

(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2005-504262  
(P2005-504262A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/53  
GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 33/53 D  
GO 1 N 33/543 5 4 5 A

テーマコード (参考)

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2002-559686 (P2002-559686)  
(86) (22) 出願日 平成14年1月23日 (2002.1.23)  
(85) 翻訳文提出日 平成15年7月24日 (2003.7.24)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/002225  
(87) 国際公開番号 W02002/059620  
(87) 国際公開日 平成14年8月1日 (2002.8.1)  
(31) 優先権主張番号 60/264, 643  
(32) 優先日 平成13年1月26日 (2001.1.26)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

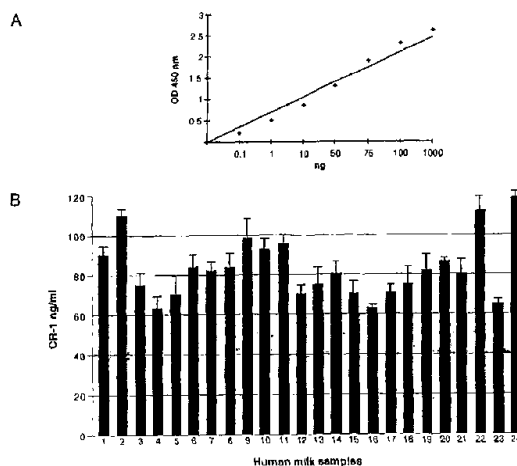
(71) 出願人 503265186  
アメリカ合衆国  
アメリカ合衆国、メリーランド州 208  
52-3804、ロックヴィル、スウィー  
ト 325、エグゼキューティヴ プルヴァ  
ード 6011  
(74) 代理人 100080791  
弁理士 高島 一  
(72) 発明者  
ピアンコ、キャテリーナ  
アメリカ合衆国、メリーランド州 208  
14、ベセスダ、シンノット ドライヴ  
10026

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C R I P T O - 1 の検出及び定量

(57) 【要約】

本発明は、C r i p t o - 1 の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳、血漿、血清、及び他の生物学的液体などのサンプル中の C r i p t o - 1 の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に好適な実施態様において、本発明では、ヒト乳、血漿、血清、及び他の生物学的液体中の C r i p t o - 1 の検出及び/又は定量における使用が見出される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

サンプル中のC r i p t o - 1の検出方法であって、

a) i) C r i p t o - 1を含有すると疑われる液体サンプル、

i i) C r i p t o - 1に対する抗体

を用意すること；

b) C r i p t o - 1と抗体が結合し、抗原 - 抗体複合体を形成するような条件下で、液体サンプルを抗体に曝すこと；及び

c) 抗原 - 抗体複合体を検出すること；

を含む方法。

10

## 【請求項2】

液体サンプルが、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

液体サンプルがヒト由来である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項4】

抗体が、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項5】

酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項6】

液体サンプル中のC r i p t o - 1を定量する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項7】

サンプル中のC r i p t o - 1の定量方法であって、

a) i) C r i p t o - 1を含有する液体サンプル、

i i) C r i p t o - 1に対する抗体

を用意すること；

b) C r i p t o - 1と抗体が結合し、抗原 - 抗体複合体を形成するような条件下で、液体サンプルを抗体に曝すこと；及び

c) 抗原 - 抗体複合体の量を測定すること；

を含む方法。

30

## 【請求項8】

液体サンプルが、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

## 【請求項9】

液体サンプルがヒト由来である、請求項7に記載の方法。

## 【請求項10】

抗体が、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

## 【請求項11】

酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項7に記載の方法。

40

## 【請求項12】

サンプル中のC r i p t o - 1の検出及び定量の方法であって、

a) i) C r i p t o - 1を含有すると疑われる液体サンプル、

i i) C r i p t o - 1に対する抗体

を用意すること；

b) C r i p t o - 1と抗体が結合し、抗原 - 抗体複合体を形成するような条件下で、液体サンプルを抗体に曝すこと；

c) 抗原 - 抗体複合体を検出すること；及び

d) 抗原 - 抗体複合体の量を測定すること；

50

を含む方法。

【請求項 13】

液体サンプルが、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

液体サンプルがヒト由来である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

抗体が、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

酵素結合免疫吸着アッセイ法である、請求項 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、C r i p t o - 1 の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳、血漿、血清、及び他の生物的液体などのサンプル中のC r i p t o - 1 の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。

【0002】

(発明の背景)

ヒトC r i p t o - 1 (C R - 1) は、構造的に関連した蛋白質の大きなファミリー、即ち、マウスC R - 1, マウスc r y p t i c, X e n o p u s F R L - 1, 及びz e b r a f i s h o n e - e y e d p i n h e a d ( o e p ) を含むE G F - C F Cファミリーの一員である(C i c c o d i c o l a ら, E M B O J . , 8 : 1 9 8 7 - 1 9 9 1 [ 1 0 9 0 ] ; D o n o ら, D e v e l o p . , 1 1 8 : 1 1 5 7 - 1 1 6 8 [ 1 9 9 3 ] ; S h e n ら, D e v e l o p . , 1 2 4 : 4 2 9 - 4 4 2 [ 1 9 9 7 ] ; K i n o s h i t a ら, C e l l 8 3 : 6 2 1 - 6 3 0 [ 1 9 9 5 ] ; 及び、Z h a n g ら, C e l l 9 2 : 2 4 1 - 2 5 1 [ 1 9 9 7 ] )。これらの蛋白質は、改変E G F様ドメインの存在、及びC F Cドメインと呼ばれる第2のシステインリッチ領域に特徴づけられる(S a l o m o n ら, B i o E s s a y s 2 1 : 6 1 - 7 0 [ 1 9 9 9 ] )。それらはまた、通常のシグナル配列、及びグリコシルホスファチジルイノシトール(G P I)部分による膜固定に必須の疎水性C末端を共有する(M i n c h i o t t i ら, M e c h . D e v e l o p . , 9 0 : 1 3 3 - 1 4 2 [ 2 0 0 0 ] )。ヒトC R - 1遺伝子とマウスC R - 1遺伝子は、それぞれ分子量が28kDaと24kDaである、それぞれ188個と171個のアミノ酸の糖蛋白質をコードする(B r a n d t ら, J . B i o l . C h e m . , 2 6 9 : 1 7 3 2 0 - 1 7 3 2 8 [ 1 9 9 4 ] )。E G F - C F C蛋白質は、囊胚形成期中胚葉形成と細胞移動を促進することによって、脊椎動物初期胚形成期に必須の役割を果たす(Z h a n g ら, 上記 ; G r i t s m a n ら, C e l l 9 7 : 1 2 1 - 1 3 2 [ 1 9 9 9 ] ; 及び、D i n g ら, N a t u r e 3 9 5 : 7 0 2 - 7 0 7 [ 1 9 9 8 ] )。C R - 1のmRNAと免疫反応性蛋白質は、数種のヒト乳癌細胞株で、ヒトの原発性乳癌の約80%で、及び、c - n e u, 形質転換成長因子(T G F), i n t - 3, ポリオーマミドルT遺伝子、及びS V - 40ラージT遺伝子などの、乳腺で異なる導入遺伝子を過剰発現するマウスで起こる乳腫瘍で発現する(K e n n e y ら, M o l . C a r c i n o g e n . , 1 5 : 4 4 - 5 6 [ 1 9 9 6 ] ; Q i ら, B r i t . J . C a n c e r 6 9 : 9 0 3 - 9 1 0 [ 1 9 9 4 ] ; 及び、D u b l i n ら, I n t . J . O n c o l . , 7 : 6 1 7 - 6 2 2 [ 1 9 9 5 ] )。C R - 1はまた、処女、妊娠、乳分泌、及び老齢の乳腺で異なる発現レベルで、発育中のマウス乳腺でも検出できる(K e n n e y ら, M o l . R e p r o d . D e v e l o p . , 4 1 : 2 7 7 - 2 8 6 [ 1 9 9 5 ] )。処女乳腺では、増殖中の終末芽のc a p幹細胞で主に見出され、C R - 1発現は、妊娠、乳分泌の間、

10

20

30

40

50

及び老齡の乳腺において、腺管上皮細胞で数倍増加する (Kenneyら, Mol. Reprod. Develop., 41: 277-286 [1995]; 及び Herringtonら, J. Cell. Physiol., 131: 215-226 [1997])。更に、CR-1は、マウス乳腺上皮細胞株 (HC-11) と1次マウス乳腺移植片培養物で、乳蛋白質の発現を調節できる (De Santisら, Cell Growth Different., 8: 1257-1266 [1997])。しかし、乳腺でのCR-1の同定にも係らず、乳房の健康及び疾患でのその役割は、殆ど不明のままであった。従って、種々の生物的液体中のCripto-1の簡単な検出及び定量を提供する方法の必要性が当該分野で依然存在する。

#### 【0003】

10

(発明の要旨)

本発明は、Cripto-1の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳 (例えば、ヒト乳)、及び他の生物的液体などのサンプル中のCripto-1の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。

本発明は、Cripto-1の検出方法であって、Cripto-1を含有すると疑われる液体サンプル及びCripto-1に対する抗体を用意すること; Cripto-1と抗体が結合し、抗原-抗体複合体を形成するような条件下で、液体サンプルを抗体に曝すこと; 及び抗原-抗体複合体を検出すること; を含む方法を提供する。一部の好適な実施態様では、液体サンプルは、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される。更に特に好適な実施態様では、液体サンプルはヒト由来である。更なる実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される。別の好適な実施態様では、該方法は酵素結合免疫吸着アッセイ法である。なお更なる実施態様では、該方法は、液体サンプル中のCripto-1量を定量する工程を更に含む。

20

#### 【0004】

本発明はまた、液体サンプル中のCripto-1の定量方法であって、Cripto-1を含有する液体サンプル、及びCripto-1に対する抗体を用意すること; Cripto-1と抗体が結合し、抗原-抗体複合体を形成するような条件下で、液体サンプルを抗体に曝すこと; 並びに抗原-抗体複合体の量を測定すること; を含む方法を提供する。一部の好適な実施態様では、液体サンプルは、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される。一部の特に好適な実施態様では、液体サンプルはヒト由来である。更なる実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される。別の好適な実施態様では、該方法は酵素結合免疫吸着アッセイ法である。なお更なる実施態様では、該方法は、液体サンプル中のCripto-1量を定量する工程を更に含む。

30

#### 【0005】

本発明はまた、サンプル中のCripto-1の検出及び定量の方法であって、Cripto-1を含有すると疑われる液体サンプル、及びCripto-1に対する抗体を用意すること; Cripto-1と抗体が結合し、抗原-抗体複合体を形成するような条件下で、液体サンプルを抗体に曝すこと; 抗原-抗体複合体を検出すること; 並びに抗原-抗体複合体の量を測定すること; を含む方法を提供する。一部の好適な実施態様では、液体サンプルは、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される。一部の特に好適な実施態様では、液体サンプルはヒト由来である。更なる実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される。別の好適な実施態様では、該方法は酵素結合免疫吸着アッセイ法である。

40

#### 【0006】

(発明の説明)

本発明は、Cripto-1の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳、血清、血漿、及び他の生物的液体などのサンプル中のCripto-1の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。

#### 【0007】

50

栄養素、ビタミン、ミネラルを含有することに加えて、ヒト乳はまた、乳腺の成長と分泌機能の調節、及び新生児の腸粘膜と免疫系の成長、発達、成熟の調節に重要であると考えられている種々の成長因子やサイトカインから構成される (Kidwellら, In Atkinson and Lonnerdal (eds), Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk, CRC Press, Boca Raton, FL [1989], pp. 77-91)。ヒト乳中で同定された数種の成長因子のうち、EGFとTGFは、正常な乳腺上皮に最も重要な分裂促進因子である (Carpenter, Science 210: 198-199 [1980]; 及び、Okadaら, Life Sci., 48: 1540-1543 [1991])。この点に関し、幾つかの研究では、EGFとTGFの両方がヒトとマウスの乳腺上皮細胞の増殖を刺激することが示されており、ヒト乳におけるそれらの存在は、乳腺上皮細胞の増殖と分化に生理的に重要であると考えられる (Snedekerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1063-1069 [1991])。 10

#### 【0008】

事実、ヒト乳は、生物活性を有する種々の異なる蛋白質とペプチドを含有する (Rodriguez-Palmeroら, Clin. Perinatol., 26: 355-359 [1999])。乳に存在する多数の生物活性物質のうちには、多数の成長因子やサイトカインがある (Grosvenorら, Endocrin. Rev., 14: 710-728 [1992])。これらとしては、インスリン、インスリン様成長因子1 (IGF-1)、EGF、TGF、形質転換成長因子1 (TGF-1) 及びTGF-2、ポンペシン、乳腺由来成長因子I及びII、コロニー刺激因子、ヒト乳成長因子I、II及びIII、血小板由来成長因子、肝細胞成長因子、血管内皮細胞成長因子、ベータセルリン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン-1 (IL-1)、並びにインターロイキン-6 (IL-6) が挙げられる (Grosvenorら, Endocrin. Rev., 14: 710-728 [1992]; Scamahs, Endocrin. Regul., 28: 3-8 [1994]; Yamadaら, Am. J. Reprod. Immunol., 40: 112-120 [1998]; Bryanら, Pediatr. Res., 45: 858-859 [1999]; Siafakasら, Pediatr. Res., 45: 652-657 [1999]; Hawkesら, Pediatr. Res., 46: 194-199 [1999]; Donnet-Hughesら, Immunol. Cell Biol., 78: 74-79 [2000]; Calhounら, Pediatr., 105: 1-6 [2000]; 及び、Dunbarら, Biochem. J., 344: 713-721 [1999])。 20 30

#### 【0009】

ペプチドのEGF-CFCファミリーの一員であるCR-1がヒト乳に存在することが、本発明の開発中に行った実験によって初めて示された。本明細書記載のように、ウエスタンブロット分析とELISAを用い、CR-1の存在に関し、24個のヒト乳サンプルを分析した。全てのサンプルで、濃度62-118 ng/mlでCR-1蛋白質が同定された。ヒト乳中のEGFに関し、同様の濃度が報告されている (Carpenter, Science 210: 198-199 [1980]; 及び、Okadaら, Life Sci., 48: 1540-1543 [1991])。不幸にも、出産後に乳サンプルを集めた時に関する情報は入手できなかった; 従って、ヒト乳中のCR-1濃度と乳分泌の明確な期間との間に可能性ある関連が存在するかどうかを確かめることはできなかった。この点に関し、幾つかの成長因子は、初乳で最高濃度に達し、分娩後急速に低下し、乳分泌の最後まで一定に留まる (Yamadaら, Am. J. Reprod. Immunol., 40: 112-120 [1998]; Bryanら, Pediatr. Res., 45: 858-859 [1999]; 及び 40 50

、 Readら, *Pediatr. Res.*, 18: 133-139 [1984])。免疫アフィニティクロマトグラフィによってヒト乳から精製されたCR-1は、ウエスタンブロット分析で評価した時、ヒト組換えCR-1蛋白質とはサイズが異なった。この点に関し、ヒトCR-1蛋白質は、単一のN-グリコシル化部位、5個のミリスチル化の可能性がある部位、及びプロテインキナーゼAとプロテインキナーゼCによるリン酸化の可能性がある3個のコンセンサス部位を含む (Brandtら, *J. Biol. Chem.*, 269: 17320-17328 [1994])。事実、サイズが28kDaと24kDaのネイティブなヒト及びマウスCR-1蛋白質の他に、マウスCR-1と免疫学的に関連する14-60kDaの範囲の他の蛋白質が記載されている (Kenneyら, *Mol. Carcinogen.*, 15: 44-56 [1996] ; 及び、 Senoら, *Growth Factors* 15: 215-229 [1997])。乳由来CR-1対ヒト組換えCR-1蛋白質の可動性の違いが、これらの翻訳後修飾によって説明されると考えられる。しかし、本発明を使用するために、関与する機構の理解は必要ではない。最後に、乳由来CR-1蛋白質は、NMuMGマウス乳腺上皮細胞でMAPKリン酸化を刺激できたので、生物学的に活性である。CR-1がまだ未知の細胞表面レセプターに結合することによって、MAPK経路の活性化が仲介される (Biancoら, *J. Biol. Chem.*, 274: 8624-8629 [1999])。

10

#### 【0010】

乳中の生物活性CR-1の存在は、この成長因子の幾つかの生物効果を基に、生理学的に重要であると考えられる。例えば、ras/raf/MAPK経路の活性化によりマウス乳腺上皮細胞の分裂促進効果を生じさせる他に (Kannanら, *J. Biol. Chem.*, 272: 3330-3335 [1997])、CR-1はまた、マウス乳腺上皮細胞株 (HC-11)、及び妊娠中期マウスから樹立されたマウス1次乳腺移植片培養物の分化を調節できる (De Santisら, *Cell Growth Different.*, 8: 1257-1266 [1997])。-カゼインや乳漿酸性蛋白質 (WAP) などの乳蛋白質を発現することによって、HC-11細胞とマウス1次乳腺上皮細胞は、乳腺刺激ホルモンであるデキサメタゾン、インスリン、及びプロラクチン (DIP) に応答する。CR-1は、乳腺刺激ホルモンに応答して、コンフルエントなHC-11細胞や静止期のマウス1次乳腺移植片培養中での-カゼインやWAP発現の阻害剤である。しかし、対数増殖期のHC-11細胞で、CR-1は、-カゼイン発現における次なる乳腺刺激ホルモンに誘導される増加に細胞を感受性にできる (De Santisら, *Cell Growth Different.*, 8: 1257-1266 [1997])。HC-11細胞におけるDIPに応答しての-カゼイン発現に対するCR-1の阻害効果は、p21<sup>ras</sup>-及びホスファチジルイノシトール3'-キナーゼ-依存性経路活性化によって仲介される。従って、活性化されるシグナル伝達経路に依存して、CR-1は、マウス乳腺上皮細胞に対する分裂促進効果又は分化効果を有する。従って、ヒト乳中のCR-1は、2種の異なる応答を調節すると考えられる。CR-1発現が上昇する妊娠中 (Kenneyら, *Mol. Reprod. Develop.*, 41: 277-286 [1995] ; 及び、 Herringtonら, *J. Cell Physiol.*, 131: 215-226 [1997])、CR-1は、乳腺上皮に対しその分裂促進効果を発揮し、よって乳腺上皮細胞の増殖と分化を刺激し、乳蛋白質発現を誘導すると考えられる。対照的に、細胞増殖が止まった乳分泌の間、乳中に存在するCR-1は、乳蛋白質発現を減少するのに重要であり、それ故、乳腺の分化を阻害し、乳腺の退行を促進するのに重要であると考えられる。事実、この機能は、CR-1がコンフルエントな生存因子が枯渇したHC-11細胞でアポトーシスを誘導できるという最近の実証によって支持される (De Santisら, *Cell Death Different.*, 7: 189-196 [2000])。この効果は、カスパーゼ-3様プロテアーゼの発現の増加とBcl-x<sub>l</sub>レベルのダウンレギュレーションにより仲介される (De Santisら, *Cell Death*

20

30

40

50

Different, 7: 189-196 [2000])。しかし、本発明を使用するために、機構の理解は必要ではない。事実、本発明は、いずれの特定の機構にも限定されないことが意図される。

#### 【0011】

マウス乳腺の成長と形態形成を調整することに加えて、CR-1は、ヒト乳癌の病因に係るかもしれないことが示されている(Qiら, Brit. J. Cancer 69: 903-910 [1994]; Dublinら, Int. J. Oncol., 7: 617-622 [1995]; 及び、Salomonら, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 19: 183-232 [1995])。浸潤する腺管癌又は小葉癌の約80%で、及びin situの腺管癌の50%で、CR-1発現が検出された(Qiら, Brit. J. Cancer 69: 903-910 [1994])。興味深いことには、非関与の隣接乳腺上皮標本の15%だけが、CR-1発現に陽性であり、このことはこの疾患のための可能性ある腫瘍マーカーとしてのCR-1の役割を示している(Qiら, Brit. J. Cancer 69: 903-910 [1994])。しかし、CR-1発現と、腫瘍サイズ、リンパ節関与、増殖性指標、又は、エストロゲンやプロゲステロンレセプター状態などの種々の臨床病理学的パラメータとの間の有意な相関は見出されなかった(Dublinら, Int. J. Oncol., 7: 617-622 [1995])。ヒト乳中のCR-1の存在を示す、本明細書に含まれるデータによれば、乳腫瘍によって十分に高い十分なレベルで発現したCR-1は、癌細胞によって放出され、血液循環に達することが示される。従って、ヒト血清及び/又は血漿中のCR-1レベルの検出と測定は、乳癌の診断における臨床的重要性を見出すであろうと考えられる。事実、幾つかの異なる成長因子やサイトカインが、ヒト乳癌患者の血漿又は血清に存在すると報告されており、それらの濃度は、疾患進行や、化学療法及び内分泌療法に対する応答と有意に関連する(Zhangら, Anticancer Res., 19: 1427-1432 [1999]; Taniguchiら, Clin. Cancer Res., 1: 1031-1034 [1995]; 及び、Dorixら, Br. J. Cancer 76: 238-243 [1997])。実際、乳癌患者のヒト血漿中のCR-1を検出するため、本発明の開発中に実験を行った。

#### 【0012】

本発明の開発中に、妊娠及び乳分泌の間、マウス乳腺で検出されるCR-1発現の増加がこの成長因子の乳中への分泌と関連するかどうかを決定するため、評価を行った。これらの初期の結果に基づき、ヒト乳や他のサンプル中のCR-1の検出と定量に適したELISA法とウエスタンブロット分析法を提供する本発明を開発した。本明細書に示すように、方法及び組成物は、濃度62-118 ng/mlで、乳サンプル中の28 kDaのCR-1の特異的バンドを検出する手段を提供する。更に、本明細書でより詳細に考察するように、免疫アフィニティカラムを用いてヒト乳から精製したCR-1は、NMuMGマウス乳腺上皮細胞でMAPKのリン酸化を刺激できた。

#### 【0013】

単一特異的ウサギポリクローナル抗CR-1抗体を用いるウエスタンブロット分析によってCR-1発現に関し、ヒト乳の24個のサンプルを分析した。ウサギポリクローナル抗CR-1抗体と反応した28 kDaのバンドは、ヒト乳サンプル中で様々な強度で同定された(図1参照)。全てのサンプルが種々の程度までではあったが、免疫反応性CR-1蛋白質を発現した。

#### 【0014】

抗CR-1抗体によって認識されるバンドが特異的であることを示すために、過剰の組換えCR-1とプレインキュベートしたウサギポリクローナル抗CR-1抗体でサンプル1-9をプローブした。CR-1蛋白質を予め吸着した抗CR-1抗体と共にサンプルをインキュベートしたとき、バンドは検出されず、このことは、抗CR-1抗体によって認識されたバンドの特異性を示している(図2)。ヒト乳中のCR-1の存在と量も、ELI

10

20

30

40

50

SAによって評価し、定量した。異なる濃度での標準品として組換えCR-1蛋白質を用いて、脱脂ヒト乳サンプル中のCR-1濃度を評価した。ウサギ抗CR-1ポリクローナル抗体は、100pg-1μgの濃度範囲にわたり組換えヒトCR-1を直線的に検出できることを図3、パネルAは示す。乳サンプル中62-118ng/mlの濃度で免疫反応性CR-1は存在した(図3、パネルB参照)。ウエスタンブロット分析によって検出した乳サンプル中の28kDaのCR-1免疫反応性蛋白質の相対量と、ELISAで測定した免疫反応性CR-1の濃度との間には有意な相関があった。

**【0015】**

ヒト乳中のCR-1が乳腺上皮細胞に対し生物活性であるかどうかを評価するために、ウエスタンブロット分析とELISAで決定したとき高レベルのCR-1を発現している単一のヒト乳サンプル(サンプル番号2)を精製のために選択した。抗CR-1ウサギポリクローナル抗体が結合している免疫アフィニティカラムを用い、脱脂ヒト乳からCR-1を精製した。濃縮、透析、ウエスタンブロット分析によって決定したCR-1濃度の推定(図4)後、NMuMGマウス乳腺上皮細胞に対する活性について精製CR-1蛋白質をアッセイした。

10

**【0016】**

何匹かのマウスとヒト乳腺上皮細胞株で、CR-1は、Shcのp66、p52及びp46イソ型のチロシンリン酸化の急速な増加を誘導でき、このチロシンリン酸化は、次いで、ras/raf/MAPK経路を活性化でき、このことは、MAPKのp42とp44イソ型の増大したリン酸化によって示されることが以前示されている(Kannanら, J. Biol. Chem., 272: 3330-3335 [1997])。NMuMGマウス乳腺上皮細胞は、ShcとMAPKのリン酸化の増大を伴い、組換え又は化学合成CR-1に応答する(Senoら, Growth Factors 15: 215-229 [1998]; 及び、Kannanら, 上記)。ヒト乳から精製したCR-1が組換えCR-1に匹敵する活性を有するかどうかを確かめるために、血清欠乏のNMuMG細胞を、異なる濃度の免疫精製乳由来CR-1蛋白質で処理し、組換えヒトCR-1と比較した。乳由来CR-1による細胞の処理後、MAPKの用量依存性活性化が検出された(図5参照)。組換えヒトCR-1(100ng/ml)はまた、乳由来CR-1の100ng/mlによるMAPK刺激のレベルに殆ど等しいMAPKリン酸化を刺激できた。

20

30

**【0017】**

(定義)

本明細書と特許請求の範囲における用語「サンプル」と「標本」は、その最も広い意味で使用される。好適な実施態様では、これらの用語は、尿、血液、脳脊髄液(CSF)、糞便、精液、及び唾液などの体液を含むが、それらに限定されない、ヒト及び他の動物から得られる全てのタイプのサンプルを包含する。しかし、生物サンプルは、ヒトを含む動物の液体又は組織であってもよい。これらの例は、本発明に適用できるサンプルのタイプを限定するものと解釈されるべきではないからである。

**【0018】**

本明細書で使用する場合、用語「液体サンプル」は、液体であるサンプルを指す。例えば、該用語は、乳、血液、血清、血漿、CSF、尿、精液、唾液、漿液などの身体性液体(例えば、「生物液体」)を包含する。本発明は、いずれの特定の液体にも限定されるものではないことが意図される。

40

**【0019】**

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、特定の抗原と反応する任意の免疫グロブリン分子について使用される。該用語は、任意の源(例えば、ヒト、げっ歯類、非ヒト霊長類、ウサギ、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなど)から得られる任意の免疫グロブリン(例えば、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDなど)を包含することが意図される。

**【0020】**

本明細書で使用する場合、用語「抗原」は、抗体と反応できる任意の物質について用いら

50

れる。この用語は、任意の抗原及び「免疫原」（即ち、抗体形成を誘導する物質）を包含することが意図される。従って、免疫原性反応において、抗体は、抗原又は抗原の一部の存在に応答して産生される。

**【0021】**

本明細書で使用する場合、用語「抗原フラグメント」及び「抗原の一部」は、抗原の断片について使用される。抗原フラグメント又は一部は、完全な抗原の小さな割合から大きな割合の範囲（しかし、抗原の100%ではない）の種々のサイズで存在しうる。しかし、「抗原の少なくとも一部」が特定される状況では、完全な抗原は存在しうると考えられる。一部の好適な実施態様では、抗原のフラグメント又は一部は、抗体によって認識される「エピトープ」（例えば、「抗原決定基」）を含む。他の実施態様では、抗原のフラグメント又は一部は、免疫原性であるが（即ち、このようなフラグメント又は一部は免疫応答を誘導できる）、他の実施態様では、抗原のフラグメント又は一部は、免疫原性ではない（即ち、このようなフラグメント又は部分は免疫応答を誘導できない）。

10

**【0022】**

本明細書で使用する場合、用語「免疫アッセイ」は、抗体を抗原の検出に使用する任意の方法について使用される。直接免疫アッセイ、間接免疫アッセイ、及び「サンドイッチ」免疫アッセイを含むが、それらに限定されない様々な免疫アッセイ様式が、この定義によって包含されると考えられる。特に好適な様式は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）である。しかし、本発明は、この様式に限定されるものではないことが意図される。放射免疫アッセイ（RIA）、免疫蛍光アッセイ（IFA）、及びELISA法の変法を含むがそれらに限定されない他のアッセイ様式などが挙げられる他の様式が、本発明の方法における使用が見出されることが考えられる。実際、「フロキュレーション」（即ち、抗原-抗体複合体の形成で産生されるコロイド性懸濁液）、「凝集」（即ち、抗体への暴露時の細胞又は他の物質の凝集）、「粒子凝集」（即ち、抗体の存在下での抗原で被覆された粒子の凝集、又は抗原の存在下での抗体で被覆された粒子の凝集）、「補体結合」（即ち、抗体-抗原反応方法における補体の使用）、並びに、血清学、免疫学、免疫細胞化学、組織化学、及び関連分野で通常使用される他の方法が挙げられるが、それらに限定されない他の抗原-抗体反応様式が本発明での使用が見出されることが考えられる。

20

**【0023】**

本明細書で使用する場合、用語「細胞染色」は、細胞を標識又は染色して可視化を高めるのに使用される方法について使用される。この染色又は標識は、フルオロクロム、酵素、金、ヨウ素が挙げられるが、それらに限定されない種々の化合物の使用により達成される。該定義は、*in situ*のサンプルに対し試験（即ち、アッセイ）が行われる「*in situ*発色アッセイ」のような方法を包含すると考えられる。*in situ*発色アッセイは、免疫アッセイ（即ち、ELISA）又は免疫細胞組織化学の使用を含むとも考えられる。しかし、本発明は、細胞染色のどんな特定のアッセイ様式にも限定されるものではないことが意図される。

30

**【0024】**

本明細書で使用する場合、用語「捕捉抗体」は、抗原と結合し、それにより、次に適用される抗体による抗原の認識を可能とするために使用される抗体を指す。例えば、一部の好適な実施態様では、捕捉抗体はマイクロタイターウエルと結合されており、ウエルに加えられるサンプル中に存在する抗原（例えば、Crip1）と結合するよう働く。次いで、別の抗体（「一次抗体」と呼ばれる）が抗原-抗体複合体と結合するのに使用され、抗体-抗原-抗体から構成される「サンドイッチ」を形成する効果がある。この複合体の検出は、幾つかの方法によって行うことができる。一部の特に好適な実施態様では、一次抗体は、ビオチン、酵素、蛍光マーカー、又は放射活性などの標識と共に調製され、この標識を用い直接的に検出される。あるいは、一次抗体を認識する標識した「二次抗体」又は「レポーター抗体」を加え、抗体-抗原-抗体-抗体から構成される複合体を形成させる。再度、適切なレポーター試薬を次いで加え、標識抗体を検出する。他の実施態様では、任意の数の付加的抗体を、所望に応じ加える。一部の実施態様では、これらの抗体は

40

50

また、酵素、蛍光マーカー、又は放射活性が挙げられるが、それらに限定されないマーカーで標識される。

【0025】

本明細書で使用する場合、用語「レポーター試薬」又は「レポーター分子」は、抗原と結合した抗体の存在を検出できる化合物について使用される。例えば、好適な実施態様では、レポーター試薬は、酵素基質と結合された比色物質である。抗体と抗原の結合に際し、酵素はその基質に作用し、発色を引き起こす。他のレポーター試薬として、蛍光産生、発色、発光、及び放射活性の化合物又は分子が挙げられるが、それらに限定されない。この定義はまた、検出システムの一部としてビオチン及びアビジンベースの化合物（例えば、化合物を含むが、ニュートラビジン（neutravidin）やストレプトアビジンに限定されない）の使用を包含する。本発明の1実施態様では、ビオチン化抗体を、アビジンで被覆した固相支持体と共に使用する。

10

【0026】

本明細書で使用する場合、用語「シグナル」は、反応、例えば、抗原への抗体の結合が生じたということの指標について使用される。放射活性、蛍光産生反応、及び酵素反応の形態でのシグナルは、本発明と共に使用されるだろうことが考えられる。しかし、本発明は、どんな特定のシグナルにも限定されるものではないことが意図される。一部の実施態様では、シグナルは、定量的及び/又は定性的に評価される。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「増幅体」は、ELISAなどの試験方法においてシグナルを増大させるシステムについて使用される。しかし、本発明は、どんな特定のアッセイシステム又は様式における増幅体の使用にも限定されるものではないことが意図される。

20

【0028】

本明細書で使用する場合、用語「固相支持体」は、抗体、抗原、及び/又は他の化合物などの種々の試薬の結合に適した任意の固体材料について使用される。例えば、ELISA法では、マイクロタイタープレートのウェルはしばしば固相支持体を提供する。固相支持体の他の例として、顕微鏡用スライド、カバーガラス、ビーズ、粒子、細胞培養フラスコ、並びに多数の他の物品が挙げられる。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「キット」は、試薬及び他の材料の組合せについて使用される。好適な実施態様では、本発明のキットは、マイクロタイタープレート、緩衝液、標識抗体、陽性及び陰性対照、使用者用指示マニュアルなどを含む。本発明のキットは、どんな特定の構成成分、試薬などにも限定されるものではないことが意図される。実際、種々のキット様式が、本発明での使用が見出されるであろうことが意図される。

30

【0030】

（実験）

本発明の特定の好適な実施態様及び局面を示し、更に説明するために、以下の実施例を提供するが、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0031】

以下の実験の開示で、以下の略号が適用される。

40

（摂氏温度）；rpm（毎分回転数）；BSA（ウシ血清アルブミン）；CFA（完全フロインドアジュバント）；IFA（不完全フロインドアジュバント）；IgG（免疫グロブリンG）；IM（筋肉内）；IP（腹腔内）；IV（静脈内又は血管内）；SC（皮下）；H<sub>2</sub>O（水）；HCl（塩酸）；aa（アミノ酸）；bp（塩基対）；kb（キロベース対）；kD（キロダルトン）；gm（グラム）；μg（マイクログラム）；mg（ミリグラム）；ng（ナノグラム）；μl（マイクロリットル）；ml（ミリリットル）；mm（ミリメートル）；nm（ナノメートル）；μm（マイクロメートル）；M（モル濃度）；mM（ミリモル濃度）；μM（マイクロモル濃度）；U（ユニット）；V（ボルト）；MW（分子量）；秒（秒）；分（分）；時間（時間）；MgCl<sub>2</sub>（塩化マグネシウム）；NaCl（塩化ナトリウム）；OD<sub>280</sub>（280nmでの光学密度）；OD<sub>6</sub>

50

0.0 (600 nmでの光学密度); PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動); PBS (リン酸緩衝化生理食塩水 [150 mM NaCl, 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.2]); PCR (ポリマーゼ連鎖反応); PEG (ポリエチレングリコール); PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド); RT-PCR (逆転写PCR); SDS (ドデシル硫酸ナトリウム); Tris (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン); w/v (体積に対する重量); v/v (体積に対する体積); Amersham (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL); Pierce (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); ICN (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA); Amicon (Amicon, Inc., Beverly, MA); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Kirkegaard & Perry (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD); BioRad (BioRad, Richmond, CA); GIBCO BRL 又は Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); New England Biolabs (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); Pharmacia (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ); 及び、Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。

10

20

#### 【0032】

これらの実験では、使用したヒト乳サンプルは24人の健康な女性から得た。これらのサンプルを出産後に集めた時に関するデータは入手できなかった。サンプルを14,000 rpmで10分間遠心分離し、脂質層除去後、乳の水層を集めた。

NMuMG正常マウス乳腺上皮細胞を、10%ウシ胎仔血清を含有するダルベッコ改変イーグル培地で培養した。組換えヒトCR-1 (rhCR-1) 蛋白質を、E. coliで発現させ、当該分野で公知のようにして精製した (Senoら, Growth Factors 15: 215-229 [1998] 参照)。

#### 【0033】

##### 実施例 1

30

##### ウエスタンブロット分析

これらの実験で、脱脂ヒト乳サンプル40 µlを4-20% SDS-PAGEゲルにロードし、還元条件で電気泳動した。電気泳動後、ゲル上の蛋白質をPVDF膜に移し、0.05% TWEEN (登録商標) - 20界面活性剤を含有する20 mM Tris緩衝化生理食塩水中の5%乾燥乳でブロックした。膜を、ウサギポリクローナル抗CR-1抗体 (Biocon) の1:1000希釈物と4で一晚インキュベートした。ヒト組換えCR-1 (1 µg/ml) と室温で2時間ブレインキュベートしたウサギポリクローナル抗CR-1抗体の1:1000希釈物で1枚の膜をプローブした。西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したヤギ抗ウサギIgGの1:2000希釈物を用いて、結合したウサギ抗体を検出し (Amersham)、免疫反応性バンドを、増強化学発光 (enhanced chemiluminescence) によって検出した (Amersham)。

40

#### 【0034】

図1に示すように、ウサギポリクローナル抗CR-1抗体と反応する28 kDaのバンドが、ヒト乳サンプルにおいて種々の強度で同定された。試験したサンプルの全部が、種々の程度までではあるが、免疫反応性CR-1蛋白質を発現した。

抗CR-1抗体によって認識されたバンドが特異的であるかどうかを示すために、過剰の組換えCR-1とブレインキュベートしたウサギポリクローナル抗CR-1抗体でサンプル1-9をプローブした。CR-1蛋白質で予め吸着した抗CR-1抗体と共に、サンプルをインキュベートしたとき、バンドは検出されず、このことは、抗CR-1抗体で認識されたバンドの特異性を示している (図2)。実施例2で下記するように、ヒト乳中のC

50

R - 1 の存在と量をまた、E L I S A で評価及び定量した。

【 0 0 3 5 】

#### 実施例 2

##### 酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A )

これらの実験では、各々の脱脂乳サンプル 2 0 0  $\mu$  l を 9 6 マイクロタイターウエルプレートに加え、4 で一晩インキュベートした。ヒト組換え C R - 1 蛋白質も、1 0 0 p g - 1  $\mu$  g の範囲の濃度で吸着した。プレートを、3 7 で 1 時間、2 % 乳 ( K i r k e r g a a r d & P e r r y ) でブロックし、ウサギポリクローナル抗 C R - 1 抗体 ( B i o c o n ) の 1 : 3 0 0 0 希釈物と 3 7 で 1 時間インキュベートした。洗浄緩衝液 ( K i r k e r g a a r d & P e r r y ) でプレートを 3 回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ ( A m e r s h a m ) と結合したロバ抗ウサギ I g G の 1 : 3 0 0 0 希釈物を加え、3 7 で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを、洗浄緩衝液で 5 回洗浄し、T M B ペルオキシダーゼ基質緩衝液 ( K i r k e r g a a r d & P e r r y ) 1 0 0  $\mu$  l をウエルに加えた。発色を考慮するため、プレートを 5 分間暗所でインキュベートした。停止溶液 ( K i r k e r g a a r d & P e r r y ) の添加によって反応を停止し、吸光度を 4 5 0 n m で読み取った。実験は 3 連で行い、3 回繰り返した。

幾つかの E L I S A 実験の結果を図 3 に示す。図 3 パネル A は、組換え C R - 1 蛋白質の異なる濃度を用い、サンプル中の C R - 1 濃度を評価したプレートの結果を与える。ウサギ抗 C R - 1 ポリクローナル抗体が、1 0 0 p g - 1  $\mu$  g の濃度範囲にわたり組換えヒト C R - 1 を直線的に検出できることをこの図は示している。また、図 3 パネル B に示すように、免疫反応性 C R - 1 は、乳サンプル中 6 2 - 1 1 8 n g / m l の濃度で存在した。ウエスタンブロット分析によって検出した乳サンプル中の 2 8 k D a の C R - 1 免疫反応性蛋白質の相対量 ( 実施例 1 で記載 ) と、本実施例で記載の E L I S A で測定した免疫反応性 C R - 1 の濃度との間には有意な相関があった。

【 0 0 3 6 】

#### 実施例 3

##### ヒト乳由来の C R - 1 蛋白質の免疫精製

製造業者の説明書のとおり、A M I N O L I N K ( 登録商標 ) P l u s 固定化キット ( P i e r c e ) を用い、ヒト乳由来の C R - 1 蛋白質を精製した。要約すると、0 . 1 M クエン酸ナトリウムと 0 . 0 5 M 炭酸ナトリウムを含有する p H 1 0 のカップリング緩衝液を用い、ウサギポリクローナル抗 C R - 1 I g G を、A M I N O L I N K ( 登録商標 ) P l u s カップリングゲルに結合した。次いで、脱脂ヒト乳由来の C R - 1 のアフィニティ精製のために、抗 C R - 1 抗体結合カラムを用いた。ウエスタンブロット ( 実施例 1 参照 ) と E L I S A ( 実施例 2 参照 ) によって検出されたその高い C R - 1 レベルのために、ヒト乳サンプル番号 2 を精製のために選択した。

【 0 0 3 7 】

ヒト乳 5 m l をカラムに適用し、室温で 1 時間インキュベートした。P B S で洗浄後、結合した C R - 1 蛋白質を、0 . 1 M グリシン p H 2 . 5 で数画分に溶出し、1 M T r i s p H 9 . 5 で中和した。該蛋白質含有画分をプールし、C E N T R I C O N ( 登録商標 ) 1 0 ( A m i c o n ) 濃縮器で濃縮し、P B S に対し透析した。実施例 1 に記載のように、参照として既知濃度の組換えヒト C R - 1 を用い、ウエスタンブロットによって、精製蛋白質の濃度を評価した。このウエスタンブロットで、ヒト組換え C R - 1 蛋白質 1 0 0 n g ( レーン 1 ) と免疫精製乳サンプル 4 0  $\mu$  l ( レーン 2 ) を、4 - 2 0 % S D S - P A G E ゲル上で電気泳動し、ウサギポリクローナル抗 C R - 1 抗体の 1 : 1 0 0 0 希釈物でプローブした。結果を図 4 に示す。

【 0 0 3 8 】

#### 実施例 4

##### 乳由来 C R - 1 蛋白質のバイオアッセイ

ヒト乳由来の精製 C R - 1 蛋白質の活性を試験するために、1 0 0 m m プレートに N M u M G マウス乳腺上皮細胞を播種し、7 0 - 8 0 % コンフルエンスに達するまで増殖させた

。次いで、ヒトトランスフェリン(10 µg/ml)とIV型ペダーセンフェツイン(1 mg/ml)とを含有する無血清ダルベッコ改変イーグル培地に、細胞を24時間移した。組換えヒトCR-1蛋白質100 ng/ml、又は実施例2に記載の免疫アフィニティークロマトグラフィによってヒト乳から精製したCR-1で、細胞を37 °Cで5分間刺激した。20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% デオキシコレート, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µg/ml アプロチニン, 2 µg/ml ロイペプチン, 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 及び20 mM フッ化ナトリウムを含有する緩衝液中で細胞を溶解した。

#### 【0039】

粗蛋白質溶解物(30 µg/サンプル)を10% SDS-PAGEゲル上で電気泳動し、PVDf膜に移し、5%乾燥乳から調製した溶液でブロックし(実施例1参照)、ウサギポリクローナル抗ホスホMAPK抗体(Biolab)の1:1000希釈物とインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ(Amersham)と結合したヤギ抗ウサギIgGとのインキュベーション後、増強化学発光によって免疫反応性バンドを検出した(Amersham)。

#### 【0040】

細胞溶解物を、10% SDS-PAGEゲル上で電気泳動し、MAPKの活性化リン酸化形態(p44及びp42)を認識する抗ホスホMAPKウサギポリクローナル抗体(Biolab)でプローブした結果を図5は与える。この図で、レーン1は、血清欠乏細胞を含む;レーン2は、rhCR-1(100 ng/ml)を含む;レーン3は、乳CR-1(50 ng/ml)を含む;レーン4は、乳CR-1(100 ng/ml)を含む;レーン5は、乳CR-1(300 ng/ml)を含む;レーン6は、乳CR-1(500 ng/ml)を含む。

#### 【0041】

図5に示すように、乳由来CR-1による細胞の処理後、MAPKの用量依存性活性化が検出された。組換えヒトCR-1(100 ng/ml)はまた、乳由来CR-1の100 ng/mlによるMAPK刺激のレベルに殆ど等しいレベルでMAPKリン酸化を刺激できた。

#### 【0042】

#### 実施例5

#### ヒト血漿中のCripto-1の検出

これらの実験で、38人の乳癌患者から得たヒト血漿サンプルからの200 µlアリコート、96マイクロタイターウエルプレートに加え、4 °Cで一晩インキュベートした。ヒト組換えCR-1蛋白質も、100 pg-1 µgの範囲の濃度で吸着した。2%乳溶液(Kirkegaard & Perry)で37 °C、1時間プレートをブロックし、ウサギポリクローナル抗CR-1抗体(Bicon)の1:3000希釈物と共に37 °Cで1時間インキュベートした。洗浄緩衝液(Kirkegaard & Perry)でプレートを3回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Amersham)と結合したロバ抗ウサギIgGの1:3000希釈物を37 °Cで1時間加えた。次いで、洗浄緩衝液で5回プレートを洗浄し、TMBペルオキシダーゼ基質緩衝液(Kirkegaard & Perry)100 µlをウエルに加えた。発色させるため、プレートを暗所で5分間インキュベートした。停止溶液(Kirkegaard & Perry)の添加によって反応を停止し、吸光度を450 nmで読み取った。実験は3連で行い、3回繰り返した。これらのELISA実験の結果を図6に示す。この図に示すように、CR-1は、種々の濃度でこれらのサンプルに存在していた。

#### 【0043】

上記明細書に記載した全ての刊行物及び特許は、引用により本明細書に含まれる。本発明の範囲と精神を離れること無しに、本発明の記載した方法及び系の種々の改変及びバリエーションが当業者に明白であろう。本発明を特定の好適な実施態様に関し記載してきたが

10

20

30

40

50

、特許請求した本発明は、このような特定の実施態様に不当に限定されるべきではないことを理解すべきである。実際、免疫アッセイ、分子生物学、内分泌学、及び/又は関連分野の当業者に明白である本発明の実施のための記載した態様の種々の改変は、本発明の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、( 4 - 20 % SDS - PAGE ゲル上で電気泳動し、 ) 抗 CR - 1 ウサギポリクローナル抗体でプローブした、24 個のヒト乳サンプル中の CR - 1 のウエスタンブロット分析の結果を与える。

【図 2】

図 2 は、組換え CR - 1 とブレインキュベートしたポリクローナル抗 CR - 1 抗体を用いた、ヒト乳中の CR - 1 のウエスタンブロット分析を示す。ヒト乳サンプル 1 - 9 を 4 - 20 % SDS - PAGE ゲル上で電気泳動し、組換え CR - 1 蛋白質 ( 1  $\mu$ g / ml ) と室温で 2 時間ブレインキュベートしたウサギポリクローナル抗 CR - 1 抗体の 1 : 1000 希釈物でプローブした。

【図 3】

図 3 は、ヒト乳サンプル中の CR - 1 検出の ELISA 結果を与える。これらのアッセイでは、96 マイクロタイターウエルを、200  $\mu$ l の脱脂ヒト乳サンプルで一晩コートし、2 % 乳でブロックした。パネル A は、異なる濃度の組換え CR - 1 蛋白質を用いて評価したサンプル中の CR - 1 濃度を示す結果を与える。パネル B は、ウサギポリクローナル抗 CR - 1 抗体とインキュベートしたプレートの結果を与える。

【図 4】

図 4 は、ウサギポリクローナル抗 CR - 1 抗体でプローブした、免疫精製乳由来 CR - 1 のウエスタンブロット分析の結果を与える。この実験で、ヒト組換え CR - 1 蛋白質 100 ng ( レーン 1 ) と免疫精製乳サンプル 40  $\mu$ l ( レーン 2 ) を 4 - 20 % SDS - PAGE で電気泳動し、ウエスタン分析のために転写した後、ウサギポリクローナル抗 CR - 1 抗体の 1 : 1000 希釈物でサンプルをプローブした。

【図 5】

図 5 は、ヒト乳から精製した CR - 1 によって誘導された NMuMG マウス乳腺上皮細胞での MAPK リン酸化を含む実験の SDS - PAGE 結果を与える。種々の濃度でヒト乳から免疫精製した CR - 1 の異なる濃度で、血清欠乏 NMuMG 細胞を 37 °C で 5 分間刺激した。細胞溶解物を、10 % SDS - PAGE ゲル上で電気泳動した。ウエスタン分析のために転写した後、MAPK の活性化リン酸化形態 ( p44 及び p42 ) を認識する抗ホスホ MAPK ウサギポリクローナル抗体 ( Biolab ) でサンプルをプローブした。レーン 1 は、血清欠乏細胞を含む ; レーン 2 は、rhCR - 1、100 ng / ml を含む ; レーン 3 は、乳 CR - 1、50 ng / ml を含む ; レーン 4 は、乳 CR - 1、100 ng / ml を含む ; レーン 5 は、乳 CR - 1、300 ng / ml を含む ; レーン 6 は、乳 CR - 1、500 ng / ml を含む。

【図 6】

図 6 は、28 個のヒト血漿サンプルの OD<sub>450</sub> 結果を示すグラフを与え、これはこれらのサンプル中、種々の濃度での CR - 1 の存在を示している。

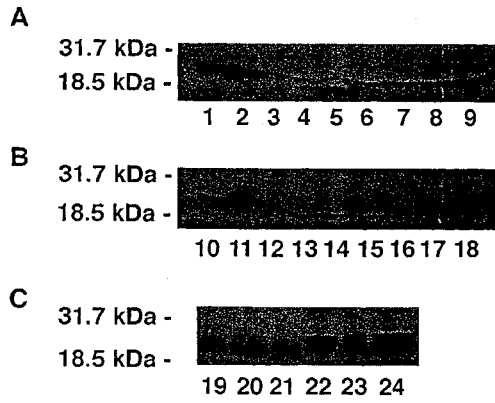
10

20

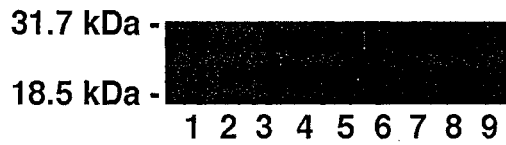
30

40

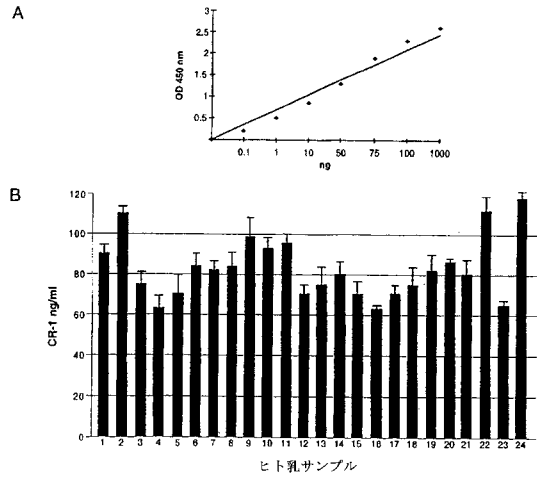
【 図 1 】



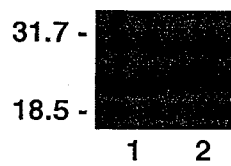
【 図 2 】



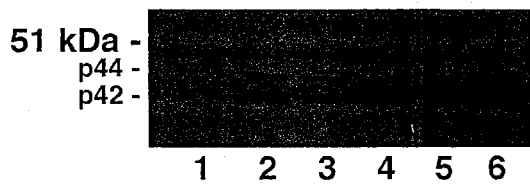
【 図 3 】



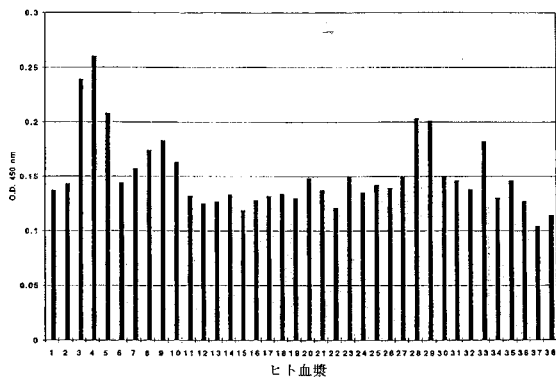
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/059620 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07K 14/47
- (74) Agent: MACKNIGHT, Kamrin, T.; Medlen & Carroll, LLP, 101 Howard Street, Suite 350, San Francisco, CA 94105 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/02225
- (22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/264,643 26 January 2001 (26.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES [US/US]; 6011 Executive Blvd., Suite 325, Rockville, MD 20852-3804 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BIANCO, Caterina [IT/US]; 10026 Simmt Drive, Bethesda, MD 20814 (US); SALOMON, David [US/US]; 12221 Eagles Nest Court, Germantown, MD 20874 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/059620 A2

(54) Title: DETECTION AND QUANTIFICATION OF CRIPTO-1

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1. In particular, the present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1 in samples such as milk, plasma, serum, and other biological fluids. In particularly preferred embodiments, the present invention finds use in the detection and/or quantification of Cripto-1 in human milk, plasma, serum, and other biological fluids.

WO 02/059620

PCT/US02/02225

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF CRIPTO-1****FIELD OF THE INVENTION**

The present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1. In particular, the present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1 in samples such as milk, plasma, serum, and other biological fluids.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

Human Cripto-1 (CR-1) is a member of a larger family of structurally related proteins, namely the EGF-CFC family that includes mouse CR-1, mouse *cryptic*, *Xenopus* FRL-1, and *zebrafish* one-eyed pinhead (*oep*) (Ciccociola *et al.*, EMBO J., 8:1987-1991 [1990]; Dono *et al.*, Develop., 118:1157-1168 [1993]; Shen *et al.*, Develop., 124:429-442 [1997]; Kinoshita *et al.*, Cell 83:621-630 [1995]; and Zhang *et al.*, Cell 92:241-251 [1997]). These proteins are characterized by the presence of a modified EGF-like domain and by a second cysteine-rich region called CFC domain (Salomon *et al.*, BioEssays 21:61-70 [1999]). They also share a conventional signal sequence and a hydrophobic C-terminus that is essential for membrane-anchorage by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) moiety (Minchiotti *et al.*, Mech. Develop., 90:133-142 [2000]). The human CR-1 and mouse CR-1 genes encode glycoproteins of 188 and 171 amino acids respectively, with molecular weights of 28 and 24 kDa, respectively (Brandt *et al.*, J. Biol. Chem., 269:17320-17328 [1994]). The EGF-CFC proteins perform an essential role during early vertebrate embryogenesis by promoting mesoderm formation and cell migration during gastrulation (Zhang *et al.*, *supra*; Gritsman *et al.*, Cell 97:121-132 [1999]; and Ding *et al.*, Nature 395:702-707 [1998]). CR-1 mRNA and immunoreactive protein are expressed in several human breast cancer cell lines, in approximately 80% of human primary breast carcinomas, and in mammary tumors that arise in mice that overexpress different transgenes in the mammary gland such as *c-neu*, transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), *int-3*, polyoma middle T gene, and SV-40 large T gene (Kenney *et al.*, Mol. Carcinogen., 15:44-56 [1996]; Qi *et al.*, Brit. J. Cancer 69:903-910 [1994]; and Dublin *et al.*, Int. J. Oncol., 7:617-622 [1995]). CR-1 can also be detected in the developing mouse mammary gland with different levels of expression

WO 02/059620

PCT/US02/02225

in the virgin, pregnant, lactating and aged mammary gland (Kenney *et al.*, Mol. Reprod. Develop., 41:277-286 [1995]). In the virgin mammary gland, CR-1 expression is found primarily in the cap stem cells of the growing terminal end buds and CR-1 expression increases several fold in ductal epithelial cells during pregnancy, lactation, and in the aged mammary gland (Kenney *et al.*, Mol. Reprod. Develop., 41:277-286 [1995]; and Herrington *et al.*, J. Cell. Physiol., 131:215-226 [1997]). In addition, CR-1 can modulate the expression of milk proteins in a mouse mammary epithelial cell line (HC-11) and in primary mouse mammary explant cultures (De Santis *et al.*, Cell Growth Different., 8:1257-1266 [1997]). However, despite the identification of CR-1 in mammary glands, its role in mammary health and disease has remained largely unknown. Thus, there remains a need in the art for methods that provide for simple detection and quantitation of Cripto-1 in various biological fluids.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1. In particular, the present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1 in samples such as milk (e.g., human milk) and other biological fluids.

The present invention provides methods for the detection of Cripto-1, comprising: providing a fluid sample suspected of containing Cripto-1, and an antibody directed against Cripto-1; exposing the fluid sample to the antibody under conditions such that the Cripto-1 and antibody bind to form an antigen-antibody complex; and detecting the antigen-antibody complex. In some preferred embodiments, the fluid sample is selected from the group consisting of milk, serum, and plasma. In still particularly preferred embodiments, the fluid sample is from a human. In further embodiments, the antibody is selected from the group consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies. In alternative preferred embodiments the method is an enzyme-linked immunosorbent assay method. In still further embodiments, the method further comprises the step of quantitating the amount of Cripto-1 in the fluid sample.

The present invention also provides methods for quantitating Cripto-1 in a fluid sample, comprising: providing a fluid sample containing Cripto-1, and an antibody directed against Cripto-1; exposing the fluid sample to the antibody under conditions such that the Cripto-1 and antibody bind to form an antigen-antibody complex; and

WO 02/059620

PCT/US02/02225

measuring the amount of antigen-antibody complex. In some preferred embodiments, the fluid sample is selected from the group consisting of milk, serum, and plasma. In some particularly preferred embodiments, the fluid sample is from a human. In further embodiments, the antibody is selected from the group consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies. In alternative preferred embodiments the method is an enzyme-linked immunosorbent assay method. In still further embodiments, the method further comprises the step of quantitating the amount of Cripto-1 in said fluid sample.

The present invention also provides methods for detecting and quantitating Cripto-1 in a sample, comprising: providing a fluid sample suspected of containing Cripto-1, and an antibody directed against said Cripto-1; exposing the fluid sample to the antibody under conditions such that the Cripto-1 and antibody bind to form an antigen-antibody complex; detecting the antigen-antibody complex; and measuring the amount of the antigen-antibody complex. In some preferred embodiments, the fluid sample is selected from the group consisting of milk, serum, and plasma. In some particularly preferred embodiments, the fluid sample is from a human. In further embodiments, the antibody is selected from the group consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies. In alternative preferred embodiments the method is an enzyme-linked immunosorbent assay method.

## 20 DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 provides results of Western blot analysis of CR-1 in 24 human milk samples (run on a 4-20% SDS-PAGE gel) and probed with an anti-CR-1 rabbit polyclonal antibody.

Figure 2 shows a Western blot analysis of CR-1 in human milk using polyclonal anti-CR-1 antibody that was pre-incubated with recombinant CR-1. Human milk samples 1-9 were run on a 4-20% SDS-PAGE gel and probed with 1:1000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody that had been preincubated with recombinant CR-1 protein (1 µg/ml) for 2 hours at room temperature.

Figure 3 provides ELISA results for detection of CR-1 in human milk samples. In these assays, 96 microtiter wells were coated overnight with 200 µl delipidated human milk samples and blocked with 2% milk. Panel A provides results showing the concentration of CR-1 in the samples was estimated using different concentrations of

WO 02/059620

PCT/US02/02225

recombinant CR-1 protein. Panel B provides results for plates incubated with rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody.

Figure 4 provides results for Western blot analyses of immunopurified milk-derived CR-1, probed with rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody. In this experiment, 100 ng of human recombinant CR-1 protein (lane 1) and 40  $\mu$ l of the immunopurified milk sample (lane 2) were run on a 4-20% SDS-PAGE gel and following transfer for Western analysis, the samples were probed with 1:1000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody.

Figure 5 provides SDS-PAGE results of experiments involving MAPK phosphorylation in NMuMG mouse mammary epithelial cells induced by CR-1 purified from human milk. Serum-starved NMuMG cells were stimulated for 5 minutes at 37°C, with different concentrations of CR-1 that had been immunopurified from human milk at various concentrations. Cell lysates were run on a 10% SDS-PAGE gel. Following transfer for Western analysis, the samples were probed with an anti-phospho MAPK rabbit polyclonal antibody (Biolab) that recognizes the activated phosphorylated forms of MAPK (p44 and p42). Lane 1 contains serum-starved cells; lane 2 contains rhCR-1, 100 ng/ml; lane 3 contains milk CR-1 50 ng/ml; lane 4 contains milk CR-1 100 ng/ml; lane 5 contains milk CR-1 300 ng/ml; and lane 6 contains milk CR-1 500 ng/ml.

Figure 6 provides a graph showing the OD<sub>450</sub> results for 28 human plasma samples, indicating the presence of CR-1 in varying concentrations in these samples.

#### DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1. In particular, the present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1 in samples such as milk, serum, plasma, and other biological fluids.

In addition to containing nutrients, vitamins and minerals, human milk also is composed of a variety of growth factors and cytokines that are thought to be important in the regulation of growth and secretory function of the mammary gland and in the regulation of growth, development and maturation of the intestinal mucosa and immune system in the newborn (Kidwell *et al.*, In Atkinson and Lonnerdal (eds), Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk, CRC Press, Boca Raton, FL [1989], pp. 77-91). Among the several growth factors identified in human milk, EGF and TGF $\alpha$  are the most

WO 02/059620

PCT/US02/02225

important mitogenic factors for normal mammary epithelium (Carpenter, Science 210:198-199 [1980]; and Okada *et al.*, Life Sci., 48:1540-1543 [1991]). In this respect, several studies have demonstrated that both EGF and TGF $\alpha$  stimulate the proliferation of human and mouse mammary epithelial cells and it is contemplated that their presence in human milk is physiologically important for mammary epithelial cell growth and differentiation (Snedeker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:1063-1069 [1991]).

Indeed, human milk contains a variety of different proteins and peptides that possess biological activity (Rodriguez-Palmero *et al.*, Clin. Perinatol., 26:355-359 [1999]). Among the many bioactive substances present in milk, are a large number of growth factors and cytokines (Grosvenor *et al.*, Endocrin. Rev., 14:710-728 [1992]). These include insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), EGF, TGF $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) and TGF- $\beta$  2, bombesin, mammary-derived growth factor I and II, colony stimulating factor, human milk growth factor I, II and III, platelet derived growth factor, hepatocyte growth factor, vascular endothelial cell growth factor, betacellulin, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), and interleukin-6 (IL-6) (Grosvenor *et al.*, Endocrin. Rev., 14:710-728 [1992]; Scamahs, Endocrin. Regul., 28:3-8 [1994]; Yamada *et al.*, Am. J. Reprod. Immunol., 40:112-120 [1998]; Bryan *et al.*, Pediatr. Res., 45:858-859 [1999]; Siafakas *et al.*, Pediatr. Res., 45:652-657 [1999]; Hawkes *et al.*, Pediatr. Res., 46:194-199 [1999]; Donnet-Hughes *et al.*, Immunol. Cell Biol., 78:74-79 [2000]; Calhoun *et al.*, Pediatr., 105:1-6 [2000]; and Dunbar *et al.*, Biochem. J., 344:713-721 [1999]).

Experiments conducted during the development of the present invention demonstrated for the first time that a member of the EGF-CFC family of peptides, CR-1, is present in human milk. As described herein, twenty four human milk samples were analyzed for the presence of CR-1 using Western blot analysis and ELISA. CR-1 protein was identified in all the samples with concentrations between 62 and 118 ng/ml. Similar concentrations have been reported for EGF in human milk (Carpenter, Science 210:198-199 [1980]; and Okada *et al.*, Life Sci., 48:1540-1543 [1991]). Unfortunately, no information was available about the time when the milk samples were collected after delivery; therefore, it was not possible to ascertain if a potential correlation might exist between the CR-1 concentration in human milk and a defined period of lactation. In this respect, several growth factors reach their highest concentrations in the colostrum, fall rapidly in the postpartum and remain constant until the end of lactation (Yamada *et al.*,

WO 02/059620

PCT/US02/02225

Am. J. Reprod. Immunol., 40:112-120 [1998]; Bryan *et al.*, *Pediatr. Res.*, 45:858-859 [1999]; and Read *et al.*, *Pediatr. Res.*, 18:133-139 [1984]). CR-1 that was purified from human milk by immunoaffinity chromatography was different in size from the human recombinant CR-1 protein, as assessed by Western blot analysis. In this respect, human  
5 CR-1 protein contains a single N-glycosylation site, five potential myristylation sites and three consensus sites for potential phosphorylation by protein kinase A and protein kinase C (Brandt *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:17320-17328 [1994]). In fact, in addition to native human and mouse CR-1 proteins of 28 and 24 kDa in size, other proteins ranging from 14 to 60 kDa which are immunologically related to mouse CR-1 have been described  
10 (Kenney *et al.*, *Mol. Carcinogen.*, 15:44-56 [1996]; and Seno *et al.*, *Growth Factors* 15:215-229 [1997]). It is contemplated that these postranslational modifications account for the difference in mobility of milk-derived CR-1 versus human recombinant CR-1 protein. However, an understanding of the mechanism(s) involved is not necessary in order to use the present invention. Finally, milk-derived CR-1 protein is biologically  
15 active since it was able to stimulate MAPK phosphorylation in NMuMG mouse mammary epithelial cells. The activation of MAPK pathway is mediated by the binding of CR-1 to a still unknown cell surface receptor (Bianco *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:8624-8629 [1999]).

It is contemplated that the presence of biologically active CR-1 in milk is  
20 physiologically significant, based upon some of the biological effects of this growth factor. For example, besides producing a mitogenic effect in mouse mammary epithelial cells through the activation of the *ras/raf*/MAPK pathway (Kannan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:3330-3335 [1997]), CR-1 can also modulate the differentiation of a mouse mammary epithelial cell line (HC-11) and primary mouse mammary explant cultures established  
25 from midpregnant mice (De Santis *et al.*, *Cell Growth Different.*, 8:1257-1266 [1997]). HC-11 cells and primary mouse mammary epithelial cells respond to the lactogenic hormones dexamethasone, insulin and prolactin (DIP) by expressing milk proteins such as  $\beta$ -casein and whey acidic protein (WAP). CR-1 is an inhibitor of  $\beta$ -casein and WAP expression in confluent HC-11 cells and in static primary mouse mammary explant  
30 cultures in response to lactogenic hormones. However, in logarithmically growing HC-11 cells, CR-1 can sensitize cells to subsequent lactogenic hormone-induced increase in  $\beta$ -casein expression (De Santis *et al.*, *Cell Growth Different.*, 8:1257-1266 [1997]). The inhibitory effect of CR-1 on  $\beta$ -casein expression in response to DIP in HC-11 cells is

WO 02/059620

PCT/US02/02225

mediated through the activation p21<sup>ras</sup>-and phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. Therefore, CR-1 has either a mitogenic or differentiation effect on mouse mammary epithelial cells depending on the signal transduction pathway that is activated. Thus, it is contemplated that CR-1 in human milk modulates two different responses.

5 During pregnancy when CR-1 expression is elevated (Kenney *et al.*, *Mol. Reprod. Develop.*, 41:277-286 [1995]; and Herrington *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 131:215-226 [1997]), it is contemplated that CR-1 exerts its mitogenic effect on the mammary epithelium, thereby stimulating proliferation and differentiation of mammary epithelial cells with the induction of milk protein expression. In contrast, during lactation when

10 cell proliferation has ceased, it is contemplated that CR-1 present in milk is important in reducing milk protein expression and therefore inhibiting differentiation and facilitating involution of the mammary gland. Indeed, this function is supported by the recent demonstration that CR-1 can induce apoptosis in confluent, survival-factor depleted HC-11 cells (De Santis *et al.*, *Cell Death Different.*, 7:189-196 [2000]). This effect is

15 mediated through an increase in the expression of a caspase-3-like protease and a downregulation in the level of Bcl-x, (De Santis *et al.*, *Cell Death Different.*, 7:189-196 [2000]). However, an understanding of the mechanism(s) is not necessary in order to use the present invention. Indeed, it is not intended that the present invention be limited to any particular mechanism(s).

20 In addition to regulating mouse mammary gland growth and morphogenesis, it has been demonstrated that CR-1 may be relevant in the pathogenesis of human breast cancer (Qi *et al.*, *Brit. J. Cancer* 69:903-910 [1994]; Dublin *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 7:617-622 [1995]; and Salomon *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19:183-232 [1995]). CR-1 expression has been detected in approximately 80% of infiltrating ductal or lobular

25 carcinomas and in 50% of ductal carcinoma *in situ* (Qi *et al.*, *Brit. J. Cancer* 69:903-910 [1994]). Interestingly, only 15% of non-involved adjacent mammary epithelium specimens were positive for CR-1 expression, indicating a role for CR-1 as potential tumor marker for this disease (Qi *et al.*, *Brit. J. Cancer* 69:903-910 [1994]). However, no significant correlations were found between CR-1 expression and various

30 clinicopathological parameters, such as tumor size, lymph node involvement, proliferative index or estrogen and progesterone receptor status (Dublin *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 7:617-622 [1995]). The data included herein, which demonstrate the presence of CR-1 in human milk, indicates that CR-1 expressed at sufficiently high enough levels by breast

WO 02/059620

PCT/US02/02225

tumors is released by cancer cells and reaches the blood circulation. Therefore, it is contemplated that detection and measurement of CR-1 levels in human serum and/or plasma will find clinical significance in the diagnosis of breast cancer. In fact, several different growth factors and cytokines have been reported to be present in the plasma or serum of human breast cancer patients and their concentrations are significantly correlated with disease progression and response to chemotherapy and endocrine therapy (Zhang *et al.*, *Anticancer Res.*, 19:1427-1432 [1999]; Taniguchi *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 1:1031-1034 [1995]; and Dorix *et al.*, *Br. J. Cancer* 76:238-243 [1997]). Indeed, experiments were conducted during the development of the present invention to detect CR-1 in human plasma of breast cancer patients.

During the development of the present invention, an evaluation was conducted to determine whether the increase in CR-1 expression that is detected in the mouse mammary gland during pregnancy and lactation is associated with the secretion of this growth factor into milk. Based on these early results, the present invention, which provides ELISA and Western blot analysis methods suitable for the detection and quantification of CR-1 in human milk and other samples was developed. As indicated herein, the methods and compositions provide the means to detect a specific band for CR-1 of 28 kDa in milk samples with concentrations between 62 and 118 ng/ml. In addition, as discussed in greater detail herein, CR-1 purified from human milk using an immunoaffinity column, was able to stimulate the phosphorylation of MAPK in NMuMG mouse mammary epithelial cells.

Twenty four samples of human milk were analyzed for CR-1 expression by Western blot analysis using a monospecific rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody. A band of 28 kDa that reacted with the rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody was identified at varying intensity in the human milk samples (See, Figure 1). All the samples expressed immunoreactive CR-1 protein but to various degrees.

To demonstrate that the band recognized by the anti-CR-1 antibody is specific, samples 1 to 9 were probed with the rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody that had been preincubated with an excess of recombinant CR-1. No bands were detected when the samples were incubated with the anti CR-1 antibody preabsorbed with the CR-1 protein, demonstrating the specificity of the band that was recognized by the anti-CR-1 antibody (Figure 2). The presence and amount of CR-1 in human milk was also assessed and quantified by ELISA. Using the recombinant CR-1 protein as a standard at different

WO 02/059620

PCT/US02/02225

concentrations, the concentration of CR-1 in the delipidated human milk samples was estimated. Figure 3, Panel A shows that the rabbit anti-CR-1 polyclonal antibody can linearly detect recombinant human CR-1 over a concentration range of 100 pg to 1µg. Immunoreactive CR-1 was present at concentrations from 62 to 118 ng/ml in the milk samples (See, Figure 3, Panel B). There was a significant correlation between the relative amounts of the 28 kDa CR-1 immunoreactive protein in the milk samples as detected by Western blot analysis and the concentration of immunoreactive CR-1 that was measured in the ELISA.

To evaluate whether CR-1 in human milk is biologically active on mammary epithelial cells, a single human milk sample with high levels of CR-1 expression as determined by Western blot analysis and ELISA (sample number 2) was chosen for purification. CR-1 was purified from delipidated human milk using an immunoaffinity column to which the anti-CR-1 rabbit polyclonal antibody was bound. After concentration, dialysis and estimation of the concentration of CR-1 as determined by Western blot analysis (Figure 4), the purified CR-1 protein was assayed for its activity on NMuMG mouse mammary epithelial cells.

It has previously been demonstrated in several mouse and human mammary epithelial cell lines that CR-1 can induce a rapid increase in the tyrosine phosphorylation of p66, p52 and p46 isoforms of Shc which can then subsequently activate a *ras/raf*/MAPK pathway as evidenced by the enhanced phosphorylation of p42 and p44 isoforms of MAPK (Kannan *et al.*, J. Biol. Chem., 272:3330-3335 [1997]). NMuMG mouse mammary epithelial cells respond to recombinant or chemically synthesized CR-1 with an increase in the phosphorylation of Shc and MAPK (Seno *et al.*, Growth Factors 15:215-229 [1998]; and Kannan *et al.*, *supra*). To ascertain whether CR-1 purified from human milk had comparable activity to recombinant CR-1, serum-starved NMuMG cells were treated with different concentrations of the immunopurified milk-derived CR-1 protein and compared to recombinant human CR-1. A dose-dependent activation of MAPK was detected following treatment of the cells with milk-derived CR-1 (See, Figure 5). Recombinant human CR-1 (100 ng/ml) was also able to stimulate MAPK phosphorylation which was nearly equivalent to the level of MAPK stimulation by 100 ng/ml of milk-derived CR-1.

WO 02/059620

PCT/US02/02225

**Definitions**

The terms "sample" and "specimen" in the present specification and claims are used in their broadest sense. In preferred embodiments, these terms encompass all types of samples obtained from humans and other animals, including but not limited to, body fluids such as urine, blood, cerebrospinal fluid (CSF), fecal matter, semen, and saliva. However, biological samples may be animal, including human, fluid or tissue, as these examples are not to be construed as limiting the sample types applicable to the present invention.

As used herein, the term "fluid sample" refers to a sample that is liquid. For example, the term encompasses bodily fluids (*e.g.*, "biological fluids"), such as milk, blood, serum, plasma, CSF, urine, semen, saliva, serous fluid, etc. It is not intended that the present invention be limited to any particular fluid.

As used herein, the term "antibody" is used in reference to any immunoglobulin molecule that reacts with a specific antigen. It is intended that the term encompass any immunoglobulin (*e.g.*, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.) obtained from any source (*e.g.*, humans, rodents, non-human primates, lagomorphs, caprines, bovines, equines, ovines, etc.).

As used herein, the term "antigen" is used in reference to any substance that is capable of reacting with an antibody. It is intended that this term encompass any antigen and "immunogen" (*i.e.*, a substance which induces the formation of antibodies). Thus, in an immunogenic reaction, antibodies are produced in response to the presence of an antigen or portion of an antigen.

As used herein, the terms "antigen fragment" and "portion of an antigen" are used in reference to a piece of an antigen. Antigen fragments or portions may occur in various sizes, ranging from a small percentage of the entire antigen to a large percentage, but not 100% of the antigen. However, in situations where "at least a portion of an antigen" is specified, it is contemplated that the entire antigen may be present. In some preferred embodiments, antigen fragments or portions comprise an "epitope" (*e.g.*, an "antigenic determinant") recognized by an antibody. In other embodiments, antigen fragments or portions are be immunogenic (*i.e.*, such fragments or portions are capable of inducing an immune response), while in other embodiments, the antigen fragments or portions are not immunogenic (*i.e.*, such fragments or portions are not capable of inducing an immune response).

WO 02/059620

PCT/US02/02225

As used herein, the term "immunoassay" is used in reference to any method in which antibodies are used in the detection of an antigen. It is contemplated that a range of immunoassay formats be encompassed by this definition, including but not limited to direct immunoassays, indirect immunoassays, and "sandwich" immunoassays." A particularly preferred format is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, it is not intended that the present invention be limited to this format. It is contemplated that other formats, including radioimmunoassays (RIA), immunofluorescent assays (IFA), and other assay formats, including, but not limited to, variations on the ELISA method will find use in the method of the present invention. Indeed, it is contemplated that other antigen-antibody reaction formats will find use in the present invention, including but not limited to "flocculation" (*i.e.*, a colloidal suspension produced upon the formation of antigen-antibody complexes), "agglutination" (*i.e.*, clumping of cells or other substances upon exposure to antibody), "particle agglutination" (*i.e.*, clumping of particles coated with antigen in the presence of antibody or the clumping of particles coated with antibody in the presence of antigen), "complement fixation" (*i.e.*, the use of complement in an antibody-antigen reaction method), and other methods commonly used in serology, immunology, immunocytochemistry, histochemistry, and related fields.

As used herein, the term "cell staining" is used in reference to methods used to label or stain cells to enhance their visualization. This staining or labelling is achieved through the use of various compounds, including but not limited to, fluorochromes, enzymes, gold, and iodine. It is contemplated that the definition encompasses such methods as "*in situ* chromogenic assays," in which a test (*i.e.*, an assay) is conducted on a sample *in situ*. It is also contemplated that the *in situ* chromogenic assay will involve the use of an immunoassay (*i.e.*, an ELISA) or immunocytochemistry. However, it is not intended that the present invention be limited to any particular assay format for cell staining.

As used herein, the term "capture antibody" refers to an antibody that is used to bind an antigen and thereby permit the recognition of the antigen by a subsequently applied antibody. For example, in some preferred embodiments, the capture antibody is bound to a microtiter well and serves to bind antigens (*e.g.*, Cripto-1) present in a sample added to the well. Another antibody (termed the "primary antibody") is then used to bind to the antigen-antibody complex, in effect to form a "sandwich" comprised of

WO 02/059620

PCT/US02/02225

antibody-antigen-antibody. Detection of this complex can be performed by several methods. In some particularly preferred embodiments, the primary antibody is prepared with a label such as biotin, an enzyme, a fluorescent marker, or radioactivity, and is detected directly using this label. Alternatively, a labelled "secondary antibody" or  
5 "reporter antibody" which recognizes the primary antibody is added, forming a complex comprised of antibody-antigen-antibody-antibody. Again, appropriate reporter reagents are then added to detect the labelled antibody. In other embodiments, any number of additional antibodies are added as desired. In some embodiments, these antibodies are also be labelled with a marker, including, but not limited to an enzyme, fluorescent  
10 marker, or radioactivity.

As used herein, the term "reporter reagent" or "reporter molecule" is used in reference to compounds which are capable of detecting the presence of antibody bound to antigen. For example, in preferred embodiments, a reporter reagent is a colorimetric substance which is attached to an enzymatic substrate. Upon binding of antibody and  
15 antigen, the enzyme acts on its substrate and causes the production of a color. Other reporter reagents include, but are not limited to fluorogenic, chromogenic, luminogenic, and radioactive compounds or molecules. This definition also encompasses the use of biotin and avidin-based compounds (*e.g.*, including compounds but not limited to neutravidin and streptavidin) as part of the detection system. In one embodiment of the  
20 present invention, biotinylated antibodies are used in conjunction with avidin-coated solid support.

As used herein the term "signal" is used in reference to an indicator that a reaction has occurred, for example, binding of antibody to antigen. It is contemplated that signals in the form of radioactivity, fluorogenic reactions, and enzymatic reactions  
25 will be used with the present invention. However, it is not intended that the present invention be limited to any particular signal. In some embodiments, the signal is assessed quantitatively and/or qualitatively.

As used herein, the term "amplifier" is used in reference to a system which enhances the signal in a test method such as an ELISA. However, it is not intended that  
30 the present invention be limited to the use of amplifiers in any particular assays system or format.

WO 02/059620

PCT/US02/02225

As used herein, the term "solid support" is used in reference to any solid material suitable for the attachment of various reagents such as antibodies, antigens, and/or other compounds. For example, in the ELISA method, wells of microtiter plates often provide solid supports. Other examples of solid supports include microscope slides, coverslips, beads, particles, cell culture flasks, as well as many other items.

As used herein, the term "kit" is used in reference to a combination of reagents and other materials. In preferred embodiments, the kits of the present invention comprise microtiter plates, buffers, labelled antibodies, positive and negative controls, instruction manuals for users, etc. It is not intended that the kits of the present invention be limited to any particular components, reagents, etc. Indeed, it is intended that various kit formats will find use with the present invention.

#### EXPERIMENTAL

The following examples are provided in order to demonstrate and further illustrate certain preferred embodiments and aspects of the present invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

In the experimental disclosure which follows, the following abbreviations apply: °C (degrees Centigrade); rpm (revolutions per minute); BSA (bovine serum albumin); CFA (complete Freund's adjuvant); IFA (incomplete Freund's adjuvant); IgG (immunoglobulin G); IM (intramuscular); IP (intraperitoneal); IV (intravenous or intravascular); SC (subcutaneous); H<sub>2</sub>O (water); HCl (hydrochloric acid); aa (amino acid); bp (base pair); kb (kilobase pair); kD (kilodaltons); gm (grams); µg (micrograms); mg (milligrams); ng (nanograms); µl (microliters); ml (milliliters); mm (millimeters); nm (nanometers); µm (micrometer); M (molar); mM (millimolar); µM (micromolar); U (units); V (volts); MW (molecular weight); sec (seconds); min(s) (minute/minutes); hr(s) (hour/hours); MgCl<sub>2</sub> (magnesium chloride); NaCl (sodium chloride); OD<sub>280</sub> (optical density at 280 nm); OD<sub>600</sub> (optical density at 600 nm); PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis); PBS (phosphate buffered saline [150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2]); PCR (polymerase chain reaction); PEG (polyethylene glycol); PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride); RT-PCR (reverse transcription PCR); SDS (sodium dodecyl sulfate); Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane); w/v (weight to volume); v/v (volume to volume); Amersham (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL); Pierce (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); ICN (ICN Pharmaceuticals,

WO 02/059620

PCT/US02/02225

Inc., Costa Mesa, CA); Amicon (Amicon, Inc., Beverly, MA); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Kirkegaard & Perry (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD); BioRad (BioRad, Richmond, CA); GIBCO BRL or Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); New England Biolabs (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); Pharmacia (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ); and Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

In these experiments, the human milk samples used were obtained from 24 healthy women. Data regarding the time when these samples were collected after delivery were not available. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min and the aqueous layer of the milk was collected after removing the lipid layer.

NMuMG normal mouse mammary epithelial cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum. Recombinant human CR-1 (rhCR-1) protein was expressed in *E. coli* and purified as known in the art (See, Seno *et al.*, Growth Factors 15:215-229 [1998]).

15

#### EXAMPLE 1

##### Western Blot Analysis

In these experiments, 40  $\mu$ l of delipidated human milk samples were loaded on a 4-20% SDS-PAGE gel and run under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins on the gel were transferred to PVDF membrane and blocked with 5% dry milk in 20 mM Tris-buffered saline with 0.05% TWEEN®-20 surfactant. The membranes were incubated overnight at 4° C with 1:1000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody (Biocon). One membrane was probed with 1:1000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody that had been preincubated with human recombinant CR-1 (1 $\mu$ g/ml) for 2 hr at room temperature. The bound rabbit antibody was detected using 1:2000 dilution of a goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Amersham) and immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham).

As shown in Figure 1, a band of 28 kDa reacting with the rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody was identified at varying intensity in the human milk samples. All of the samples tested expressed immunoreactive CR-1 protein but to various degrees.

To demonstrate that the band recognized by the anti-CR-1 antibody is specific, samples 1 to 9 were probed with the rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody that had been preincubated with an excess of recombinant CR-1. No bands were detected when the

WO 02/059620

PCT/US02/02225

samples were incubated with the anti CR-1 antibody preabsorbed with the CR-1 protein, demonstrating the specificity of the band that was recognized by the anti-CR-1 antibody (Figure 2). The presence and amount of CR-1 in human milk was also assessed and quantified by ELISA, as described below in Example 2.

5

**EXAMPLE 2****Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

In these experiments, 200  $\mu$ l of each delipidated milk sample were added to 96 microtiter well plates and incubated overnight at 4°C. Human recombinant CR-1 protein was also absorbed at concentrations ranging from 100 pg to 1  $\mu$ g. The plates were blocked with 2 % milk (Kirkergaard & Perry) for 1 hr at 37°C and incubated with 1:3000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody (Biocon) for 1 hr at 37°C. After washing the plates 3 times with washing buffer (Kirkergaard & Perry), 1:3000 dilution of donkey anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Amersham) was added and incubated for 1 hr at 37°C. The plates were then washed five times with washing buffer and 100  $\mu$ l of TMB peroxidase substrate buffer (Kirkergaard & Perry) were added to the wells. To allow for color development, the plates were incubated in the dark for 5 min. The reaction was stopped by the addition of stop solution (Kirkergaard & Perry) and the absorbance was read at 450 nm. The experiment was performed in triplicate and repeated three times.

20 Results of some ELISA experiments are shown in Figure 3. Figure 3, Panel A provides results for plates in which the concentration of CR-1 in the samples was estimated using different concentrations of recombinant CR-1 protein. This Figure shows that the rabbit anti-CR-1 polyclonal antibody can linearly detect recombinant human CR-1 over a concentration range of 100 pg to 1 $\mu$ g. In addition, as indicated in Figure 3, 25 Panel B, immunoreactive CR-1 was present at concentrations from 62 to 118 ng/ml in the milk samples. There was a significant correlation between the relative amounts of the 28 kDa CR-1 immunoreactive protein in the milk samples as detected by Western blot analysis (as described in Example 1) and the concentration of immunoreactive CR-1 that was measured in the ELISA described in this Example.

WO 02/059620

PCT/US02/02225

**EXAMPLE 3****Immunopurification of CR-1 Protein from Human Milk**

CR-1 protein from human milk was purified using an AMINOLINK® Plus immobilization kit (Pierce), as per the manufacturer's instructions. Briefly, rabbit polyclonal anti-CR-1 IgG was coupled to AMINOLINK® Plus coupling gel using a pH 10 coupling buffer containing 0.1 M sodium citrate and 0.05 M sodium carbonate. The anti-CR-1 antibody-coupled column was then used for affinity purification of CR-1 from delipidated human milk. Human milk sample number 2, because of its high CR-1 levels as detected by Western blot (See Example 1) and by ELISA (See, Example 2), was chosen for purification.

Five ml of human milk were applied to the column and incubated for 1 hr at room temperature. After washing with PBS, the bound CR-1 protein was eluted in several fractions with 0.1 M glycine pH 2.5, and neutralized with 1 M Tris pH 9.5. The fractions containing the protein were pooled, concentrated with a CENTRICON® 10 (Amicon) concentrator and dialyzed against PBS. The concentration of the purified protein was estimated by Western blot using known concentrations of recombinant human CR-1 as a reference, as described in Example 1. In this Western blot, 100 ng of human recombinant CR-1 protein (lane 1) and 40 µl of the immunopurified milk sample (lane 2) were run on a 4-20% SDS-PAGE gel and probed with 1:1000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody. The results are shown in Figure 4.

**EXAMPLE 4****Bioassay of Milk-Derived CR-1 Protein**

To test the activity of purified CR-1 protein from human milk, NMuMG mouse mammary epithelial cells were seeded in 100 mm plates and were grown until they reached 70-80% confluence. The cells were then switched to serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing human transferrin (10 µg/ml) and type IV Pedersen fetuin (1 mg/ml) for 24 hr. Cells were stimulated for 5 min at 37°C with recombinant human CR-1 protein at 100 ng/ml or CR-1 that was purified from human milk by immunoaffinity chromatography as described in Example 2). The cells were lysed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 1 mM

WO 02/059620

PCT/US02/02225

phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, and 20 mM sodium fluoride.

Crude protein lysates (30 µg/sample) were run on a 10% SDS-PAGE gel, transferred to PVDF membrane, blocked in a solution prepared from 5% dry milk (See, Example 1) and incubated with a 1:1000 dilution of a rabbit polyclonal anti-phospho MAPK antibody (Biolab). After incubation with a goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Amersham), the immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham).

Figure 5 provides results for cell lysates were run on a 10% SDS-PAGE gel and probed with an anti-phospho MAPK rabbit polyclonal antibody (Biolab) that recognizes the activated phosphorylated forms of MAPK (p44 and p42). In this Figure, Lane 1 contains serum-starved cells; lane 2 contains rhCR-1 (100 ng/ml); lane 3 contains milk CR-1 (50 ng/ml); lane 4 contains milk CR-1 (100 ng/ml); lane 5 contains milk CR-1 (300 ng/ml); and lane 6 contains milk CR-1 (500 ng/ml).

As indicated in Figure 5, a dose-dependent activation of MAPK was detected following treatment of the cells with milk-derived CR-1. Recombinant human CR-1 (100 ng/ml) was also able to stimulate MAPK phosphorylation at a level that was nearly equivalent to the level of MAPK stimulation by 100 ng/ml of milk-derived CR-1.

#### EXAMPLE 5

##### Detection of Cripto-1 in Human Plasma

In these experiments, 200 µl aliquots from human plasma samples obtained from 38 breast cancer patients were added to 96 microtiter well plates and incubated overnight at 4°C. Human recombinant CR-1 protein was also absorbed at concentrations ranging from 100 pg to 1 µg. The plates were blocked with 2% milk solution (Kirkegaard & Perry) for 1 hr at 37°C, and incubated with 1:3000 dilution of rabbit polyclonal anti-CR-1 antibody (Biocon) for 1 hr at 37°C. After washing the plates 3 times with washing buffer (Kirkegaard & Perry), 1:3000 dilution of donkey anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Amersham) was added for 1 hr at 37°C. The plates were then washed five times with washing buffer and 100 µl of TMB peroxidase substrate buffer (Kirkegaard & Perry) was added to the wells. To allow for color development, the plates were incubated in the dark for 5 min. The reaction was stopped by the addition of stop solution (Kirkegaard & Perry) and the absorbance was read at 450 nm. The

WO 02/059620

PCT/US02/02225

experiment was performed in triplicate and repeated three times. Results of these ELISA experiments are shown in Figure 6. As indicated in this Figure, CR-1 was present in these samples at varying concentrations.

All publications and patents mentioned in the above specification are herein  
5 incorporated by reference. Various modifications and variations of the described method and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed,  
10 various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in the art of immunoassays, molecular biology, endocrinology, and/or related fields are intended to be within the scope of the present invention.

WO 02/059620

PCT/US02/02225

## CLAIMS

We claim:

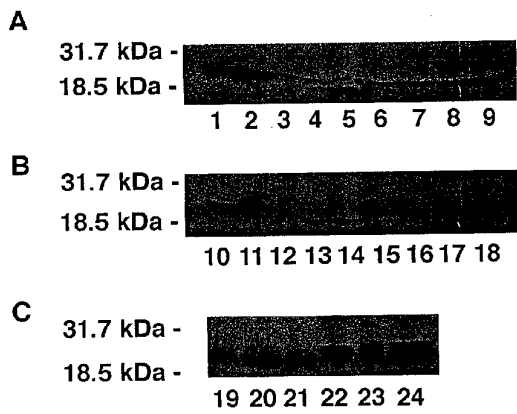
1. A method for detection of Cripto-1 in a sample, comprising:
  - a) providing:
    - 5 i) a fluid sample suspected of containing Cripto-1,
    - ii) an antibody directed against said Cripto-1;
  - b) exposing said fluid sample to said antibody under conditions such that said Cripto-1 and antibody bind to form an antigen-antibody complex; and
  - c) detecting said antigen-antibody complex.
- 10 2. The method of Claim 1, wherein said fluid sample is selected from the group consisting of milk, serum, and plasma.
3. The method of Claim 1, wherein said fluid sample is from a human.
4. The method of Claim 1, wherein said antibody is selected from the group consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies.
- 15 5. The method of Claim 1, wherein said method is an enzyme-linked immunosorbent assay.
6. The method of Claim 1, further comprising the step of quantitating said Cripto-1 in said fluid sample.
7. A method for quantitating Cripto-1 in a sample, comprising:
  - 20 a) providing:
    - i) a fluid sample containing Cripto-1,
    - ii) an antibody directed against said Cripto-1;
  - b) exposing said fluid sample to said antibody under conditions such that said Cripto-1 and antibody bind to form an antigen-antibody complex; and
  - 25 c) measuring the amount of said antigen-antibody complex.

WO 02/059620

PCT/US02/02225

8. The method of Claim 7, wherein said fluid sample is selected from the group consisting of milk, serum, and plasma.
9. The method of Claim 7, wherein said fluid sample is from a human.
10. The method of Claim 7, wherein said antibody is selected from the group  
5 consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies.
11. The method of Claim 7, wherein said method is an enzyme-linked immunosorbent assay.
12. A method for detecting and quantitating Cripto-1 in a sample, comprising:  
a) providing:  
10 i) a fluid sample suspected of containing Cripto-1,  
ii) an antibody directed against said Cripto-1;  
b) exposing said fluid sample to said antibody under conditions such that said Cripto-1 and antibody bind to form an antigen-antibody complex;  
c) detecting said antigen-antibody complex; and  
15 d) measuring the amount of said antigen-antibody complex.
13. The method of Claim 12, wherein said fluid sample is selected from the group consisting of milk, serum, and plasma.
14. The method of Claim 12, wherein said fluid sample is from a human.
15. The method of Claim 12, wherein said antibody is selected from the group  
20 consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies.
16. The method of Claim 12, wherein said method is an enzyme-linked immunosorbent assay method.

FIGURE 1



WO 02/059620

PCT/US02/02225

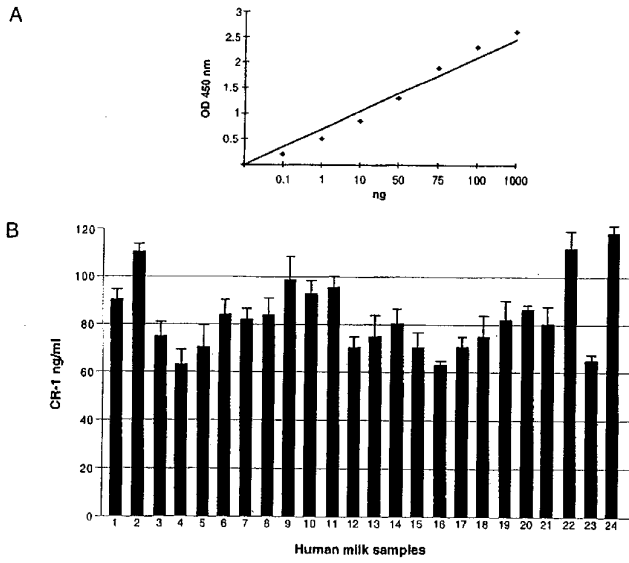
FIGURE 2



WO 02/059620

PCT/US02/02225

FIGURE 3



WO 02/059620

PCT/US02/02225

FIGURE 4

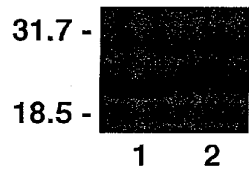
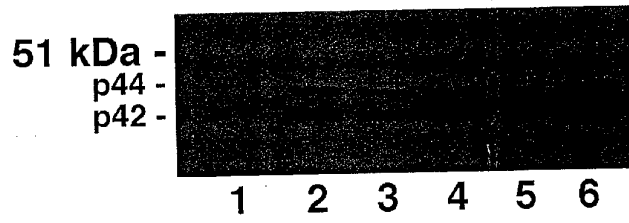


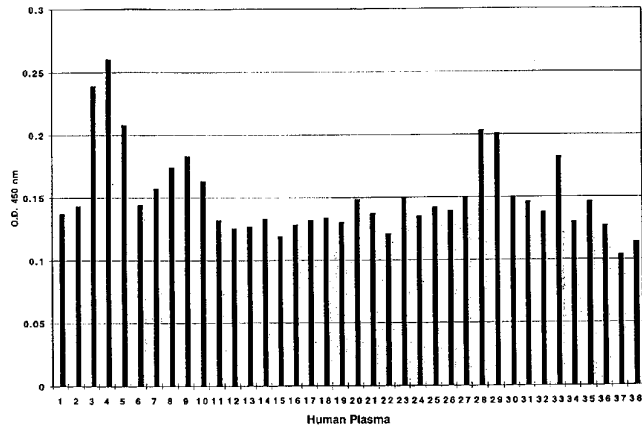
FIGURE 5



WO 02/059620

PCT/US02/02225

FIGURE 6



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 August 2002 (01.08.2002)

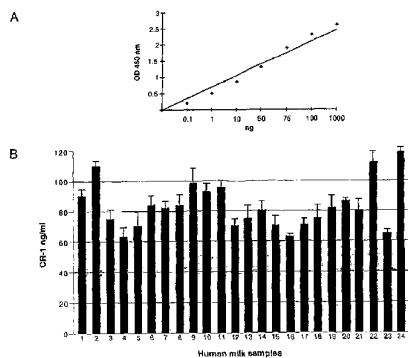
PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/059620 A3

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: G01N 33/68, C07K 14/47
- (21) International Application Number: PCT/US02/02225
- (22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/264,643 26 January 2001 (26.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES [US/US]; 601 Executive Blvd., Suite 325, Rockville, MD 20852-3804 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BIANCO, Caterina
- [I]/[US]; 10026 Sinnott Drive, Bethesda, MD 20814 (US). SALOMON, David [US/US]; 12221 Eagles Nest Court, Germantown, MD 20874 (US).
- (74) Agent: LARCHER, Carol; LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD., Two Prudential Plaza, suite 4900, 180 North Steison, Chicago, Illinois 60601-6780 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CF, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: DETECTION AND QUANTIFICATION OF CRIPTO-1



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1. In particular, the present invention provides methods and compositions for the detection and quantification of Cripto-1 in samples such as milk, plasma, serum, and other biological fluids. In particularly preferred embodiments, the present invention finds use in the detection and/or quantification of Cripto-1 in human milk, plasma, serum, and other biological fluids.



WO 02/059620 A3

**WO 02/059620 A3** 

**Published:**  
— with international search report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

**(88) Date of publication of the international search report:**  
27 March 2003

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor's Application No. PCT/US 02/02225
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/74		
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 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 792 616 A (PERSICO MARIA G ET AL) 11 August 1998 (1998-08-11) column 5, paragraph 3; claims 1-4 --- -/-	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when this document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 December 2002		Date of mailing of the international search report 03/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 PV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vanmontfort, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 02/02225

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRANDT R ET AL: "IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AN EPIDERMAL GROWTH FACTOR-RELATED PROTEIN: CRIPTO-1" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 269, no. 25, 24 June 1994 (1994-06-24), pages 17320-17328, XP000910201 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 17322, column 1, paragraph 5 -column 2, paragraph 3 page 17321, column 2, paragraph 2	1-16
A	US 5 854 399 A (PERSICA MARIA G ET AL) 29 December 1998 (1998-12-29) column 5, paragraphs 3,4	1-16
P,X	BIANCO CATERINA ET AL: "Identification of Cripto-1 in human milk." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 66, no. 1, March 2001 (2001-03), pages 1-7, XP009002946 ISSN: 0167-6806 abstract; figure 2 page 3, left-hand column, paragraph 2	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 02/02225

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication date	
US 5792616	A	11-08-1998	US 5654140 A	05-08-1997
			US 5256643 A	26-10-1993
US 5854399	A	29-12-1998	US 5620866 A	15-04-1997
			US 5264557 A	23-11-1993
			US 5650285 A	22-07-1997

---

フロントページの続き

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

(72) 発明者 サロモン、デイヴィッド

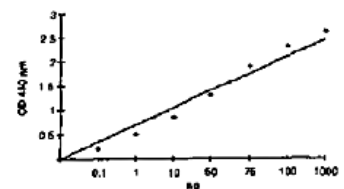
アメリカ合衆国、メリーランド州 20874、ジャーマンタウン、イーグルス ネスト コート  
12221

专利名称(译)	检测和定量CRIPTO-1		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005504262A</a>	公开(公告)日	2005-02-10
申请号	JP2002559686	申请日	2002-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	ビアンコキャテリーナ サロモンデイヴィッド		
发明人	ビアンコ、キャテリーナ サロモン、デイヴィッド		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6872 G01N33/6854 G01N2333/485		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	60/264643 2001-01-26 US		
其他公开文献	JP3821779B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于检测和定量Cripto-1的方法和组合物。特别地，本发明提供了用于检测和定量样品中的Cripto-1的方法和组合物，所述样品例如牛奶，血浆，血清和其他生物流体。在特别优选的实施方案中，本发明可用于检测和/或定量人乳，血浆，血清和其他生物体液中的Cripto-1。

A



B

