

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3821779号
(P3821779)

(45) 発行日 平成18年9月13日(2006.9.13)

(24) 登録日 平成18年6月30日(2006.6.30)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

D

請求項の数 11 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2002-559686 (P2002-559686)	(73) 特許権者	503265186
(86) (22) 出願日	平成14年1月23日(2002.1.23)		アメリカ合衆国
(65) 公表番号	特表2005-504262 (P2005-504262A)		アメリカ合衆国、メリーランド州 208
(43) 公表日	平成17年2月10日(2005.2.10)		52-3804、ロックヴィル、スウィー
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/002225		ト 325、エグゼキュティブ ブルヴァ
(87) 国際公開番号	W02002/059620		ード 6011
(87) 国際公開日	平成14年8月1日(2002.8.1)	(74) 代理人	100080791
審査請求日	平成16年10月18日(2004.10.18)		弁理士 高島 一
(31) 優先権主張番号	60/264,643	(72) 発明者	ピアノコ、キャテリーナ
(32) 優先日	平成13年1月26日(2001.1.26)		アメリカ合衆国、メリーランド州 208
(33) 優先権主張国	米国 (US)		14、ベセスダ、シンノット ドライブ
			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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体液サンプル中の 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 体液 サンプル、
 ii) 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、体
液 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。

【請求項2】

体液 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3】

体液 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 体液 サンプル、
 ii) 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、体
液 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。

【請求項 4】

体液サンプル中の 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 体液サンプル、

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、体液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；
を含む方法。

10

【請求項 5】

体液サンプルが、乳である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。

【請求項 6】

体液サンプルが、血清である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。

【請求項 7】

体液サンプルが、血漿である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。

【請求項 8】

体液サンプルがヒト由来である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。

20

【請求項 9】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 から 8 の何れかに記載の方法。

【請求項 10】

抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 1 から 8 の何れかに記載の方法。

【請求項 11】

酵素結合免疫吸着アッセイの使用を含む、請求項 1 から 10 の何れかに記載の方法。

【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。

30

【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 : 1987 - 1991 [1090] ; D o n o ら , D e v e l o p . , 118 : 1157 - 1168 [1993] ; S h e n ら , D e v e l o p . , 124 : 429 - 442 [1997] ; K i n o s h i t a ら , C e l l 83 : 621 - 630 [1995] ; 及び、Z h a n g ら , C e l l 92 : 241 - 251 [1997]) 。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 21 : 61 - 70 [1999]) 。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 . , 90 : 133 - 142 [2000]) 。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 28 k D a と 24 k D a 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 . , 26

40

50

9 : 17320 - 17328 [1994])。EGF - CFC蛋白質は、囊胚形成期に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(Zhangら, 上記; Gritsmanら, Cell 97: 121 - 132 [1999]; 及び、Dingら, Nature 395: 702 - 707 [1998])。CR - 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 - neu, 形質転換成長因子 α (TGF α), int - 3, ポリオーマミドルT遺伝子、及びSV - 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(Kennedyら, Mol. Carcinogen., 15: 44 - 56 [1996]; Qiら, Brit. J. Cancer 69: 903 - 910 [1994]; 10 及び、Dublinら, Int. J. Oncol., 7: 617 - 622 [1995])。CR - 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(Kennedyら, Mol. Reprod. Develop., 41: 277 - 286 [1995])。処女乳腺では、増殖中の終末芽のcap幹細胞で主に見出され、CR - 1発現は、妊娠、乳分泌の間、及び老齢の乳腺において、腺管上皮細胞で数倍増加する(Kennedy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 20 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、種々の生物学的液体中のC r i p t o - 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】

(発明の要旨)

本発明は、体液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(例えば、ヒト乳)、及び他の生物学的液体などの体液サンプル中の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。

本発明は、C r i p t o - 1の検出方法であって、C r i p t o - 1を含有すると疑われる体液サンプル及びC r i p t o - 1に対する抗体を用意すること; 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、体液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、体液サンプルは、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、体液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、体液サンプル中のC r i p t o - 1量を定量する工程を更に含む。 30

【0004】

本発明はまた、体液サンプル中のC r i p t o - 1の定量方法であって、C r i p t o - 1を含有する体液サンプル、及びC r i p t o - 1に対する抗体を用意すること; 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、体液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、体液サンプルは、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、体液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、体液サンプル中のC r i p t o - 1量を定量する工程を更に含む。 40

【0005】

本発明はまた、体液サンプル中のC r i p t o - 1の検出及び定量の方法であって、C r i p t o - 1を含有すると疑われる体液サンプル、及びC r i p t o - 1に対する抗体を用意すること；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、体液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、体液サンプルは、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、体液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。

【0006】

10

(発明の説明)

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、血清、血漿、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。

【0007】

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 α 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 α 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(Snedecckerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88: 1063-1069 [1991])。

20

【0008】

30

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 α 、形質転換成長因子 β 1(TGF- β 1)及びTGF- β 2、ボンベシン、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(GSF)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、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

40

50

., 344: 713-721 [1999]).

【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、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28 kDaと24 kDa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14-60 kDa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])。

【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])。β-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β-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、β-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β-カゼイン発現に対するCR-1の阻害効果は、p21^{ras}-及びホスファチジルイノシトール3

10

20

30

40

50

’ - 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 (Kennedy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 - x₁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 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、ヒト乳癌の病因に関係す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、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

10

20

30

40

50

- 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28kDa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、ELISA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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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）。

【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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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、C r i p t o - 1）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。

10

【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（n e u t r a v i d i n）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。

20

【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。

30

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「増幅体」は、E L I S A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。

【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、E L I S A法では、マイクロタイタープレートのウエ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。

40

【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。

【0030】

50

(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。

(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); H₂O (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 (10 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); MgCl₂ (塩化マグネシウム); NaCl (塩化ナトリウム); OD₂₈₀ (280 nmでの光学密度); OD₆₀₀ (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 (ポリメラーゼ連鎖反応); 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 20); 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); Kirkergaard & Perry (Kirkergaard & 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)。

【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 (Senora, Growth Factors 15: 215-229 [1998] 参照)。

【0033】

実施例 1

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 (50

B i o c o n) の 1 : 1 0 0 0 希釈物と 4 で一晩インキュベートした。ヒト組換え C R - 1 (1 μ g / m l) 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 C R - 1 抗体の 1 : 1 0 0 0 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 I g G の 1 : 2 0 0 0 希釈物を用いて、結合したウサギ抗体を検出し (A m e r s h a m) 、免疫反応性バンドを、増強化学発光 (e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n c e) によって検出した (A m e r s h a m) 。

【 0 0 3 4 】

図 1 に示すように、ウサギポリクローナル抗 C R - 1 抗体と反応する 2 8 k D a 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 C R - 1 蛋白質を発現した。

抗 C R - 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 C R - 1 とブレインキュベートしたウサギポリクローナル抗 C R - 1 抗体でサンプル 1 - 9 をプローブした。C R - 1 蛋白質で予め吸着した抗 C R - 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 C R - 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 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 μ 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 μ 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 希釈物に加え、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 μ 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 μ 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。

【0037】

ヒト乳5mlをカラムに適用し、室温で1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、結合したCR-1蛋白質を、0.1MグリシンpH2.5で数画分に溶出し、1M Tris pH9.5で中和した。該蛋白質含有画分をプールし、CENTRICON（登録商標）10（Amicon）濃縮器で濃縮し、PBS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CR-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CR-1蛋白質100ng（レーン1）と免疫精製乳サンプル40μl（レーン2）を、4-20%SDS-PAGEゲル上で電気泳動し、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。結果を図4に示す。

10

【0038】

実施例4乳由来CR-1蛋白質のバイオアッセイ

ヒト乳由来の精製CR-1蛋白質の活性を試験するために、100mmプレートにNMuMGマウス乳腺上皮細胞を播種し、70-80%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（10μg/ml）とIV型ペダーセンフェツイン（1mg/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100ng/ml、又は実施例2に記載の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したCR-1で、細胞を37℃で5分間刺激した。20mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5%デオキシコレート, 5mM MgCl₂, 2μg/mlアプロチニン, 2μg/mlロイペプチン, 1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド, 1mMオルトパナジン酸ナトリウム, 及び20mM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。

20

【0039】

粗蛋白質溶解物（30μg/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）。

30

【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（100ng/ml）を含む；レーン3は、乳CR-1（50ng/ml）を含む；レーン4は、乳CR-1（100ng/ml）を含む；レーン5は、乳CR-1（300ng/ml）を含む；レーン6は、乳CR-1（500ng/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（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レベルでMAPKリン酸化を刺激できた。

40

【0042】

実施例5ヒト血漿中のCrip1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200μl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℃で一晩インキュベートした。ヒト組換えCR-1蛋白質も、100pg-1μgの範囲の濃度で吸着した。2%乳溶液（

50

Kirkergaard & Perry) で 37、1 時間プレートブロックし、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 で 1 時間インキュベートした。洗浄緩衝液 (Kirkergaard & 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 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 (Kirkergaard & Perry) 100 μ l 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 (Kirkergaard & 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、

10

【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、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】

20

【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 μ 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 μ 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。

30

【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 μ 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。

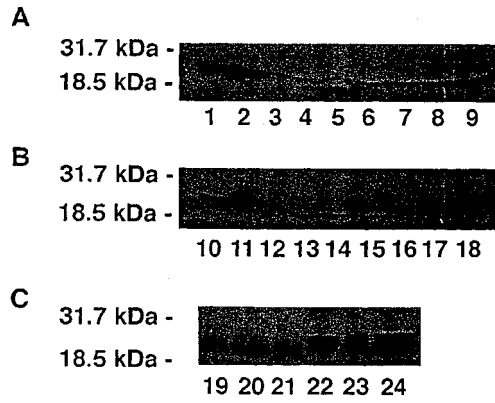
【図 5】 図 5 は、ヒト乳から精製した CR - 1 によって誘導された NMuMG マウス乳腺上皮細胞での MAPK リン酸化を含む実験の SDS - PAGE 結果を与える。種々の濃度でヒト乳から免疫精製した CR - 1 の異なる濃度で、血清欠乏 NMuMG 細胞を 37 で 5 分間刺激した。細胞溶解物を、10 % SDS - PAGE ゲル上で電気泳動した。ウエスタン分析のために転写した後、MAPK の活性化リン酸化形態 (p44 及び p42) を認識する抗ホスホ MAPK ウサギポリクローナル抗体 (Biolab) でサンプルをプローブした。レーン 1 は、血清欠乏細胞を含む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

40

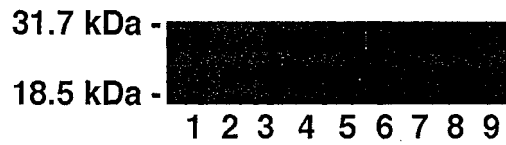
【図 6】 図 6 は、28 個のヒト血漿サンプルの OD₄₅₀ 結果を示すグラフを与え、これはこれらのサンプル中、種々の濃度での CR - 1 の存在を示している。

50

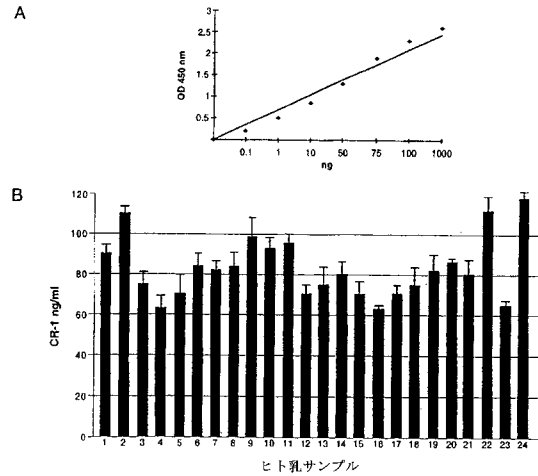
【 図 1 】



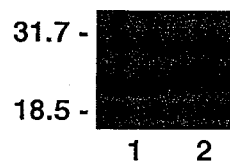
【 図 2 】



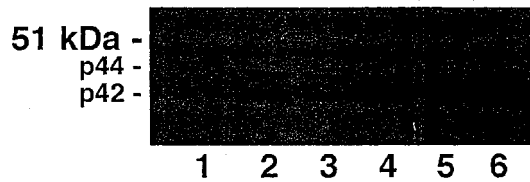
【 図 3 】



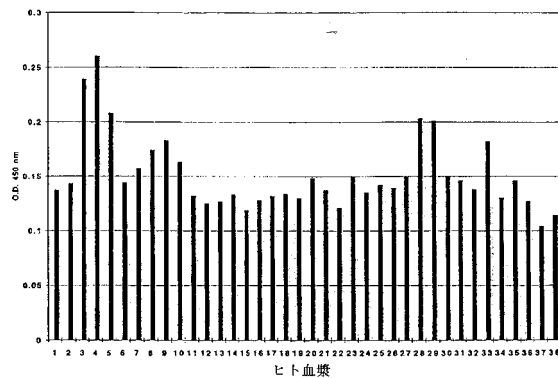
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(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

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 米国特許第05256643(US,A)

米国特許第05792616(US,A)

The Journal of Biological Chemistry, 1994年, Vol.269, No.25, p17320-17328

BJU Int., 2000年, Vol.86, No.7, p894-900

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

MEDLINE(STN)

专利名称(译)	检测和定量CRIPTO-1		
公开(公告)号	JP3821779B2	公开(公告)日	2006-09-13
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		
当前申请(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		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	60/264643 2001-01-26 US		
其他公开文献	JP2005504262A		
外部链接	Espacenet		

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。

【図 6】

