、次に、-CTXのEKAHD-GGRのアミノ酸配列に対するビオチン化モノクローナル抗体を含有する溶液を入れる。インキュベーションと洗浄の後、発色性基質溶液をマイクロタイターウェルに加える。インキュベーション後に、反応を停止させる。マイクロタイターウェルの吸光度を読み取り、-CTX濃度を決定する。

【0247】

いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、約0.5mg/kgの初回用量として投与される。例えば抗体OMP-18R5を5%デキストロース水溶液(USP)で総体積250mLに希釀する。0.22ミクロンフィルターを通してOMP-18R5を静脈内注入として30分かけて送達する。いくつかの態様では、以後の用量を同じような方法で投与する。

【0248】

本発明の別の局面では、本明細書に記載する方法がさらに、1種または複数種の追加の治療剤を投与する工程を含みうる。追加の治療剤は、Wnt経路インヒビターの投与に先だって、Wnt経路インヒビターの投与と同時に、かつ/またはWnt経路インヒビターの投与に続けて、投与することができる。Wnt経路インヒビターと追加の治療剤とを含む薬学的組成物も提供される。いくつかの態様では、1種または複数種の追加の治療剤が、1、2、3種、またはそれ以上の追加の治療剤を含む。

10

20

30

40

50

【0249】

少なくとも2つの治療剤による併用療法では、異なる作用機序によって働く作用物質を使用することが（それが必要なわけではないものの）多い。異なる作用機序を持つ作用物質を使った併用療法は、相加効果または相乗効果をもたらしうる。併用療法では、各作用物質の用量を、単剤療法で使用される用量より低くすることが可能になり、それによって副作用および/または毒性が低減する場合がある。併用療法では治療剤の一方または両方の治療係数が増加しうる。併用療法では耐性がん細胞が発生する可能性が減少しうる。いくつかの態様において、併用療法は、主として非腫瘍形成性細胞に影響を及ぼす（例えば阻害するまたは殺す）治療剤と、主として腫瘍形成性CSCに影響を及ぼす（例えば阻害するまたは殺す）治療剤とを含む。したがっていくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、少なくとも1種の追加の治療剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、抗FZD抗体が少なくとも1種の追加の治療剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、抗FZD抗体OMP-18R5が少なくとも1種の追加の治療剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、FZD可溶性受容体が少なくとも1種の追加の治療剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、FZD8-Fc可溶性受容体が、少なくとも1種の追加の治療剤と組み合わせて投与される。

10

【0250】

Wnt経路インヒビターと組み合わせて投与しうる治療剤として化学療法剤が挙げられる。したがっていくつかの態様において、本方法または本処置は、化学療法剤または複数の異なる化学療法剤のカクテルと組み合わされた本発明のWnt経路インヒビターの投与を伴う。Wnt経路インヒビター（例えば抗体または可溶性受容体）による処置は、化学療法の施行に先だって、化学療法の施行と同時に、または化学療法の施行後に行うことができる。併用投与には、单一の医薬製剤での共投与、もしくは別個の製剤を使った共投与、またはいずれかの順序での、ただし一般的には全ての活性作用物質がそれぞれの生物学的活性を同時に発揮することができる期間内での、逐次的投与を含めることができる。そのような化学療法剤に関する調製および投与スケジュールは、製造者の説明書に従って、または熟練した医師の経験に基づいて使用することができる。そのような化学療法剤に関する調製および投与スケジュールは、「The Chemistry Source Book」4th Edition, 2008, M.C. Perry編、Lippincott, Williams & Wilkins（ペンシルベニア州フィラデルフィア）にも記載されている。

20

【0251】

本発明において有用な化学療法剤としては、アルキル化剤、例えばチオテバおよびシクロホスファミド（CYTOXAN）；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン；アジリジン類、例えばベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）；エチレンイミン類およびメチラメラミン類（methylamalamines）、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ラミド、およびトリメチロロメラミン（trimethylololomelamine）；ナイトロジエンマスターード類、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロルエタミン、メクロメタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターード；ニトロソウレア類、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、ラニムスチン；抗生物質、例えばアクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン（carabacin）、カミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン、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、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、ミコフェノール酸、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（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリ

30

40

50

ン、ストレブトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗物質、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキセート；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトブリン、チアミブリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、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、シトシンアラビノシド、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU；アンドロゲン、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、メビチオスタン、テストラクトン；抗副腎薬(antiadrenal)、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えばフォリン酸；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；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキサート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルチチン；ジアジコン；エルフォルミチニン(elformithine)；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK；ラゾキサン；シゾフラン(sizofuran)；スピロゲルマニウム；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；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボブロマン；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(Ara-C)；タキソイド類、例えばパクリタキセル(TAXOL)およびドセタキセル(TAXOTERE)；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトブリン；白金類似体、例えばシスプラチニンおよびカルボプラチニン；ビンプラスチニン；白金；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ビンクリスチニン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロネート；CPT11；トポイソメラーゼインヒビター-RFS2000；ジフルオロメチルオルニチニン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラミシン類；カペシタビン(XELODA)；および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。化学療法剤として、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗エストロゲンなどの抗ホルモン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール類、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、オナブリストン、およびトレミフェン(FARESTON)；ならびに抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびに上記の薬学的に許容される塩、酸または誘導体も挙げられる。一定の態様では、追加の治療剤がシスプラチニンである。一定の態様では、追加の治療剤がカルボプラチニンである。一定の態様では、追加の治療剤がパクリタキセルである。Wnt経路インヒビターと組み合わせて投与される化学療法剤がカルボプラチニンである一定の態様では、処置されるがんまたは腫瘍が肺がんまたは肺腫瘍である。

【0252】

一定の態様では、化学療法剤がトポイソメラーゼインヒビターである。トポイソメラーゼインヒビターは、トポイソメラーゼ酵素(例えばトポイソメラーゼIまたはII)の作用を妨害する化学療法剤である。トポイソメラーゼインヒビターとしては、ドキソルビシンHCl、クエン酸ダウノルビシン、ミトキサントロンHCl、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCl、テニポシド(VM-26)、およびイリノテカン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一定の態様では、追加の治療剤がイリノテカンである。

【0253】

一定の態様では、化学療法剤が代謝拮抗物質である。代謝拮抗物質は、正常な生化学反応に必要な代謝産物と似ているが、細胞分裂などの1つまたは複数の正常細胞機能を妨害しうるほどには異なる構造を持つ化学物質である。代謝拮抗物質としては、ゲムシタビン、フルオロウラシル、カペシタビン、メトトレキサートナトリウム、ラリトレキセド(raltrexed)、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン、5-アザ

10

20

30

40

50

シチジン、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、およびクラドリビン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一定の態様では、追加の治療剤がゲムシタビンである。いくつかの態様では、追加の治療剤がペメトレキセドである。Wnt経路インヒビターと組み合わせて投与される化学療法剤がゲムシタビンである一定の態様では、処置されるがんまたは腫瘍が肺がんまたは肺腫瘍である。Wnt経路インヒビターと組み合わせて投与される化学療法剤がペメトレキセドである一定の態様では、処置されるがんまたは腫瘍が肺がんまたは肺腫瘍である。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターがペメトレキセドおよびカルボプラチントと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、肺がんを処置するために、抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体がゲムシタビンと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、肺がんを処置するために、抗FZD抗体OMP-18R5またはFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28が、ゲムシタビンと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、肺がんを処置するために、抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体がゲムシタビンおよびアルブミン結合型パクリタキセルと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、肺がんを処置するために、抗FZD抗体OMP-18R5またはFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28が、ゲムシタビンおよびアルブミン結合型パクリタキセルと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、卵巣がんを処置するために、抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体が、カルボプラチントおよびパクリタキセルまたはアルブミン結合型パクリタキセルと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、卵巣がんを処置するために、抗FZD抗体OMP-18R5またはFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28が、カルボプラチントおよびパクリタキセルまたはアルブミン結合型パクリタキセルと組み合わせて投与される。
10

【0254】

一定の態様では、化学療法剤が、例えば限定するわけではないがチューブリンに結合する作用物質などの、有糸分裂阻害剤である。いくつかの態様では、作用物質がタキサンである。一定の態様では、作用物質がパクリタキセルもしくはドセタキセル、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体である。一定の態様では、作用物質が、パクリタキセル(TAXOL)、ドセタキセル(TAXOTERE)、アルブミン結合型パクリタキセル(ABRAXANE)、DHA-パクリタキセル、またはPG-パクリタキセルである。一定の代替態様では、有糸分裂阻害剤が、ビンクリスチン、ビンプラスチン(binblastine)、ビノレルビン、またはビンデシンなどのビンカアルカロイド、またはそれらの薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体を含む。いくつかの態様では、有糸分裂阻害剤が、キネシンEg5のインヒビターであるか、またはAurora AやPIk1などの分裂期キナーゼのインヒビターである。Wnt経路インヒビターと組み合わせて投与される化学療法剤が有糸分裂阻害剤である一定の態様では、処置されるがんまたは腫瘍が乳がんまたは乳房腫瘍である。いくつかの態様では、乳がんを処置するために、抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体が、パクリタキセルまたはアルブミン結合型パクリタキセルと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、乳がんを処置するために、抗FZD抗体OMP-18R5またはFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28が、パクリタキセルまたはアルブミン結合型パクリタキセルと組み合わせて投与される。Wnt経路インヒビターと組み合わせて投与される化学療法剤が有糸分裂阻害剤である一定の態様では、処置されるがんまたは腫瘍が肺がんである。いくつかの態様では、肺がんを処置するために、抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体が、ドセタキセルと組み合わせて投与される。いくつかの態様では、肺がんを処置するために、抗FZD抗体OMP-18R5またはFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28が、ドセタキセルと組み合わせて投与される。
20

【0255】

いくつかの態様では、追加の治療剤が、小分子などの作用物質を含む。例えば、処置は、本発明のWnt経路インヒビター(例えば抗体)と、さらなる腫瘍関連タンパク質(例えば限定するわけではないが、EGFR、ErbB2、HER2、および/またはVEGF)に対してインヒビターとして作用する小分子との併用投与を伴う。一定の態様では、追加の治療剤が、プロテインキナーゼを阻害する小分子である。一定の態様では、追加の治療剤がチロシン
30

プロテインキナーゼを阻害する小分子である。いくつかの態様では、肝がん（例えばHCC）を処置するために、抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体が、プロテインキナーゼインヒビター（例えばソラフェニブ）と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、肝がん（例えばHCC）を処置するために、抗FZD抗体OMP-18R5またはFZD8-Fc可溶性受容体OMP-54F28が、プロテインキナーゼインヒビター（例えばソラフェニブ）と組み合わせて投与される。一定の態様では、追加の治療剤が、がん幹細胞経路を阻害する小分子である。いくつかの態様では、追加の治療剤がNotch経路の小分子インヒビターである。いくつかの態様では、追加の治療剤がWnt経路の小分子インヒビターである。いくつかの態様では、追加の治療剤がBMP経路の小分子インヒビターである。いくつかの態様では、追加の治療剤が、-カテニンシグナリングを阻害する小分子である。

10

【0256】

いくつかの態様では、追加の治療剤が、抗体などの生体分子を含む。例えば処置は、本発明のWnt経路インヒビター（例えば抗体）と、さらなる腫瘍関連タンパク質に対する他の抗体、例えば限定するわけではないが、EGFR、ErbB2、HER2、および/またはVEGFに結合する抗体との併用投与を伴う。一定の態様では、追加の治療剤が、抗がん幹細胞マーカー抗体である。いくつかの態様では、追加の治療剤が、Notch経路の構成要素に結合する抗体である。いくつかの態様では、追加の治療剤が、Wnt経路の構成要素に結合する抗体である。一定の態様では、追加の治療剤が、がん幹細胞経路を阻害する抗体である。いくつかの態様では、追加の治療剤がNotch経路の抗体インヒビターである。いくつかの態様では、追加の治療剤が、Wnt経路の抗体インヒビターである。いくつかの態様では、追加の治療剤が、BMP経路の抗体インヒビターである。いくつかの態様では、追加の治療剤が、-カテニンシグナリングを阻害する抗体である。一定の態様では、追加の治療剤が、血管新生インヒビターまたは血管新生モジュレーターである抗体（例えば抗VEGF抗体または抗VEGF受容体抗体）である。一定の態様では、追加の治療剤が、ベバシズマブ（AVASTIN）、トラスツズマブ（HERCEPTIN）、パニツムマブ（VECTIBIX）、またはセツキシマブ（ERBITUX）である。併用投与には、単一の医薬製剤での共投与、もしくは別個の製剤を使った共投与、またはいずれかの順序での、ただし一般的には全ての活性作用物質がそれぞれの生物学的活性を同時に発揮することができる期間内での、逐次的投与を含めることができる。

20

【0257】

30

さらにまた、本明細書に記載するWnt経路インヒビターによる処置には、1種または複数種のサイトカイン（例えばリンホカイン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、および/または成長因子）などの他の生体分子との併用処置を含めるか、または腫瘍、がん細胞の外科的除去、もしくは処置医が必要とみなす他の任意の治療を伴うことができる。

【0258】

40

Wnt経路インヒビターと追加の治療剤との組み合わせはどの順序で投与してもよく、並行して投与してもよいことは、理解されるであろう。いくつかの態様では、Wnt経路インヒビターが、第2治療剤による処置を以前に受けている対象に投与される。一定の別の態様では、Wnt経路インヒビターと第2治療剤とが、実質的に同時に、または並行して投与される。例えば対象は、第2治療剤（例えば化学療法）による処置クールを受けつつ、Wnt経路インヒビター（例えば抗体）を投与されうる。一定の態様では、第2治療剤による処置から1年以内に、Wnt経路インヒビターが投与される。一定の代替態様では、第2治療剤による任意の処置から10、8、6、4、または2ヶ月以内に、Wnt経路インヒビターが投与される。一定の別の態様では、第2治療剤による任意の処置から4、3、2、または1週間以内に、Wnt経路インヒビターが投与される。いくつかの態様では、第2治療剤による任意の処置から5、4、3、2、または1日以内に、Wnt経路インヒビターが投与される。さらに、2種（またはそれ以上）の作用物質または処置が、ほんの数時間または数分以内に（すなわち実質的に同時に）対象に投与されることは、理解されるであろう。

【0259】

50

当業者には公知であるとおり、どの治療剤の投与も、副作用および/または毒性につな

がりうる。場合によっては、副作用および/または毒性があまりに重篤であるために、その作用物質を治療有効用量で投与することができないこともある。場合によっては、薬物療法を中断しなければならず、他の作用物質が試されるかもしれない。しかし、同じ治療クラスの多くの作用物質は類似する副作用および/または毒性を示すことが多く、対象は治療を停止するか、もし可能であれば、その治療剤に伴う不快な副作用を辛抱する必要があることになる。

【0260】

治療剤による副作用としては、じんま疹、皮疹、そう痒、恶心、嘔吐、食欲減退、下痢、悪寒、発熱、疲労、筋肉痛および疼痛、頭痛、低血圧、高血圧、低カリウム血症、低血球数、出血、および心臓の異常を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0261】

したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載する方法には、Wnt経路インヒビターの投与に関する副作用および/または毒性を低減しうる間欠的投薬レジメンの使用が含まれる。本明細書にいう「間欠的投薬」とは、例えば2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、4週間ごとに1回など、1週間に1回を上回る投薬間隔を使った投薬レジメンを指す。いくつかの態様では、対象を処置するための方法が、間欠的投薬レジメンに従って有効用量のWnt経路インヒビター（例えば抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体）を対象に投与する工程を含む。いくつかの態様において本方法は、間欠的投薬レジメンに従って有効用量のWnt経路インヒビター（例えば抗FZD抗体またはFZD可溶性受容体）を対象に投与して、Wnt経路インヒビターの治療係数を増加させる。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および後続用量のWnt経路インヒビターを約2週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および後続用量のWnt経路インヒビターを約3週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および後続用量のWnt経路インヒビターを約4週間ごとに1回投与する工程を含む。

20

【0262】

いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンにおける後続用量が、初回用量とほぼ同じ量であるか、または初回用量より少ない。別の態様では、後続用量が初回用量より多量である。当業者には公知であるとおり、使用される用量は、達成使用とする臨床的目標に依存して変動するであろう。いくつかの態様では、初回用量が約0.25mg/kg～約20mg/kgである。いくつかの態様では、初回用量が、約0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約0.5mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約1mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約2.5mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約5mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約7.5mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約10mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約12.5mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約15mg/kgである。一定の態様では、初回用量が約20mg/kgである。いくつかの態様では、後続用量が約0.25mg/kg～約20mg/kgである。一定の態様では、後続用量が、約0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mg/kgである。一定の態様では、後続用量が約0.5mg/kgである。一定の態様では、後続用量が約1mg/kgである。一定の態様では、後続用量が約2.5mg/kgである。一定の態様では、後続用量が約5mg/kgである。いくつかの態様では、後続用量が約7.5mg/kgである。いくつかの態様では、後続用量が約10mg/kgである。いくつかの態様では、後続用量が約12.5mg/kgである。いくつかの態様では、後続用量が約15mg/kgである。いくつかの態様では、後続用量が約20mg/kgである。

30

【0263】

いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a) 約2.5mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b) 約2.5mg/kgの後続用量を2週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a) 約5mg/kgの初

40

50

回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約5mg/kgの後続用量を2週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約2.5mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約2.5mg/kgの後続用量を3週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約5mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約5mg/kgの後続用量を3週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約10mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約10mg/kgの後続用量を3週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約15mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約15mg/kgの後続用量を3週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約20mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約20mg/kgの後続用量を3週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約2.5mg/kgの後続用量を4週間ごとに1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬レジメンが、(a)約5mg/kgの初回用量のWnt経路インヒビターを対象に投与する工程、および(b)約5mg/kgの後続用量を4週間ごとに1回投与する工程を含む。一定の態様では、初回用量および維持用量が異なり、例えば初回用量が約5mg/kg、後続用量が約2.5mg/kgである。一定の態様では、間欠的投薬レジメンが初回負荷量を含んでもよく、例えば初回用量が約20mg/kgであり、後続用量が、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、または4週間ごとに1回投与される約2.5mg/kgまたは約5mg/kgである。

10

20

30

40

50

【0264】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、がんを処置する方法が、がんの処置を必要とする対象に、(a)約1~2週間ごとに少なくとも約0.5mg/kgまたは(b)約3週間ごとに少なくとも約1.0mg/kgの投薬量で、治療有効量のOMP-18R5を投与する工程を含む。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、がんの処置を必要とする対象に、約1~2週間ごとに約0.5mg/kg~約1.0mg/kgの投薬量で、治療有効量のOMP-18R5を投与する工程を含む。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、がんの処置を必要とする対象に、約3週間ごとに約1.0mg/kg~約10.0mg/kgの投薬量で、治療有効量のOMP-18R5を投与する工程を含む。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、がんの処置を必要とする対象に、約3週間ごとに約10mg/kg~約20.0mg/kgの投薬量で、治療有効量のOMP-18R5を投与する工程を含む。

【0265】

一定の態様では、ヒト患者においてがんを処置するための方法が、3週間ごとに1回、ある用量のWnt経路インヒビターを、患者に投与する工程、およびこの投与を全部で3、4、5、6、7、8サイクルまたはそれ以上繰り返す工程を含む。一定の態様では、ヒト患者においてがんを処置するための方法が、3週間ごとに1回、約10mg/kgの用量のWnt経路インヒビターを、患者に投与する工程、およびこの投与を全部で3、4、5、6、7、8サイクルまたはそれ以上繰り返す工程を含む。一定の態様では、ヒト患者においてがんを処置するための方法が、3週間ごとに1回、約15mg/kgの用量のWnt経路インヒビターを、患者に投与する工程、およびこの投与を全部で3、4、5、6、7、8サイクルまたはそれ以上繰り返す工程を含む。一定の態様では、ヒト患者においてがんを処置するための方法が、3週間ごとに1回、約20mg/kgの用量のWnt経路インヒビターを、患者に投与する工程、およびこの投与を全部で3、4、5、6、7、8サイクルまたはそれ以上繰り返す工程を含む。いくつかの態様では、投与が4サイクル繰り返される。いくつかの態様では、投与が5サイクル繰り返される。いくつかの態様では、投与が6サイクル繰り返される。いくつかの態様では、投与が7サイクル繰り返される。いくつかの態様では、投与が8サイクル繰り返される。

【0266】

本発明の別の局面は、ヒト対象におけるWnt経路インヒビターの毒性を低減するための方法であって、間欠的投薬レジメンを使って対象にWnt経路インヒビターを投与する工程

を含む方法に向けられる。本発明の別の局面は、ヒト対象におけるWnt経路インヒビターの副作用を低減するための方法であって、間欠的投薬レジメンを使って対象にWnt経路インヒビターを投与する工程を含む方法に向けられる。本発明の別の局面は、ヒト対象におけるWnt経路インヒビターの治療係数を増加させるための方法であって、間欠的投薬レジメンを使って対象にWnt経路インヒビターを投与する工程を含む方法に向けられる。

【0267】

初回用量および後続用量についての送達方法の選択は、体内へのWnt経路インヒビターの導入に耐える対象の能力に応じて行われる。したがって、本明細書に記載する局面および/または態様のいずれかにおいて、Wnt経路インヒビターの投与は静脈内注射または静脈内投与によって行われうる。いくつかの態様では、投与は静脈内注入によって行われうる。本明細書に記載する局面および/または態様のいずれかにおいて、Wnt経路インヒビターの投与は非静脈内経路によって行われうる。

10

【0268】

一定の態様では、処置が、放射線療法と組み合わされた本発明のWnt経路インヒビター（例えば抗体）の投与を伴う。Wnt経路インヒビターによる処置は、放射線療法の施行に先だって、または放射線療法の施行と並行して、または放射線療法の施行の後に行うことができる。熟練した医療実務者であれば、前述の放射線療法の施行スケジュールを決定することができる。

20

【0269】

本開示の態様は、Wnt経路インヒビターを使ったがんの処置を説明する以下の非限定的実施例を参照することにより、さらに詳しく明示することができる。本開示の範囲から逸脱することなく、材料にも方法にも多くの変更を加えうることは、当業者には明白であるだろう。

【実施例】

【0270】

実施例1

乳房異種移植モデルにおける抗FZD抗体OMP-18R5による間欠的投薬および腫瘍成長に対する効果

UM-PE13乳房腫瘍細胞（20,000細胞）を6～8週齢のNOD/SCIDマウスに皮下注射した。動物をランダムにグループ分けし（各群n=10）、パクリタキセル（Taxol）と組み合わせた抗FZD抗体OMP-18R5およびパクリタキセルのみで処置した。パクリタキセルは10mg/kgの用量で毎週投与し、OMP-18R5は、5、10、25、または45mg/kgの用量で3週間ごとに1回投与した。この作用物質は腹腔内投与した。表示した日に電子カリパスで腫瘍体積を測定した。

30

【0271】

図1に示すように、パクリタキセルと組み合わせて3週間ごとに投与されたOMP-18R5は、5mg/kgまたは10mg/kgという低い用量で、PE-13腫瘍成長を低減するのに有効であった。この腫瘍成長阻害は、パクリタキセルのみを毎週投与した場合に見られる成長阻害より大きかった。パクリタキセルと組み合わされた、さらに高用量のOMP-18R5、25mg/kgおよび45mg/kgは、さらに高度に腫瘍成長を阻害し、後の時点では腫瘍退縮が観察された。これらの結果は、パクリタキセルなどの化学療法剤と組み合わされた抗FZD抗体処置の有効性が、間欠的投薬レジメンでも維持されていることを実証している。

40

【0272】

実施例2

骨形成に対する抗FZD抗体OMP-18R5の間欠的投薬の効果

UM-PE13乳房腫瘍細胞（20,000細胞）を6～8週齢のNOD/SCIDマウスに皮下注射した。動物をランダムにグループ分けし（各群n=10）、パクリタキセル（Taxol）と組み合わせた抗FZD抗体OMP-18R5およびパクリタキセルのみで処置した。パクリタキセルは15mg/kgの用量で1週間に1回投与し、OMP-18R5は、25mg/kgの用量で、4週間ごとに1回、2週間ごとに1回、または1週間に1回、投与した。この作用物質は腹腔内投与した。表示した日に電子カリパスで腫瘍体積を測定した。

50

【0273】

図2に示すように、パクリタキセルと組み合わせて25mg/kgの用量で投与されたOMP-18R5は、1週間に1回、2週間に1回、および4週間に1回の投薬で、PE-13腫瘍成長を低減するのに有効であった。パクリタキセルと組み合わされたOMP-18R5による腫瘍成長阻害は、パクリタキセルのみで見られる成長阻害より大きかった。

【0274】

77日目の投薬の終了時に、OMP-18R5処置マウスにおける海綿骨形成を、対照（パクリタキセルのみ）で処置したマウスとの比較で評価した。

【0275】

対照で処置したマウスとOMP-18R5で処置したマウスの脛骨から組織切片を調製し、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色した。白い矢印で強調した薄紅色に染色される領域は、海綿骨に対応する。

10

【0276】

図3に見られるように、2週間に1回、25mg/kgでのOMP-18R5の処置では、毎週1回、25mg/kgの処置と比較して、骨量減少の低減があった。重要なことに、4週間に1回の25mg/kgでのOMP-18R5の処置は、骨形成に認知できるほどの効果は無いようだった。

【0277】

実施例3

骨形成に対するOMP-18R5の効果を低減するゾレドロン酸の効果

NOD/SCIDマウスをランダムにグループ分けし（各群n=5）、抗FZD抗体OMP-18R5またはゾレドロン酸と組み合わされたOMP-18R5で処置した。マウスは、1日目および15日目に20mg/kgのOMP-18R5だけで処置するか、または1日目の100ug/kgのゾレドロン酸の単回IV投薬と組み合わせて1日目および15日目の20mg/kgのOMP-18R5で処置した。29日目の投薬終了時に、OMP-18R5のみで処置したマウスからの大脛骨および脛骨を、OMP-18R5とゾレドロン酸との組み合わせで処置したマウスおよび対照抗体で処置したマウスからの大脛骨および脛骨と比較した。

20

【0278】

大脛骨および脛骨の組織切片は実施例2で述べたように調製した。

【0279】

図4に示すように、OMP-18R5で処置されたマウスへのゾレドロン酸の単回IV投与は、対照抗体で処置したマウスと同等な軟骨下骨形成をもたらした。さらなる研究により、ゾレドロン酸の共投与はOMP-18R5の抗腫瘍有効性には影響を及ぼさないことが実証された。これらのデータは、ビスホスホネート投与はWnt阻害の異化効果に対して防御的に作用し、よって骨の完全性を保存するための道筋を与え、Wnt経路を標的とすることの利益を可能にしうるという仮説を支持している。

30

【0280】

実施例4

固形腫瘍を有する患者におけるOMP-18R5の第Ia相試験

この試験は、もはや標準的根治療法がなく延命効果が実証された治療法もない固形腫瘍を有する患者におけるOMP-18R5のオープンラベル第Ia相用量漸増試験である。この試験の主目的は、OMP-18R5の安全性と最大耐用量を決定することである。副次的目的は、OMP-18R5の免疫原性率、予備的有効性、および薬物動態を決定することである。

40

【0281】

治験の初期部分では、毎週0.5mg/kg（n=3）および毎週1.0mg/kg（n=5）のOMP-18R5という投薬レジメンで、患者を処置した。週に1回、0.5mg/kgを投与された一人の患者は、約100日間試験薬の投与を受けた後に、前部肋骨および腰椎の骨折を発症した。結果として、現在の治験のフェーズでは（試験は進行中であり、患者はまだ組み入れられている）、これより低頻度の投薬が利用されている。具体的に述べると、用量レベルは、0.5mg/kgを2週間に1回（n=3）、ならびに1mg/kg（n=4）、2.5mg/kg（n=3）、5mg/kg（n=3）、10mg/kg（n=3）、15mg/kg（n=5）、および20mg/kg（n=5）を3週間に1回（201

50

4年1月10日現在)である。被験者3人のコホートを処置し、28日目まで、用量制限毒性(DLT)について評価する。3人の被験者のうちDLTを示すものが0人であれば、次の用量コホートへの漸増を行う。3人の被験者のうち1人がDLTを起こした場合は、さらに3人の被験者を処置する。2人以上の被験者がDLTを起こした場合は、さらなる対象にはそのレベルでの投薬を行わず、新たに3人の被験者をその前の用量コホートに加える(ただし6人の被験者が既にその用量レベルで処置されている場合を除く)。腫瘍評価を56日目に行い、その後は56日ごとに腫瘍評価を行う。56日目に疾患または応答が安定している患者には、疾患が進行するまでは、OMP-18R5の投与を続けることが許されるであろう。

【0282】

患者が骨格関連(骨折)イベントを起こした後に、最初の8人の患者からの試料を使って、4つの骨代謝回転マーカー、すなわち骨特異的アルカリホスファターゼ、プロコラーゲン1型N末端プロペプチド(P1NP)、オステオカルシン、およびコラーゲン1型架橋C-ペプチド(-CTX)を測定した。骨特異的アルカリホスファターゼ、P1NP、およびオステオカルシンについては治療中の変化は認められなかったが、少なくとも1つの経過観察値が得られた7人の被験者の全てにおいて、-CTXの増加が認められた(表1、増加した-CTX値に下線を付す)。

【0283】

【表1】

患者	腫瘍タイプ	用量(mg/kg)	日	β -CTX
1	結腸直腸	0.5 QW	0日目	570
2	結腸直腸	0.5 QW	0日目	196
			28日目	308
			処置終了時	217
3	神経内分泌 (類癌腫)	0.5 QW	0日目	219
			28日目	<u>825</u>
			56日目	<u>896</u>
			処置終了時	<u>708</u>
4	平滑筋肉腫	1 QW	0日目	298
			処置終了時	<u>401</u>
5	乳房	1 QW	0日目	229
			28日目	<u>681</u>
			処置終了時	370
6	結腸直腸	1 QW	0日目	162
			28日目	<u>598</u>
7	結腸	1 QW	0日目	144
			28日目	<u>301</u>
			処置終了時	
8	膵臓	1 QW	0日目	406
			28日目	<u>551</u>

【0284】

したがって-CTXは、骨に対するOMP-18R5の効果の早期かつ高感度なバイオマーカーであると思われた。

【0285】

初期第Ia相試験の結果に基づいて、骨関連の副作用および/または毒性をDEXA骨密度スキャン、骨スキャン、ならびに骨代謝回転バイオマーカーである骨特異的アルカリホスフ

10

20

30

40

50

アターゼ、P1NP、オステオカルシン、および $\text{C}-\text{CTX}$ の測定でモニタリングすることを含むように、試験プロトコールを改訂した。改訂されたプロトコールには、骨格関連の副作用および/または毒性を処置するための戦略も含めた。 $\text{C}-\text{CTX}$ レベルがそれぞれのスクリーニング値から少なくとも倍増した患者、または全大腿骨もしくはL1～L4 DEXAスキャン測定においてTスコアが-2.5未満に低下した患者には、骨吸収抑制薬、具体的にはビスホスホネートであるゾレドロン酸が投与されるであろう。ゾレドロン酸は、 $\text{C}-\text{CTX}$ 値が倍増した時点またはTスコアが低下した時点において5mgの用量で静脈内に投与されることになる。

【 0 2 8 6 】

表2は、その後に試験に組み入れられてOMP-18R5のさらに低頻度の投薬（すなわち間欠的投薬）で処置された26人の患者からの結果（2014年1月10日現在）を示す（ベースラインの少なくとも2倍の高さである $\text{C}-\text{CTX}$ 値には下線を付し、アスタリスクはゾレドロン酸を投与した時を示す）。

10

【 0 2 8 7 】

【表2】

患者	腫瘍タイプ	用量 (mg/kg)	日	β-CTX	Tスコア
9	メラノーマ	0.5 Q2W	0日目 28日目 56日目	203 195 287	-0.7 -0.9
10	神経内分泌 (膵臓)	0.5 Q2W	0日目 28日目 56日目 84日目* 112日目 140日目 168日目 196日目 224日目 252日目 280日目 308日目 336日目 364日目 392日目 420日目 448日目	306 286 304 <u>664</u> 270 288 413 372 377 363 424 505 499 420 430 402 461 374	-1.4 -1.0 -0.9 -1.0 -1.0 -1.2 -1.3 -1.5
11	結腸直腸	0.5 Q2W	0日目 42日目 処置終了時	308 358 327	0.9 0.9
12	神経内分泌 (類癌腫)	1 Q3W	0日目 28日目 56日目 84日目 112日目 140日目 168日目 196日目 224日目 252日目	689 846 707 350 759 526 967 688 1216 1174	-1.4 -1.3 -1.4 -1.8 -1.7

			280日目	1223	-1.7
			308日目	1045	
			336日目	890	-1.9
			364日目	<u>1380</u>	
			392日目*	1332	-2.0
			420日目	218	
			448日目	274	-2.3
			476日目	246	
			504日目	214	-2.1
			532日目	510	
			560日目	341	
13	膀胱	1 Q3W	0日目 処置終了時	618 876	-0.9 -1.2
14	結腸	1 Q3W	0日目 28日目 処置終了時	471 760 688	+2.4 +2.2
15	結腸	1 Q3W	0日目 28日目 56日目 処置終了時	340 469 586 156	-0.7 -0.8
16	乳房	2.5 Q3W	0日目 28日目* 処置終了時	386 <u>805</u> 345	-0.7 -0.8
17	胸腺	2.5 Q3W	0日目 28日目	232 309	-1
18	類腫瘍	2.5 Q3W	0日目 28日目 処置終了時	607 555 824	-0.9 -1.0
19	食道	5 Q3W	0日目 28日目 処置終了時*	648 811 <u>1336</u>	+0.1 -0.1
20	甲状腺髓様	5 Q3W	0日目 28日目 56日目	561 665 1111	-1.0 -1.0
21	結腸直腸	5 Q3W	0日目	629	-0.1
22	子宮頸	10 Q3W	0日目 28日目	367 697	-1.2
23	軟骨肉腫	10 Q3W	0日目 28日目* 処置終了時	568 <u>1449</u> 199	-1.3 -1.6

24	虫垂	10 Q3W	0日目 28日目* 56日目	114 <u>652</u> 172	-1.3
25	神経内分泌	15 Q3W	0日目 28日目	927 ND	-0.7
26	小細胞癌、肛門	15 Q3W	0日目 28日目 56日目*	596 1171 <u>1278</u>	-1.3 -1.5
27	乳房	15 Q3W	0日目 28日目	492 ND	-1.9
28	結腸直腸	15 Q3W	0日目 28日目 56日目* 84日目	385 667 <u>898</u> 259	+0.6 +0.4
29	結腸直腸	15 Q3W	0日目 28日目 処置終了時	964 905 907	-1.6
30	腺様囊胞腺癌	20 Q3W	0日目 28日目 56日目	290 306 375	+1.5
31	結腸直腸	20 Q3W	0日目 28日目 56日目	434 ND 848	
32	腺様囊胞腺癌	20 Q3W	0日目 28日目	550 148	-2.3
33	HCC	20 Q3W	0日目 28日目	473 <u>979</u>	+0.8
34	小腸腺癌	20 Q3W	0日目	596	

【 0 2 8 8 】

2013年1月時点では、最初の10人の追加の患者（患者9～18）のうち、-CTXが倍増したのは、2人だけだった（患者10はベースラインにおける306という値から84日目に664という値になり、患者16はベースラインにおける386という値から28日目に805という値になった）。2014年1月10日時点では、26人の追加の患者（患者9～34）のうち、-CTXが倍増したのは、9人であった。これらのデータは、試験した用量レベルでは頻度の低いOMP-18R5の投薬が、-CTXの上昇を減らし、骨毒性を減少させることを示唆している。改訂されたプロトコールに従って患者10にはゾレドロン酸が5mgの静脈内用量で投与された。ゾレドロン酸の投与後は、-CTX値が112日目に、ほぼベースラインである270という値にまで戻り、その後の測定ではほぼそのレベルのままであった。患者16にも、-CTXレベルが倍増したためにゾレドロン酸を投与したところ、処置後に、-CTXレベルはやはり、ベースラインに戻った。-CTXレベルが倍増したので患者12にゾレドロン酸を投与したところ、その後、-CTXレベルは、ベースラインレベルのほぼ3分の1にまで低減した。患者16、19、23、24、26、および28はいずれもゾレドロン酸で処置され、その後にそれぞれの-CTXレベルが低減した。これらのデータは、ゾレドロン酸がOMP-18R5の骨吸収性を遮断および/

10

20

30

40

50

または阻害すること、そしてゾレドロン酸をこの骨格関連副作用を緩和するために使用できることを示唆している。

【0289】

2013年1月時点において、この試験に組み入れられた患者のうち、OMP-18R5による処置中に、DEXAスキャン（Tスコア）で評価した骨塩密度（BMD）が有意に変化した患者はいなかつた（表3）。2014年1月10日時点において、この試験に組み入れられた患者のうち、OMP-18R5による処置中に、DEXAスキャン（Tスコア）で評価した骨塩密度（BMD）が有意に変化した患者はいなかつた（表2）。

【0290】

【表3】

患者	DEXA時点	場所	Tスコア
1	スクリーニング時	AP 脊椎 L1-L4	-1.6
	終了時	AP 脊椎 L1-L4	-1.9
	スクリーニング時	AP 脊椎 L3	-2.0
	終了時	AP 脊椎 L3-L4	-2.1
	スクリーニング時	二重大腿骨頸部左	-1.8
	終了時	二重大腿骨頸部右	-1.7
3	スクリーニング時	二重大腿骨全平均	-1.7
	終了時	二重大腿骨全平均	-2.2
	スクリーニング時	AP 脊椎 L1-L2	-0.1
	スクリーニング時	AP 脊椎 L1-L4	+0.2
	終了時	AP 脊椎 L1-L4	+0.7
	終了時	AP 脊椎 L3-L4	+0.5
5	スクリーニング時	二重大腿骨頸部左	-0.1
	終了時	二重大腿骨頸部右	+0.2
	スクリーニング時	二重大腿骨全平均	+1.0
	終了時	二重大腿骨全平均	+0.7
7	スクリーニング時	大腿骨	-1.2
	終了時	大腿骨	-1.0
	スクリーニング時	腰椎	-0.6
	終了時	腰椎	-0.5
9	スクリーニング時	大腿骨	+1.2
	終了時	大腿骨	+0.7
	スクリーニング時	腰椎	+0.9
	終了時	腰椎	+0.9
9			-0.7

10

20

30

40

	終了時 スクリーニング時 終了時	腰椎 股関節部 股関節部	-0.9 +0.2 +0.2
10	スクリーニング時	AP 脊椎 L1-L2	-0.9
	スクリーニング時	AP 脊椎 L1-L4	-0.4
	スクリーニング時	二重大腿骨頸部左	-1.4
	スクリーニング時	二重大腿骨全平均	-0.9
	56日目	腰椎	-0.3
	56日目	股関節部	-0.8
11	スクリーニング時 終了時	大腿骨	+1.0
	スクリーニング時 終了時	股関節部	+0.9
	スクリーニング時 終了時	腰椎	+0.9
	スクリーニング時 終了時	腰椎	+1.1
13	スクリーニング時 終了時	腰椎	+0.1
	スクリーニング時 終了時	腰椎	+0.3
	スクリーニング時 終了時	股関節部	-0.9
	スクリーニング時 終了時	股関節部	-1.2
14	スクリーニング時 終了時	腰椎	+3.6
	スクリーニング時 終了時	腰椎	+3.9
	スクリーニング時 終了時	股関節部	+2.4
	スクリーニング時 終了時	股関節部	+2.2
16	スクリーニング時 終了時	腰椎 腰椎	+0.7 +0.8

10

20

30

40

50

【0291】

これらのデータは、骨塩密度のさらなる低下を発生させる有意なリスクを伴わずに骨減少症患者をOMP-18R5で処置できることを示唆している。さらにまた、これにより、-CTXは、Wnt経路インヒビターによる処置に起因する骨格関連の副作用および/または毒性の早期かつ高感度なバイオマーカーであると思われることが確認される。最後に、この試験により、OMP-18R5による処置に関連づけられる骨格関連副作用は管理可能かつ可逆的であると思われる事が示された。

【0292】

実施例5

固形腫瘍を有する患者におけるOMP-54F28の第Ia相試験

この試験は、もはや標準的根治治療法がない固形腫瘍を有する患者におけるOMP-54F28のオーブンラベル第Ia相用量漸増試験である。この試験の主目的は、OMP-54F28の安全性と最大耐用量を決定することである。副次的目的は、OMP-54F28の免疫原性率、予備的有効性、および薬物動態を決定することである。

【0293】

治験の初期部分では患者を、3週間ごとに1回、0.5mg/kg (n=3)、1.0mg/kg (n=3)、2.5mg/kg (n=3)、5mg/kg (n=5)、10mg/kg (n=3)、15mg/kg (n=3) および20mg/kg (n=5) のOMP-54F28という投薬レジメンで処置した。この試験は進行中であり、患者はまだ組み入れられている。被験者3人のコホートを処置し、28日目まで、用量制限毒性 (DLT) について評価する。3人の被験者のうちDLTを示すものが0人であれば、次の用量コホートへの漸増を行う。3人の被験者のうち1人がDLTを起こした場合は、さらに3人の被験者を処置する。2人以上の被験者がDLTを起こした場合は、さらなる対象にはそのレベルでの投薬を行わず、新たに3人の被験者をその前の用量コホートに加える（ただし6人の被験者

が既にその用量レベルで処置されている場合を除く)。腫瘍評価を56日目に行い、その後は56日ごとに腫瘍評価を行う。56日目に疾患または応答が安定している患者には、疾患が進行するまでは、OMP-54F28の投与を続けることが許されるであろう。

【0294】

第1相OMP-18R5試験から集めた情報に基づいて、 β -CTXレベルがそれぞれのスクリーニング値から少なくとも倍増した患者、または全大腿骨もしくはL1～L4 DEXAスキャン測定においてTスコアが-2.5未満に低下した患者には、ゾレドロン酸が投与されることになる。ゾレドロン酸は、 β -CTX値が倍増した時点またはTスコアが低下した時点において5mgの用量で静脈内に投与されることになる。

【0295】

表4は、試験に組み入れられて、3週間ごとに1回、OMP-54F28で処置された最初の6人の患者からの結果(2013年1月現在)を示す(ベースラインの少なくとも2倍の高さである β -CTX値に下線を付す)。

【0296】

【表4】

患者	腫瘍タイプ	用量(mg/kg)	日	β -CTX
1	卵巣	0.5 Q3W	0日目	215
			28日目	144
			56日目	119
			処置終了時	104
2	結腸直腸	0.5 Q3W	0日目	538
			28日目	604
			処置終了時	<u>1122</u>
3	脾臓	0.5 Q3W	0日目	497
			28日目	360
			56日目	414
			84日目	614
4	腺嚢	1 Q3W	0日目	346
			28日目	289
5	腎細胞	1 Q3W	0日目	657
			28日目	346
6	神経内分泌 子宮頸	1 Q3W	0日目	262
			28日目	238

【0297】

表5は、試験に組み入れられて、3週間ごとに1回、OMP-54F28で処置された最初の25人の患者からの結果(2014年1月9日現在)を示す(ベースラインの少なくとも2倍の高さである β -CTX値には下線を付し、アスタリスクはゾレドロン酸を投与した時を示す)。

【0298】

10

20

30

40

【表5】

患者	腫瘍タイプ	用量 (mg/kg)	日	β-CTX	Tスコア
1	卵巣	0.5 Q3W	0日目	215	+0.1
			28日目	144	
			56日目	119	+0.5
			処置終了時	104	
2	結腸直腸	0.5 Q3W	0日目	538	+0.5
			28日目	604	
			処置終了時	1122	
3	脾臓	0.5 Q3W	0日目	497	-0.1
			28日目	360	
			56日目	414	+2.4
			84日目	614	
			112日目	605	+2.1
			140日目	605	
			168日目*	1009	+1.7
			196日目	251	
4	腺嚢	1 Q3W	0日目	346	+1.2
			28日目	289	
			56日目	277	+0.6
5	腎細胞	1 Q3W	0日目	657	+0.5
			28日目	346	
			56日目	344	+0.5
			84日目	359	
			112日目	359	+0.5
			140日目	300	
6	大細胞 神経内分泌 子宮頸	1 Q3W	0日目	262	+0.1
			28日目	238	
			56日目	245	+0.1
7	結腸直腸	2.5 Q3W	0日目	890	-1.2
			28日目	1450	

10

20

30

			処置終了時	972	-1.4
8	NSCLC	2.5 Q3W	0日目	396	-0.1
			28日目	378	
			処置終了時	497	-0.4
9	胆管癌	2.5 Q3W	0日目	725	-0.5
			28日目	485	-0.5
10	尿路上皮癌	5 Q3W	0日目	634	+3.0
			28日目	570	
			56日目	484	+2.2
11	結腸直腸	5 Q3W	0日目	563	-1.3
			28日目	852	
			処置終了時	744	-0.8
12	子宮頸	5 Q3W	0日目	605	-0.9
			28日目	479	
			56日目	558	-0.5
13	腎細胞	5 Q3W	0日目	250	0.0
			28日目	387	
			56日目	378	+0.6
14	類腱腫	5 Q3W	0日目	354	-1.3
			28日目	167	
			56日目	362	-1.0
			84日目	242	
			112日目	233	-1.3
			140日目	245	
			168日目	114	-1.4
			196日目	296	
			224日目	276	
15	平滑筋肉腫	10 Q3W	0日目	386	-1.8
			28日目	300	
16	類腱腫	10 Q3W	0日目	355	-0.6
			28日目	435	
			56日目*	806	-0.9
			84日目	180	
			112日目	182	-0.8
			140日目	192	
			175日目	319	
			196日目	222	
17	HCC	10 Q3W	0日目	207	+1.2
			28日目	148	
			56日目	114	+1.1

10

20

30

40

18	結腸直腸	15 Q3W	0日目 28日目 処置終了時	796 864 529	-0.5 -0.5
19	膵臓	15 Q3W	0日目 28日目 処置終了時	770 824 610	-1.2
20	骨癌	15 Q3W	0日目 28日目 処置終了時	518 512 476	-0.8 -0.3
21	精巣	20 Q3W	0日目 28日目 56日目 84日目*	191 239 309 482	-0.1 -0.2
22	NSCLC	20 Q3W	0日目 28日目 56日目 84日目	648 851 698 402	-0.2 -0.2
23	甲状腺	20 Q3W	0日目 28日目* 56日目	262 731 251	+0.1
24	基底細胞	20 Q3W	0日目 28日目	660 670	-0.6
25	膵臓	20 Q3W	0日目 28日目	511 882	

10

20

20

30

40

【0299】

2013年1月時点において、患者2は -CTXがベースラインにおける538という値から42日目には1122という値まで倍増していた。この患者の疾患は進行し、OMP-54F28による処置は停止した。2014年1月9日時点において、25人の患者のうち5人は、それぞれの -CTXが倍増していた。患者3、16、21および28をゾレドロン酸で処置したところ、その後、それぞれの -CTXレベルは、ベースラインレベルまたはベースラインを下回るレベルにまで低減した。OMP-18R5処置で見られた結果と同様に、これらの初期データは、3週間ごとに1回の、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、および20mg/kgの用量レベルでのOMP-54F28による処置が、 -CTXの上昇を減らし、骨毒性を減少させることを示唆している。OMP-54F28による処置からのこれらの初期結果は、Wnt経路インヒビターと関連づけられる骨格関連副作用は、妥当な緩和戦略で管理可能であると思われることのさらなる証拠である。

【0300】

本明細書に記載する実施例および態様は例示のために過ぎないこと、そしてそれらに照らしてさまざまな変更または改変が当業者には示唆され、それらは本願の本旨および範囲に包含されるべきものであることは、理解されるであろう。

【0301】

本明細書において言及する刊行物、特許、および特許出願は全て、個々の刊行物、特許、または特許出願について参照によりそのまま組み込まれることを個別に明記した場合と同じ程度に、参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。

【0302】

50

以下は本願において開示される配列である。

OMP-18R5重鎖CDR1 (SEQ ID NO:1)

GFTFSHYTLS

OMP-18R5重鎖CDR2 (SEQ ID NO:2)

VISGDGSYTYYADSVKG

OMP-18R5重鎖CDR3 (SEQ ID NO:3)

NFIKYVFAN

OMP-18R5軽鎖CDR1 (SEQ ID NO:4)

SGDNIGSFYVH

OMP-18R5軽鎖CDR2 (SEQ ID NO:5)

DKSNRPSG

OMP-18R5軽鎖CDR3 (SEQ ID NO:6)

QSYANTLSL

OMP-18R5重鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO:7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYY
ADSVKGRFTISSLNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSS

OMP-18R5軽鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO:8)

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPER
FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG

OMP-18R5重鎖アミノ酸配列 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:9)

MKHLWFFLLVAAPRWLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAP
GKGLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSLNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFI
KYVFANWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNDHKPSNTKVDKTVERKCC
VECPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHWDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

OMP-18R5軽鎖アミノ酸配列 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:10)

MAWALLLLTLLTQGTGSWADIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGG
TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE
TTTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

OMP-18R5重鎖アミノ酸配列 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYY
ADSVKGRFTISSLNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTPSSNFGTQTYTCNDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLF
PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
SVLTVVHWDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

OMP-18R5軽鎖アミノ酸配列 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:12)

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPER
FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

ヒトFZD1 Friドメインアミノ酸配列 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:13)

QQPPPPPQQQQSGQQYNGERGISVPDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDA
GLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFG
FQWPDTLKCEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGT

10

20

30

40

50

ヒトFZD2 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:14）
 QFHGEKGISIPDHGFCQPIISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQ
 CSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLCEHFPR
 HGAEQICVGQNHSEDG

ヒトFZD3 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:15）
 HSLFSCEPITLRCMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAAALAMEPFHPMVNLDCSRDF
 RPFLCALYAPICMEYGRVTLPCCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPY
 PRLVDL

ヒトFZD4 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:16）
 FGDEEERRCDPIRISMCMQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDALQLTTFTPLIQQYGCSSQLQF
 10 FLCSVYVPMCTEKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNM
 MCMEGPGDEEV

ヒトFZD5 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:17）
 ASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFL
 CSMYTPICLPPDYHKPLPPCRSVCEAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVL
 CMDYNRSEATT

ヒトFZD6 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:18）
 HSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIEFLC
 KAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCKLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPVTFD
 20 PHTEFLG

ヒトFZD7 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:19）
 QPYHGEKGISVPDHGFCQPIISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKV
 QCSPELRFFLCSMYAPVCTVLDQAIIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFP
 VHGAGEICVGQNTSDGSG

ヒトFZD8 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:20）
 ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFF
 LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTL
 CMDYNRTDLTT

ヒトFZD9 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:21）
 LEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAELAEFAPLVQY
 30 GCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTPIPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARL
 PTRNDPHALCMEAPENA

ヒトFZD10 Friドメインアミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:22）
 ISSMDMERPGDGKQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCH
 GHRLFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNK
 NDPNYLCMEEAPNNG

ヒトFZD1アミノ酸116～227（SEQ ID NO:23）
 CQPIISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAP
 VCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHGAGELC

ヒトFZD2アミノ酸39～150（SEQ ID NO:24）
 40 CQPIISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
 VCTVLEQAIIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLCEHFPRHGAEQIC

ヒトFZD3アミノ酸28～133（SEQ ID NO:25）
 CEPITLRCMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAP
 ICMEYGRVTLPCCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDC

ヒトFZD4アミノ酸48～161（SEQ ID NO:26）
 CDPIRISMCMQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDALQLTTFTPLIQQYGCSSQLQFFLCSVYVP
 MCTEKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNM

ヒトFZD5アミノ酸33～147（SEQ ID NO:27）

CQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTP
ICLPDYHKPLPPCRSV CERAKAGCPLMRQYGF AWPERMSCDRLPVLGRDAEVLC

ヒトFZD6アミノ酸24～129 (SEQ ID NO:28)

CEPITVPRCMK MAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECS PNIETFLCKAFVP
TCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTGFIRWPEELECDRLQYC

ヒトFZD7アミノ酸49～160 (SEQ ID NO:28)

CQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFLLCSMYAP
VCTVLDQATPPCRSLCERARQGCEALMNKEFGQWPERLRCENFPVHGAGEIC

ヒトFZD8アミノ酸35～148 (SEQ ID NO:30)

CQEITVPLCKGIGYN TYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTP
ICLEDYKKPLPPCRSV CERAKAGCPLMRQYGF AWPDRMRCDRLPEQGNPDTLC

10

ヒトFZD9アミノ酸39～152 (SEQ ID NO:31)

CQAVEI PPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFLLCSLYAP
MCTDQVSTPIPACRPMCEQARLRCAPIMEQNF GWPDSLDCARL PTRNDPHALC

ヒトFZD10アミノ酸34～147 (SEQ ID NO:32)

CQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFLLCSLYAP
MCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQNF KWPDSLDCRKL PNKNDPNYLC

ヒトFZD8 Friドメインアミノ酸配列(予測シグナル配列なし)(変異体)(SEQ ID NO:33)

ASA KELACQEITVPLCKGIGYN TYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFF
LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSV CERAKAGCPLMRQYGF AWPDRMRCDRLPEQGNPDTLC
CMDYNRTDL

20

ヒトIgG₁ Fc領域(SEQ ID NO:34)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

ヒトIgG₁ Fc領域(変異体)(SEQ ID NO:35)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

30

ヒトIgG₁ Fc領域(SEQ ID NO:36)

KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

40

ヒトIgG₁ Fc領域(SEQ ID NO:37)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

40

ヒトIgG₂ Fc領域(SEQ ID NO:38)

CVEC PPPCPAPPVAGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

FZD8-Fc変異体54F03アミノ酸配列(予測シグナル配列なし)(SEQ ID NO:39)

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFF
 LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTL
 CMDYNRTDLTTGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

FZD8-Fc 変異体 54F16、54F17、54F18、54F23、54F25、54F27、54F29、54F31、および 54F34

アミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:40）

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFF
 LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTL
 CMDYNRTDLTTKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

10

FZD8-Fc 変異体 54F19、54F20、54F24、54F26、54F28、54F30、54F32、54F34 および 54F35

アミノ酸配列（予測シグナル配列なし）（SEQ ID NO:41）

ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFF
 LCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTL
 CMDYNRTDLTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

20

FZD8-Fc 変異体 54F03 アミノ酸配列（シグナル配列あり）（SEQ ID NO:42）

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHD
 TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAP
 LMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTGRADKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

FZD8-Fc 変異体 54F16 アミノ酸配列（シグナル配列あり）（SEQ ID NO:43）

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHD
 TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAP
 LMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

FZD8-Fc 変異体 54F26（シグナル配列あり）（SEQ ID NO:44）

MEWGYLLEVTSLLAALFLLQRSPIVHAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHD
 TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCEAKAGCAP
 LMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTKSSDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISSAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FZD8-Fc 変異体 54F28（シグナル配列あり）（SEQ ID NO:45）

50

MEWGYLLEVTSLLAALLLQRSPFVHAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYPNQFNHD
 TQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAP
 LMRQYGFAPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVGVEVNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒトWnt1 C末端システィンリッチドメイン (aa288 ~ 370) (SEQ ID NO:46)
 DLVYFEKSPNFCYSGRLGTAGTAGRACNSSSPALDGCELLCCGRGHRTTQRVTERCNC
 TFWWCCHVSCRNCTHTRVLHECL

10

ヒトWnt2 C末端システィンリッチドメイン (aa267 ~ 360) (SEQ ID NO:47)
 DLVYFENS PDYCIRDRREAGSLGTAGRVCNLTSRGMDSCEVMMCGRGYDTSHVTRMTKCGC
 KFWWCCAVRCQDCLEALDVHTCKAPKNADWTAT

ヒトWnt2b C末端システィンリッチドメイン (aa298 ~ 391) (SEQ ID NO:48)
 DLVYFDNSPDYCVLDKAAGSLGTAGRVC SKTSKGTDGCEIMMMCGRGYDTTEVTRVTQCEC
 KFWWCCAVRCRNTVDVHTCKAPKKAEWLDQT

ヒトWnt3 C末端システィンリッチドメイン (aa273 ~ 355) (SEQ ID NO:49)
 DLVYYENSPNFCEPNPETGSFGTRDRTCNVTSHGIDGCDLLCCGRGHNTRTEKRKEKCHC
 IFHWCCYVSCQECIRIYDVHTCK

ヒトWnt3a C末端システィンリッチドメイン (aa270 ~ 352) (SEQ ID NO:50)
 DLVYYEASPNFCEPNPETGSFGTRDRTCNVSSHGIDGCDLLCCGRGHNARAERRREKCRC
 VFHWCCYVSCQECTRVYDVHTCK

20

ヒトWnt7a C末端システィンリッチドメイン (aa267 ~ 359) (SEQ ID NO:51)
 DLVYIEKSPNYCEEDPVTSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC
 KFWCCYVKCNC SERTEMYTCK

ヒトWnt7b C末端システィンリッチドメイン (aa267 ~ 349) (SEQ ID NO:52)
 DLVYIEKSPNYCEEDAATGSVGTQGRLCNRTSPGADGCDTMCCGRGYNTHQYTKVWQCNC
 KFWCCFVKCNC SERTEVFTCK

ヒトWnt8a C末端システィンリッチドメイン (aa248 ~ 355) (SEQ ID NO:53)
 ELIFLEESPDYCTCNSSLGIYGTEGRECLQNSHNTSRERRSCGRLCTECGLQVEERKTE
 VISSCNCKFWCCAVRCEQCRRRTKYFCSRAERPRGGAAHKPGRKP

30

ヒトWnt8b C末端システィンリッチドメイン (aa245 ~ 351) (SEQ ID NO:54)
 ELVHLEDSPDYCLENKTLLGTEGRECLRRGRALGRWEIRSCRRLCGDCGLAVEERRAE
 TVSSCNCKFWCCAVRCEQCRRRTKYFCSRAERPRGGAAHKPGRKP

ヒトWnt10a C末端システィンリッチドメイン (aa335 ~ 417) (SEQ ID NO:55)
 DLVYFEKSPDFCEREPRLD SAGTVGRLCNKSSAGSDGCGSMCCGRGHNILRQTRSERCHC
 RFHWCCFVVCEECRITEWVSVCK

ヒトWnt10b C末端システィンリッチドメイン (aa307 ~ 389) (SEQ ID NO:56)
 ELVYFEKSPDFCERDPTMGS PGTRGRACNKT SRLLDGCGSLCCGRGHNVLRQTRVERCHC
 RFHWCCYVLCDECKVTEWVNVC

40

リンカー (SEQ ID NO:57)
 ESGGGGVT

リンカー (SEQ ID NO:58)
 LESGGGGVT

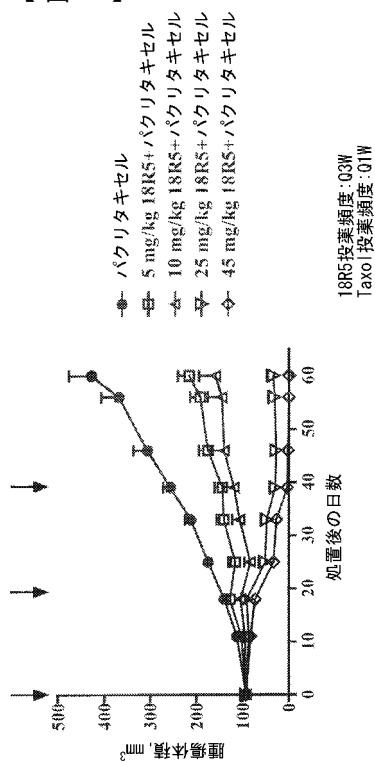
リンカー (SEQ ID NO:59)
 GRAQVT

リンカー (SEQ ID NO:60)
 WRAQVT

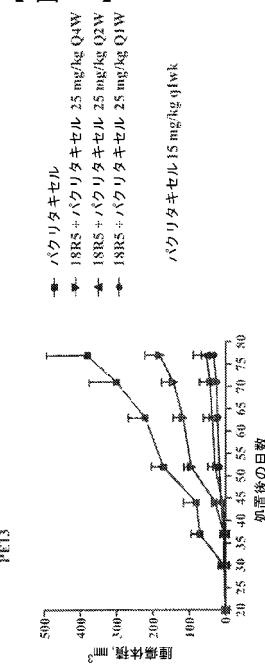
リンカー (SEQ ID NO:61)
 ARGRAQVT

50

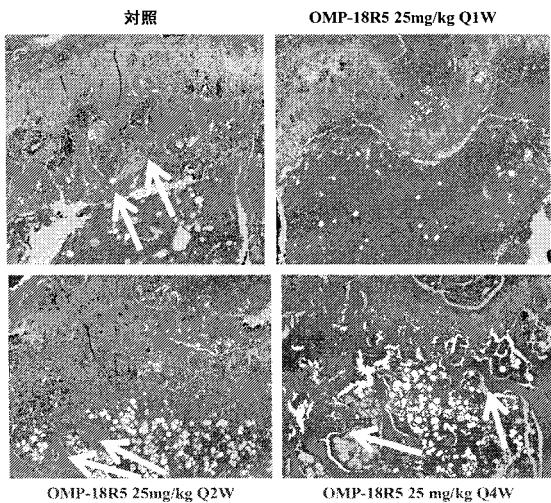
【図1】



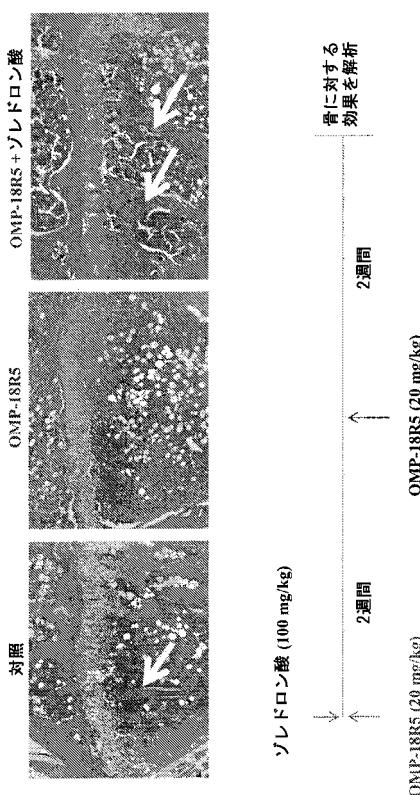
【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

2016510411000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/014443

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61P 19/08 (2014.01)

USPC - 514/16.7

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)
IPC(8) - A01K 2267/03; A61K 39/395; A61P 19/08; C07K 14/705; G01N 33/50 (2014.01)
USPC - 424/130.1, 133.1; 435/325, 326; 514/16.7, 16.9Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - C12N 2501/415; C12Q 2600/136, 2600/156, 2600/158; G01N 33/5041 (2014.02)

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

PatBase, Google Patents, Google, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/058393 A2 (RICHARDS et al) 03 May 2012 (03.05.2012) entire document	1-5, 26, 27, 30, 32, 34, 35
Y		10-18, 28, 29, 31, 33, 38, 85, 86
X	US 2009/0023905 A1 (ASKEW et al) 22 January 2009 (22.01.2009) entire document	39, 40
Y	US 2009/0263400 A1 (URDEA et al) 22 October 2009 (22.10.2009) entire document	10-18, 28, 29, 31, 33, 38, 85
Y	US 2012/0027778 A1 (GURNEY) 02 February 2012 (02.02.2012) entire document	85, 86
A	US 2005/0130199 A1 (CARSON et al) 16 June 2005 (16.06.2005) entire document	1-5, 10-18, 26-35, 38-40, 85, 86
A	GAUDIO et al. 'Increased Sclerostin Serum Levels Associated with Bone Formation and Resorption Markers in Patients with Immobilization-Induced Bone Loss.' J Clin Endocrinol Metab. 95(5): 2248-53. 19 March 2010. entire document	1-5, 10-18, 26-35, 38-40, 85, and 86
P, X	WHEATER et al. 'The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis.' J Transl Med. 11(201): 1-14. 29 August 2013. entire document	1-5, 10-18, 26-35, 38-40, 85, and 86

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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 application or patent 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2014

Date of mailing of the international search report

15 APR 2014

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/014443

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.: 6-9, 19-25, 36, 37, 41-84 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:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.:

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.

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 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/663	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 14/705	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72) 発明者 デュポン ヤコブ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズボロー カーディガン ロード 1 2 2 9
(72) 発明者 スタッグ ロバート ジョセフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 モラガ シルビア コート 2

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QS33 QX01
4C084 AA17 MA02 NA06 NA14 ZA96 ZB26 ZC75
4C085 AA13 AA14 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 DA34 DA38 MA01 MA02 MA04 NA06 NA14 ZA96
ZB26 ZC75
4H045 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA71