

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7015294号
(P7015294)

(45)発行日 令和4年3月4日(2022.3.4)

(24)登録日 令和4年1月25日(2022.1.25)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/574

A Z N A

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

G 0 1 N 33/543

5 4 5 A

C 0 7 K 16/40 (2006.01)

C 0 7 K 16/40

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/12

請求項の数 15 (全32頁)

(21)出願番号 特願2019-505376(P2019-505376)

(86)(22)出願日 平成29年8月9日(2017.8.9)

(65)公表番号 特表2019-532260(P2019-532260
A)

(43)公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(86)国際出願番号 PCT/SE2017/050806

(87)国際公開番号 WO2018/030946

(87)国際公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

審査請求日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(31)優先権主張番号 62/373,262

(32)優先日 平成28年8月10日(2016.8.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 519033535

アラートイクス ヴェテリナリー ダイア

グノスティクス エービー

スウェーデン国, 3 9 4 7 7 カルマル
, クニパデヴァーゲン 2 5

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 エリクソン, スタファン

スウェーデン国, 1 8 1 4 6 リディン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質レベルの決定

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の非ヒト哺乳動物チミジンキナーゼ 1 (T K 1) タンパク質のレベルを決定するためのキットであって、

支持体に固定化されたまたは前記支持体に固定化されることが意図された第 1 の抗体と、第 2 の抗体であって、前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体の一方が非ヒト哺乳動物 T K 1 の C 末端領域由来の第 1 のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有しかつ前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体の他方が T K 1 の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する、第 2 の抗体、

を含むキットであって、

前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質がイヌ T K 1 タンパク質、ネコ T K 1 タンパク質およびウマ T K 1 タンパク質からなる群から選択され、

前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体のうち一方が配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有し、

前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体のうち他方が配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有することを特徴とする、

キット。

【請求項 2】

前記キットがサンドイッチアッセイキットである、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

前記キットが酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）キットである、請求項 1 または請求項 2 に記載のキット。

【請求項 4】

前記第 2 の抗体が共有結合されるビオチンまたは共有結合されるストレプトアビジンもしくはアビジンを有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5】

西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、標識されたストレプトアビジンもしくはアビジンまたは H R P 標識されたビオチンと、
3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン（T M B）基質、3, 3' - ジアミノベンジジン（D A B）基質および 2, 2' - アジノ - ビス（3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸）（A B T S）基質からなる群から選択される H R P 基質と
を更に含む、請求項 4 に記載のキット。

10

【請求項 6】

前記支持体としてマイクロタイタープレートを更に含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7】

前記支持体としてアガロースビーズまたは磁気ビーズを更に含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8】

前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質がイヌ T K 1 タンパク質である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 9】

サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定するための方法であって、前記サンプルを請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載のキットの前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体と接触させることと、
結合した第 2 の抗体の量を検出することと
を含む、方法。

【請求項 10】

前記結合された第二の抗体の前記検出された量に基づいて前記サンプル中の前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することを更に含む、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

非ヒト哺乳動物被験体における腫瘍疾患の再発の可能性を推定するための方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキットまたは請求項 9 または 10 に記載の方法を使用して前記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することと、
前記身体サンプル中の前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを健康な非ヒト哺乳動物被験体の集団を表す非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルとまたは前記非ヒト哺乳動物被験体において予め決定された非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルと比較することと、
前記比較に基づいて前記非ヒト哺乳動物被験体における前記腫瘍疾患の前記再発の可能性を推定することと
を含む、方法。

40

【請求項 12】

非ヒト哺乳動物被験体における細胞増殖を決定するための方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキットまたは請求項 9 または 10 に記載の方法を使用して前記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することと、
前記身体サンプル中の前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルに基づいて前記細胞増殖を決定することと
を含む、方法。

50

【請求項 13】

悪性疾患に罹患している非ヒト哺乳動物被験体における増殖プロセス応答を決定するための方法であって、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキットまたは請求項 9 または 10 に記載の方法を使用して前記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することと、

前記身体サンプル中の前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルに基づいて前記増殖プロセス応答を決定することと

を含む、方法。

【請求項 14】

非ヒト哺乳動物被験体における炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを決定するための方法であって、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキットまたは請求項 9 または 10 に記載の方法を使用して前記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することと、

前記身体サンプル中の前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルに基づいて前記炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを決定することと

を含む、方法。

【請求項 15】

非ヒト哺乳動物被験体における悪性疾患の治療効率を評価するための方法であって、

前記悪性疾患の前記治療の開始前または開始に関連して請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキットまたは請求項 9 または 10 に記載の方法を使用して前記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することと、

前記悪性疾患の前記治療の間または後に前記請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキットまたは前記請求項 9 または 10 に記載の方法を使用して前記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することと、

前記悪性疾患の前記治療の開始前または開始に関連して前記身体サンプル中で決定された前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルと前記悪性疾患の前記治療の間または後に前記身体サンプル中で決定された前記非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルとの比較に基づいて前記悪性疾患の前記治療の効率を評価することと

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は一般に、T K 1 タンパク質レベルの決定に関し、特に、非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質レベルを決定するための抗 T K 1 抗体の使用を含むキットおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

イヌは、リンパ腫、白血病および乳腺腫瘍のような様々な新生物疾患に冒されることが多い。リンパ腫は血液腫瘍の最も一般的な形態であり、イヌの全ての癌の 5 % を占める。年間発生率は 10 万匹あたり 13 ~ 40 例と推定されている。イヌのリンパ腫は、疾患の進行に寄与する遺伝的および環境的要因に関して、ヒト非ホジキンリンパ腫に類似している。効果的な化学療法との組み合わせによる早期診断によって、上記の悪性腫瘍を制御できる。甲状腺リンパ腫の予後マーカーとして、好銀性核小体形成領域 (A g N O R s)、増殖細胞核抗原 (P C N A) および K i - 67 を含む幾つかの増殖マーカーが研究されているが、それらの使用は免疫組織化学に限定されている。血清乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) もまた、イヌリンパ腫のモニタリングマーカーとして研究されてきたが、L D H は悪性疾患以外の病気でもアップレギュレートされ、したがって臨床的価値は限られている (v o n E u l e r e t a l . , 2006)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

ネコおよびウマなどの他の非ヒト哺乳動物もまた、様々な新生物疾患に冒される。

【 0 0 0 4 】

腫瘍の進行は細胞増殖に依存し、増殖マーカーは早期に腫瘍疾患を検出する上で有用性が高い。チミジンキナーゼ1 (TK1) は、無制御の細胞増殖の間に血液中に放出されるバイオマーカーの1つである。TK1はデオキシチミジン (dT) をデオキシチミジンモノホスフェート (dTMP) に変換し、これは最終的には増殖している細胞中のDNAに取り込まれる。TK1活性は細胞周期と密接に関連しており、S期にピークに達し、G2期において急速に低下し、M期には特異的機構によって分解される。

【 0 0 0 5 】

血清TK1活性の測定は、ヒトの医学において、リンパ腫および白血病の診断およびモニタリングのための確立されたツールである。血清TK1活性は、幾つかの酵素アッセイ、例えばPROLIFIGEN (登録商標) などのTK放射性酵素アッセイ (TK-RIA)、またはLIAISON (登録商標) TKなどのTK化学発光免疫アッセイ (TK-CLIA) を使用することによって測定され、ここでは¹²⁵I-ヨードデオキシウリジンまたはアジドチミジン (AZT) のようなチミジン基質類似体が、対応するモノホスフェートへとリン酸化される。研究は、TK-R EAアッセイおよびTK-CLIAアッセイの両方が、イヌの血液腫瘍の予後および治療モニタリングのための貴重な情報を提供することを示した。基質類似体の代わりに天然の基質 [³H]-dThd (デオキシチミジン) を用いた最近の研究は、このアッセイが、TK-R EAおよびTK-CLIAアッセイと同等に鋭敏であり、イヌのリンパ腫のモニタリングに使用できることを示した (Sharif et al., 2012a)。

【 0 0 0 6 】

ヒトTK1タンパク質の異なる領域に対する抗体の開発が、TK1測定の臨床的有用性を更に拡大した。抗体検出方法に基づく幾つかの臨床研究は、種々の腫瘍疾患を有する患者由来の血清中でTK1タンパク質レベルが増加することを実証した。更に、TK1タンパク質アッセイは、固形腫瘍の予後および治療モニタリングのためのTK1活性アッセイよりも高感度であることが見出された。ヒト医学における乳癌、血液悪性腫瘍および肺癌の検出について、TK酵素結合免疫吸着アッセイ (TK-ELISA) 法を開発するための幾つかの試みがなされている (Carlsson et al., 2009; Alegre et al., 2014)。

【 0 0 0 7 】

現在、非ヒト哺乳動物腫瘍学研究に利用可能な免疫化学的方法は存在しない。しかしながら、最近の研究は、イヌのTK1・C末端に対する抗体に基づくイムノアフィニティアッセイを用いて行われている (Kiran Kumar et al., 2013; Jagarlamudi et al., 2014)。これは、種々の悪性腫瘍を有するイヌ被験体における血清TK1タンパク質レベルの決定を可能にし、TK1タンパク質アッセイが、健康なイヌとイヌ固形腫瘍の区別について、TK1活性アッセイよりも高感度であると結論付けた。Kiran Kumar 2010は、血清TK1の検出のための抗イヌTK1抗体の産生を開示した。当該抗体は、イヌTK1のアミノ酸196~223に対応する28アミノ酸長のペプチドを用いてウサギを免疫感作することによって産生された。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、非ヒト哺乳動物被験体においてTK1タンパク質レベルを測定するための、臨床的に許容される技術が依然として必要とされている。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

一般的な目的は、非ヒト哺乳動物においてTK1タンパク質レベルを測定するためのキットおよび方法を提供することである。

【 0 0 1 0 】

この目的および他の目的は、本明細書で定義される実施形態によって満たされる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

この実施形態の1つの態様は、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定するためのキットに関する。このキットは、支持体に固定化された、または支持体に固定化されることが意図された第1の抗体と、第2の抗体とを含む。第1の抗体および第2の抗体の一方は、非ヒト哺乳動物TK1のC末端領域由来のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。第1の抗体および第2の抗体の他方は、i) TK1の活性部位由来の第1のアミノ酸配列からなるペプチド、またはii) C末端領域由来の第2のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。上記C末端領域由来の第2のアミノ酸配列は、上記C末端領域由来の第1のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 0 1 2 】

当該実施形態の別の態様は、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定するための方法に関する。この方法は、サンプルを、上に定義したキットの第1の抗体および第2の抗体と接触させることを含む。この方法はまた、結合した第2の抗体の量を検出することを含む。

【 0 0 1 3 】

当該実施形態の更なる態様は、非ヒト哺乳動物被験体における腫瘍疾患の再発の可能性を推定するための方法に関する。方法は、上記の方法またはキットを用いて、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定することを含む。方法はまた、上記身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを、健康な非ヒト哺乳動物被験体集団を表す非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベル、または非ヒト哺乳動物被験体において以前に測定された非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルと比較することを含む。当該方法は更に、上記比較に基づいて、非ヒト哺乳動物被験体における腫瘍疾患の再発の可能性を推定することを含む。

【 0 0 1 4 】

当該実施形態の更に別の態様は、非ヒト哺乳動物被験体における細胞増殖を決定するための方法に関する。この方法は、上記の方法またはキットを用いて、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定することを含む。当該方法はまた、上記身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルに基づいて細胞増殖を決定することを含む。

【 0 0 1 5 】

当該実施形態の更なる態様は、悪性疾患に罹患している非ヒト哺乳動物被験体での増殖プロセス応答を決定するための方法に関する。この方法は、上記に従う方法またはキットを用いて、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定することを含む。当該方法はまた、身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルに基づいて増殖プロセス応答を決定することを含む。

【 0 0 1 6 】

当該実施形態の更に別の態様は、非ヒト哺乳動物被験体における炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを決定するための方法に関する。この方法は、上記に従う方法またはキットを用いて、非ヒト哺乳動物被験体由来の上記身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定することを含む。当該方法はまた、上記身体試料中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルに基づいて、炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを決定することを含む。

【 0 0 1 7 】

当該実施形態の更なる態様は、非ヒト哺乳動物被験体における悪性疾患の治療の効率を評価するための方法に関する。この方法は、悪性疾患の治療の開始前または開始に関連して、上記実施形態による方法またはキットを使用して、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定することを含む。この方法はまた、悪性疾患の治療中または治療後に、実施形態による方法またはキットを使用して、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定することを含む。この方法は更に、上記悪性疾患の治療の開始前または開始に関連して

10

20

30

40

50

上記身体サンプル中で決定された非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルと、上記悪性疾患の治療中または治療後に上記身体サンプル中で決定された非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルとの比較に基づいて、上記悪性疾患の治療の効率を評価することを含む。

【0018】

当該実施形態は、非ヒト哺乳動物の被験体においてTK1タンパク質レベルを決定することを可能にする。当該実施形態のキットおよび方法は、既存のTK1活性アッセイと同様に、実施が容易で、迅速かつ高感度であり、特異的である。当該キットおよび方法は、健康な非ヒト哺乳動物と固形腫瘍に罹患している非ヒト哺乳動物を区別する際に、TK1活性アッセイよりも遥かに鋭敏である。

【0019】

当該実施形態は、更なる目的および利点と共に、添付の図面と併せて以下の説明を参照することによって最もよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】ヒトTK1 (GenBank 受付番号KO__2582; 配列番号4)、イヌTK1 (本明細書において犬TK1とも呼ばれる、GenBank 受付番号XM__540461; 配列番号3)、ネコTK1 (本明細書において猫TK1とも呼ばれる、GenBank 受付番号XP__3997286.2; 配列番号9) およびウマTK1 (本明細書では馬TK1とも呼ばれる、GenBank 受付番号XP__1491131.2; 配列番号17) の推定アミノ酸配列のアミノ酸アラインメントを図示する。ウマTK1において、イヌTK1およびネコTK1タンパク質と同様の全長を有する組換えウマTK1タンパク質を産生するために、保存されたN末端ペプチド(ヒト、イヌおよびネコTK1中のTK1中のアミノ酸1~27)MSCINLPTVLPGPSKTRGQIQVILGP (配列番号18) をコードするオリゴヌクレオチド配列を付加し、GenBank 推定cDNA を作製した。配列番号10を参照されたい。イヌTK1の活性部位領域(CTK1p-161、イヌTK1におけるアミノ酸161~183、AYTKRLGSEKEVEVIGGADKYHS (配列番号7)) に対して、イヌTK1のC末端領域(CTK1p-211、イヌTK1のアミノ酸211~225、VLVP GKPGEGKEATG (配列番号11)、CTK1p-215、イヌTK1におけるアミノ酸215~230、GKPGEGKEATGVRKLF (配列番号1)) に対して、およびネコTK1のC末端領域(FTK1p-213、ネコTK1のアミノ酸213~227、GKPGEASGARKLFA P (配列番号13)) に対して、抗体が産生された。この図はまた、ヒトTK1の活性部位領域(Ar-4、ヒトTK1のアミノ酸161~183、AYTKRLGTEKEVEVIGGADKYHS (配列番号2)) に対して産生されたマウスモノクローナル抗TK1抗体、およびイヌTK1のC末端領域(PAb-Arv1、イヌTK1のアミノ酸215~230、GKPGEGKEATGVRKLF (配列番号1)) に対するウサギポリクローナル抗体を示す。

【図2】サンドイッチELISAの模式的提示図である。5つのステップは次の通りである：(1) 第1の抗TK1抗体(捕捉またはコーティング抗体)によるマイクロプレートウェルのコーティング、(2) 上記捕捉抗体への血清中TK1の結合、(3) 血清中TK1へのビオチン化抗TK1抗体の付着、(4) ストレプトアビジン-HRPによるビオチンの検出、および(5) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB) 発色基質の添加によりモニターされる酵素活性。

【図3】異なる5回の実施からの、450nMでの吸光度に対する0.6~10ng/mLの範囲の異なる濃度の組み換えイヌTK1による標準曲線を示す。

【図4A】健康なイヌ() および血液学的腫瘍を有するイヌ() 由来の血清中のlogSTK1活性レベル(pmol/分/mL)を示す。直線は中央値を表す。

【図4B】血液腫瘍を有するイヌ(n=36)からおよび健康なイヌ(n=30)からの、STK1活性アッセイ結果の受信者動作特性(ROC)曲線を示す。

【図4C】健康なイヌ() および血液学的腫瘍を有するイヌ() 由来の血清中のlog

10

20

30

40

50

g S T K 1 タンパク質レベルを示す。直線は中央値を表す。

【図 4 D】健康なイヌの S T K 1 タンパク質レベル (n g / m L) を、血液学的腫瘍を有するイヌにおけるものと比較した R O C 曲線分析を示す。

【図 5 A】健康なイヌ () および固形腫瘍を有するイヌ () 由来の血清中の l o g S T K 1 活性レベル (p m o l / 分 / m L) を示す。直線は中央値を表す。

【図 5 B】固形腫瘍を有するイヌ (n = 4 0) および健康なイヌ (n = 3 0) から得た S T K 1 活性アッセイの結果の R O C 曲線を示す。

【図 5 C】健康なイヌ () および固形腫瘍を有するイヌ () 由来の血清中の L o g S T K 1 タンパク質レベルを示す。直線は中央値を表す。

【図 5 D】固形腫瘍を有するイヌにおけるものと比較した、健康なイヌの S T K 1 タンパク質レベル (n g / m L) についての R O C 曲線分析を示す。 10

【図 6】イヌの腫瘍の異なる下位群における l o g S T K 1 分布を示す。(A) 健康なイヌ、リンパ腫を有するイヌ、白血病を有するイヌ由来の血清中の S T K 1 活性レベル。(B) 健康なイヌ、乳腺腫瘍を有するイヌ、悪性黒色腫を有するイヌ、肥満細胞腫を有するイヌおよび他の腫瘍を有するイヌにおける S T K 1 活性レベル。(C) 健康なイヌ、リンパ腫を有するイヌ、白血病を有するイヌ由来の血清中の S T K 1 タンパク質分布。(D) 健康なイヌ、乳腺腫瘍を有するイヌ、悪性黒色腫を有するイヌ、肥満細胞腫を有するイヌおよび他の腫瘍を有するイヌにおける S T K 1 タンパク質分布。

【図 7 A】リンパ腫を有するイヌの化学療法の際の、イヌ由来の血清中における S T K 1 活性レベルを示す。 20

【図 7 B】リンパ腫を有するイヌの化学療法の際の、イヌ由来の血清中の S T K 1 タンパク質レベルを示す。

【図 8】(A) C T K 1 p - 2 1 5 抗血清、(B) C T K 1 p - 1 6 1 抗血清、(C) C T K 1 p - 2 1 1 抗血清および (D) F T K 1 p - 2 1 3 抗血清とのイヌ、ネコおよびウマ組換え T K 1 によるドットプロットイムノアッセイの結果を示す図である。

【図 9】異なる抗血清との異なる濃度の (A) イヌ組換え T K 1、(B) ネコ組換え T K 1 および (C) ウマ組換え T K 1 による任意単位 (A . U .) でのドット強度を示す。

【図 1 0】C T K 1 p - 2 1 5 コーティングおよび検出抗体として C T K 1 p - 1 6 1 を用いた 5 つの異なる実験における、0 . 6 ~ 1 0 n g / m L の範囲の異なる濃度の組換えイヌ T K 1 を用いた標準曲線を示す。 30

【図 1 1 A】健康なイヌ () および血液悪性腫瘍を有するイヌ () 由来の血清中の l o g S T K 1 ・ E L I S A タンパク質レベル (n g / m L) を示す。エラーバーは中央値を表す。

【図 1 1 B】血液腫瘍のイヌ (n = 1 5) を健康なイヌ (n = 1 0) と区別するための、S T K 1 ・ E L I S A アッセイの R O C 曲線を示す。

【図 1 1 C】健康なイヌ () および固形腫瘍を有するイヌ () 由来の血清中の l o g S T K 1 タンパク質レベルを示す。エラーバーは中央値を表す。

【図 1 1 D】健康なイヌにおける S T K 1 タンパク質レベル (n g / m L) について、固形腫瘍 (n = 1 0) を有するイヌにおけるものと比較した R O C 曲線分析を示す。

【図 1 2】C T K 1 p - 2 1 1 コーティングおよび C T K 1 p - 2 1 5 検出抗体を用いた 5 つの異なる実験からの、4 5 0 n M での吸光度に対する 0 . 6 ~ 1 0 n g / m L 範囲の異なる濃度の組み換えイヌ T K 1 を用いた標準曲線を示す。 40

【図 1 3 A】健康なイヌ () および血液学的腫瘍を有するイヌ () 由来の血清中の l o g S T K 1 タンパク質分布 (n g / m L) を示す。エラーバーは中央値を表す。

【図 1 3 B】健康な対象 (n = 7) と血液学的腫瘍の対象 (n = 1 5) を識別するための、S T K 1 ・ E L I S A アッセイの R O C 曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 1 】

本発明の実施形態は一般に、非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質レベルの決定、特に、非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質レベルを決定するための抗 T K 1 抗体の使用を含むキットお 50

よび方法に関する。

【 0 0 2 2 】

ヒトTK1の結晶構造は解明されており、N-末端領域を含む、酵素の大部分は、幾つかの残基を除いてヒト、イヌ、ネコおよびウマにおいて保存されている。図1、ならびにイヌTK1(犬TK1)を表す配列番号3、ヒトTK1を表す配列番号4、ネコTK1(猫TK1)を表す配列番号9およびウマTK1(馬TK1)を表す配列番号10を参照されたい。例えば、ヒトTK1配列はイヌTK1と88.5%の類似性を示すが、かなりの配列多様性(9.1%)がC末端領域に見出される。

【 0 0 2 3 】

当該実施形態の1つの態様は、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定するためのキットに関する。このキットは、支持体に固定化された、または支持体に固定化されることが意図された第1の抗体と、第2の抗体とを含む。当該実施形態によれば、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方は、非ヒト哺乳動物TK1のC末端領域由来のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方は、i)TK1の活性部位由来の第1のアミノ酸配列からなるペプチド、またはii)C末端領域由来の第2のアミノ酸配列からなるペプチドに対する特異性を有する。C末端領域由来の第2のアミノ酸配列は、C末端領域由来の第1のアミノ酸配列とは異なる。

10

【 0 0 2 4 】

当該キットは、サンプル、好ましくは非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物血清TK1(STK1)タンパク質のレベルを決定するために特に適している。

20

【 0 0 2 5 】

C末端領域由来の第1のアミノ酸配列または第2のアミノ酸配列からなるペプチドは、好ましくは、非ヒト哺乳動物TK1のアミノ酸位置200~末端(イヌではアミノ酸位置242、ネコではアミノ酸位置237、ウマではアミノ酸位置237)の範囲に亘る非ヒト哺乳動物TK1の部分から選択されるペプチドである。特定の実施形態において、上記ペプチドは、アミノ酸位置205、好ましくは210、より好ましくは211~アミノ酸位置240、好ましくは235、より好ましくは230の範囲に亘るTK1タンパク質の部分から選択される。

【 0 0 2 6 】

上記ペプチドは、好ましくはN量体であり、ここでNは10~25、好ましくは10~20の整数であり、より好ましくは15、16または17である。

30

【 0 0 2 7 】

上記ペプチドは好ましくは、非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のC末端領域中のN個の連続アミノ酸からなる。

【 0 0 2 8 】

担体タンパク質などの、他の分子へのカップリングとして使用するために、少なくとも1つの追加のアミノ酸、例えばシステイン残基を、上記ペプチドのN末端またはC末端、好ましくはN末端に付加してもよい。

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、C末端領域由来の第1のアミノ酸配列または第2のアミノ酸配列からなる上記ペプチドは、イヌTK1(図1参照)のアミノ酸位置215~230に対応するアミノ酸配列、即ち、GKPGEGKEATGVRKLF(配列番号1)のアミノ酸配列を有する。付加されたN末端システイン残基を有する対応するアミノ酸配列は、CGKPGEGKEATGVRKLF(配列番号5)である。

40

【 0 0 3 0 】

別の実施形態において、C末端領域由来の第1のアミノ酸配列または第2のアミノ酸配列からなるペプチドは、イヌTK1(図1参照)のアミノ酸位置211~225に対応するアミノ酸配列、即ち、VLVPGKPGEGKEATG(配列番号11)のアミノ酸配列を有する。付加されたN末端システイン残基を有する対応するアミノ酸配列は、CVLV

50

P G K P G E G K E A T G (配列番号 1 2) である。

【 0 0 3 1 】

更なる実施形態において、C末端領域由来の第1のアミノ酸配列または第2のアミノ酸配列からなるペプチドは、ネコTK1(図1参照)のアミノ酸位置213~227に対応するアミノ酸配列、即ち、G K P G E A S G A R K L F A P (配列番号 1 3) のアミノ酸配列を有する。付加されたN末端システイン残基を有する対応するアミノ酸配列は、C G K P G E A S G A R K L F A P (配列番号 1 4) である。

【 0 0 3 2 】

TK1の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドは、好ましくは、アミノ酸位置150~アミノ酸位置190の範囲に亘るTK1部分から選択されるペプチドである。特定の実施形態において、当該ペプチドは、アミノ酸位置155、好ましくは160、より好ましくは161~、アミノ酸位置185、好ましくは183の範囲のTK1部分から選択される。

10

【 0 0 3 3 】

当該ペプチドは、好ましくはM量体であり、ここでMは10~40、好ましくは20~30の整数、より好ましくは23または24である。

【 0 0 3 4 】

当該ペプチドは好ましくは、TK1タンパク質の活性部位中のM個の連続アミノ酸からなる。

【 0 0 3 5 】

TK1の活性部位を表すこの部分は、図1に示すように、ヒト、イヌ、ネコおよびウマTK1間でなどの、異なる種間で非常に高レベルの相同性を示す。例えば、アミノ酸位置150からアミノ酸位置190に延びる部分内において、ヒトTK1、イヌTK1およびネコTK1の間には、単一のアミノ酸位置における相違のみが存在する。この領域において、ヒトTK1とウマTK1との間にアミノ酸の相違は存在しない。

20

【 0 0 3 6 】

従って、当該ペプチドは、ヒトTK1の活性部位由来の、イヌTK1由来の、ネコTK1由来の、ウマTK1由来のまたは他の非ヒト哺乳動物TK1由来のアミノ酸配列からなり得るであろう。本明細書に示される実験データは、ヒトTK1の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体が、イヌTK1にも特異的に結合することを示す。

30

【 0 0 3 7 】

担体タンパク質などの、他の分子へのカップリングとして使用するために、少なくとも1つの追加のアミノ酸、例えばシステイン残基を、ペプチドのN末端またはC末端、好ましくはN末端に付加してもよい。

【 0 0 3 8 】

一実施形態において、TK1の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドは、ヒトTK1(およびウマTK1)のアミノ酸位置161~183に対応するアミノ酸配列(図1参照)、即ち、A Y T K R L G T E K E V E V I G G A D K Y H S (配列番号 2) のアミノ酸配列を有する。N末端システイン残基が付加された対応するアミノ酸配列は、C A Y T K R L G T E K E V E V I G G A D K Y H S (配列番号 6) である。

40

【 0 0 3 9 】

別の実施形態において、TK1の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドは、イヌTK1のアミノ酸位置161~183のアミノ酸に対応するアミノ酸配列(図1参照)、即ち、A Y T K R L G S E K E V E V I G G A D K Y H S (配列番号 7) のアミノ酸配列を有する。N末端システイン残基を付加された対応するアミノ酸配列は、C A Y T K R L G S E K E V E V I G G A D K Y H S (配列番号 8) である。

【 0 0 4 0 】

更なる実施形態において、TK1の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドは、ネコTK1のアミノ酸位置161~183に対応するアミノ酸配列(図1参照)、即ち、A

50

Y T K R L G A E K E V E V I G G A D K Y H S (配列番号15)のアミノ酸配列を有する。N末端システイン残基が付加された対応するアミノ酸配列は、C A Y T K R L G A E K E V E V I G G A D K Y H S (配列番号16)である。

【0041】

一実施形態において、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを測定するための上記キットは、支持体に固定化された、または支持体に固定化されることが意図された第1の抗体と、第2の抗体とを含む。この実施形態において、上記第1および第2の抗体の一方は、TK1の活性部位由来のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有し、上記第1の抗体および第2の抗体の他方は、TK1のC末端領域由来のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。

10

【0042】

特定の実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方は、配列番号11および12からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する特異性を有し、また上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方は、配列番号2、配列番号6、配列番号7および配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。従って、本実施形態に従う上記第1および第2の抗体の具体的な組み合わせは、配列番号11からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号2からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号11からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号6からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号11からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号7からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号11からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号8からなるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号12からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号2からなるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号12からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号6からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号12からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号7からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号12からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異的な抗体および配列番号8からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異的な抗体を含む。

20

30

【0043】

好ましい実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方はCTK1p-211抗体であり、上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方はCTK1p-161抗体である。別の好ましい実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方はCTK1p-211抗体であり、第1の抗体および第2の抗体の他方はArv4抗体である。

【0044】

別の特定の実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方は、配列番号1および配列番号5からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有し、また得上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方は、配列番号2、配列番号6、配列番号7および配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。従って、本実施形態に従う上記第1および第2の抗体の具体的な組み合わせは、配列番号1からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号2からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号1からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号6からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号1からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号7からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号1からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番

40

50

号8からなるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号5からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号2からなるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号5からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号6からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号5からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号7からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号5からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異的な抗体および配列番号8からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異的な抗体を含む。

【0045】

好ましい実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方はCTK1p-215抗体であり、上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方はCTK1p-161抗体である。別の好ましい実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方はCTK1p-215抗体であり、上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方はArv4抗体である。更に好ましい実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方はPAb-Arv1抗体であり、上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方はCTK1p-161抗体である。更に別の好ましい実施形態では、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方はPAb-Arv1抗体であり、上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方はArv4抗体である。

10

【0046】

一実施形態において、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを測定するためのキットは、支持体に固定化された、または支持体に固定化されることが意図された第1の抗体と、第2の抗体とを含む。この実施形態において、上記第1および上記第2の抗体の一方は、TK1のC末端領域由来の第1のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有し、また上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方は、TK1のC末端領域由来の第2のアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。

20

【0047】

上記第1および上記第2のアミノ酸配列は、TK1のC末端領域とは異なるアミノ酸配列である。これらの2つのアミノ酸配列は、しかしながら、例えば、CTK1p-211のアミノ酸配列をCTK1p-215のアミノ酸配列と比較したときに、図1に示すように部分的に重なり得る。

30

【0048】

例えば、上記第1のアミノ酸配列が N_1 アミノ酸からなり、上記第2のアミノ酸配列が N_2 アミノ酸からなる場合、これらの2つのアミノ酸配列はP個のアミノ酸で重複し得るであろう。Pは0以上であるが、 N_1 と N_2 の最大値よりも小さく、即ち、 $0 < P < \max(N_1, N_2)$ である。

【0049】

TK1のC末端領域で、少なくとも部分的に重複し得る異なるエピトープに対する特異性を有する2つの抗体が、非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定するために使用され得ることは非常に驚くべきことであった。この驚くべき知見について考えられる理由は、TK1が多価であり、組換えTK1および血清TK1の両方に幾つかの抗体結合部位を有することであるかもしれない。しかし、組換えTK1複合体および血清TK1複合体に複数の潜在的な抗体結合部位があるにもかかわらず、交差反応性を低下させ特異性を高めるために、異なるエピトープに対して特異性を有する2つの異なる抗体を用いることが一般的に好ましい。

40

【0050】

特定の実施形態において、上記第1の抗体および上記第2の抗体の一方は、配列番号11および12からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有し、かつ上記第1の抗体および上記第2の抗体の他方は、配列番号1および配列番号5からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する。従って、本実施形態に従う上記第1および第2の抗体の具体的な組み合わせは、配列番号11か

50

らなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号 1 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号 1 1 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号 5 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号 1 2 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号 1 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体、配列番号 1 2 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体および配列番号 5 からなるアミノ酸配列からなるペプチドに対して特異性を有する抗体を含む。

【0051】

好ましい実施形態において、上記第 1 の抗体および上記第 2 の抗体の一方は C T K 1 p - 2 1 1 抗体であり、上記第 1 の抗体および上記第 2 の抗体の他方は C T K 1 p - 2 1 5 抗体である。別の好ましい実施形態において、上記第 1 の抗体および上記第 2 の抗体の一方は C T K 1 p - 2 1 1 抗体であり、上記第 1 の抗体および上記第 2 の抗体の他方は P A b - A r v 1 抗体である。

10

【0052】

上記抗体（複数）は、ポリクローナル抗体（複数）、モノクローナル抗体（複数）であってよく、或いはそれら的一方がポリクローナル抗体で、他方がモノクローナル抗体であってもよい。

【0053】

特定の実施形態において、非ヒト哺乳動物 T K 1 の C 末端領域由来のアミノ酸配列からなる上記ペプチドに対して特異性を有する上記抗体はポリクローナル抗体であり、T K 1 の活性部位由来のアミノ酸配列からなる上記ペプチドに対して特異性を有する上記抗体はモノクローナル抗体である。

20

【0054】

上記抗体の一方または両方は、関連ペプチドに対する特異性を有する抗体断片であってよい。そのような場合、当該断片は、一本鎖抗体、F v 断片、s c F v 断片、F a b 断片、F (a b ') 2 断片、F a b ' 断片、F d 断片、単ドメイン抗体 (s d A b)、s c F v - F c 断片、d i - s c F v 断片および C D R 領域を含む。

【0055】

抗体の特異性は、親和性および/またはアビディティに基づいて決定できる。抗原と抗体との解離の平衡定数 (K_d) で表される親和性は、抗原決定基と抗体上の抗原結合部位の間の結合強度の尺度である。 K_d の値が小さいほど、抗原決定基と抗体の間の結合強度は強くなる。或いは、親和性は、 $1 / K_d$ である、親和性定数 (K_a) として表すこともできる。当業者に明らかなように、親和性は、目的の特異的抗原に応じて、それ自体公知の方法で決定できる。

30

【0056】

アビディティは、抗体と適切な抗原の間の結合強度の尺度である。アビディティは、抗原決定基と抗体上のその抗原結合部位の間の親和性、およびモノクローナル抗体上に存在する関連結合部位の数の両方に関連する。

【0057】

典型的には、抗体は、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ モル/リットル (M) 以下、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ M 以下、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ M 以下の解離定数 (K_d)、即ち、 $10^5 \sim 10^{12}$ M⁻¹ 以上、好ましくは $10^7 \sim 10^{12}$ M⁻¹ 以上、より好ましくは $10^8 \sim 10^{12}$ M⁻¹ の会合定数 (K_a) で、それらの抗原に結合するであろう。

40

【0058】

一般に、 10^{-4} M より大きい任意の K_d 値 (または 10^4 M⁻¹ より低い K_a 値) は、非特異的結合を示すと一般に考えられる。

【0059】

好ましくは、当該実施形態の抗体または断片は、500 nM 未満、好ましくは 200 nM

50

未満、より好ましくは10 nM未満、例えば5 nM未満の親和性で、血清型および/または組換え型の非ヒト哺乳動物TK1に結合する。

【0060】

特定の実施形態において、上記キットはサンドイッチアッセイキットである。これは、当該キットが、非ヒト哺乳動物TK1タンパク質の異なるエピトープに結合する抗体(複数)を使用して、上記第1の抗体および上記第2の抗体の両方が同じ非ヒト哺乳動物TK1分子または複合体に同時に結合できるようにすることを意味する。

【0061】

特定の実施形態において、当該キットは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであり、好ましくはサンドイッチELISAである。

10

【0062】

サンドイッチELISAは、上記第1の抗体が所謂捕捉抗体として結合される、固体支持体などの、支持体の表面を調製することによって、試料中の細胞および/または血清TK1タンパク質を検出するために使用できる。好ましい実施形態では、既知量の上記第1の抗体が支持体の表面に結合される。表面上の任意の非特異的結合部位は、任意ではあるが、好ましくはブロックされる。サンプルを次いで表面に適用し、その中に存在する任意の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質が、固定化された上記第1の抗体によって捕捉されるようにする。未結合の物質は好ましくは、1回または複数回の洗浄ステップによって除去される。典型的には検出抗体と称される第2の抗体を次いで添加し、上記第1の抗体によって捕捉された任意の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質に結合させる。

20

【0063】

結合した上記第2の抗体の量が次いで、直接的または間接的な検出方法によって決定される。例えば、標識または酵素は、上記第2の抗体に直接的に、またはビオチン-ストレプトアビジンもしくはビオチン-アビジン結合などのリンクを介して間接的に結合されてよい。或いは、標識されまたは酵素に連結され、上記第2の抗体に特異的に結合する二次抗体を使用することも可能である。

【0064】

従って、一実施形態において、上記第2の抗体は共有結合されるビオチンを有する。或いは、上記第2の抗体は、共有結合されるストレプトアビジンまたはアビジンを有する。

【0065】

当該キットはまた、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン、またはHRP標識アビジンも含む。或いは、当該キットはまた、HRP標識ビオチンも含む。キットはまた、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)基質または2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)基質などのHRP基質も含む。このような場合、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルは、検出可能な有色生成物へのHRPによる発色基質の変換を検出する分光光度法によって決定できる。

30

【0066】

一実施形態において、当該キットはまた、上記第1の抗体が固定化されるかまたは固定化されることが意図される支持体としての、マイクロタイタープレート(MCP)を含む。

図2は、一実施形態による、上記第1の抗体および上記第2の抗体を使用するサンドイッチELISAの概念の概略図である。

40

【0067】

当該キットは、必ずしもELISAキットである必要はない。別の実施形態において、当該キットはアフィニティークロマトグラフィーを使用し、ここで上記第1の抗体が、カラム中のゲルマトリックスまたはビーズなどの、固定相に結合される。例えば、上記ゲルマトリックスまたはビーズは、SEPHAROSE(登録商標)などの、アガロースでできていてよい。

【0068】

そのような場合、サンプル中に存在する非ヒト哺乳動物TK1タンパク質は、固定化され

50

た上記第1の抗体への結合を介してカラム中に捕捉される。洗浄後、結合した非ヒト哺乳動物TK1タンパク質を溶出させ、上記第2の抗体を用いて検出できる。例えば、溶出された非ヒト哺乳動物TK1タンパク質の量は、ウエスタンブロッティングを用いて、および直接的または間接的な検出法を用いるTK1検出のための上記第2の抗体を用いて決定できる。

【0069】

或いは、上記支持体は、DYNABEADS（登録商標）磁気ビーズなどの、磁気ビーズであってもよいであろう。

【0070】

当該実施形態に従って決定される非ヒト哺乳動物TK1タンパク質は、非ヒト哺乳動物細胞性および/または血清のTK1タンパク質、好ましくは非ヒト哺乳動物血清TK1（STK1）タンパク質または分子であってよい。

10

【0071】

一実施形態において、上記非ヒト哺乳動物TK1タンパク質は、イヌTK1タンパク質、ネコTK1タンパク質およびウマTK1タンパク質からなる群から選択される。従って、これらの実施形態において、TK1タンパク質は、イヌ、ネコまたはウマ由来であり得る。特定の実施形態において、上記非ヒト哺乳動物TK1タンパク質はイヌTK1タンパク質である。

【0072】

本実施形態のキットは、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定する方法において使用できる。

20

【0073】

当該実施形態の別の態様は、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質レベルを決定するための方法に関する。この方法は、サンプルを、上記実施形態によるキットの第1の抗体および第2の抗体と接触させることを含む。当該方法はまた、結合した第2の抗体の量を検出することを含む。

【0074】

上記サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルが次いで、結合した上記第2の抗体の検出量に基づいて決定される。

【0075】

結合した抗体の量を検出するための任意の先行技術を、本方法において使用できる。例えば、検出は直接的または間接的であってよく、かつ蛍光または発色信号を生成してよい。直接的な検出は典型的には、標識に結合される抗体の使用を含む。間接的な検出は、抗体の宿主種に対して生成された標識二次抗体を利用する。

30

【0076】

エピトープに対する抗体の結合を視覚化するために一般に使用される標識は、蛍光発色団、および可溶性基質を発色性最終産物に変換する酵素を含む。

【0077】

上記サンプルは好ましくは身体サンプルであり、より好ましくは、細胞サンプル、組織サンプル、血液サンプル、血清サンプル、脳脊髄液サンプル、胸膜液サンプル、滑液サンプルおよび腹腔液からなる群から選択される。好ましい実施形態において、上記身体サンプルは体液サンプルであり、好ましくは血液サンプル、血清サンプル、脳脊髄液サンプル、胸膜液サンプル、滑液サンプルおよび腹腔液サンプルからなる群から選択される。特定の実施形態において、上記身体（体液）サンプルは、血液サンプルまたは血清サンプルである。

40

【0078】

従って、当該実施態様の抗体は、サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベル、即ち量を決定するために使用できる。当該実施形態の抗体は、その種々の形態、例えば二量体、四量体、およびオリゴマーの形態の非ヒト哺乳動物細胞性もしくは血清のTK1に結合でき（潜在的には更なるタンパク質、補因子または分子への結合を含み）、それに

50

よって上記 T K 1 レベルの決定を可能にすると考えられる。従って、非ヒト哺乳動物細胞および/または血清 T K 1 タンパク質は、それによって、その様々な形態での非ヒト哺乳動物細胞および/または血清 T K 1 を含む。

【 0 0 7 9 】

特定の実施形態において、当該方法は、身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 S T K 1 タンパク質レベルを決定するための方法である。

【 0 0 8 0 】

別の実施形態において、当該方法は、身体サンプル中の非ヒト哺乳動物細胞 T K 1 タンパク質レベルを決定するための方法である。

【 0 0 8 1 】

更なる実施形態において、当該方法は、身体サンプル中の非ヒト哺乳動物細胞 T K 1 タンパク質および非ヒト哺乳類 S T K 1 タンパク質のレベルを決定するための方法である。

【 0 0 8 2 】

当該実施形態の更なる態様は、非ヒト哺乳動物被験体、例えばイヌ、ネコまたはウマにおける腫瘍疾患の再発の可能性を推定するための方法に関する。当該方法は、上記実施形態による方法またはキットを使用して、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することを含む。上記身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを次いで、健康な非ヒト哺乳動物被験体の集団を表す非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベル、または非ヒト哺乳動物被験体において予め測定された非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルと比較する。当該方法は更に、上記比較に基づいて、上記非ヒト哺乳動物被験体における腫瘍疾患の再発の可能性を推定することを含む。

【 0 0 8 3 】

健康な非ヒト哺乳動物の集団に関連したレベルよりも高い、決定されたレベルは、当該非ヒト哺乳動物被験体における腫瘍疾患の再発の増大した可能性を示す。同様に、以前の治療の後の上記非ヒト哺乳動物被験体に関連したレベルよりも高い、決定されたレベルは、上記非ヒト哺乳動物被験体における腫瘍疾患の再発の増大した可能性を示す。

【 0 0 8 4 】

当該実施形態の更に別の態様は、非ヒト哺乳動物被験体における細胞増殖を決定するための方法に関する。当該方法は、上記実施形態による方法またはキットを使用して、非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルを決定することを含む。当該方法はまた、上記身体サンプル中の非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質のレベルに基づいて、上記細胞増殖を決定することを含む。

【 0 0 8 5 】

特定の実施形態では、正常細胞または腫瘍細胞の増殖レベルを決定し、かつ非ヒト哺乳動物 T K 1 タンパク質の決定されたレベルと比較して、上記非ヒト哺乳動物被験体が正常なもしくはベースラインの細胞増殖、または上昇した細胞増殖を有するかどうかを決定する。

【 0 0 8 6 】

本方法は、非ヒト哺乳動物被験体に適用される様々な治療法のモニタリングにおけるツールとして使用できる。例えば、この方法は、非ヒト哺乳動物被験体における抗増殖療法または抗腫瘍療法をモニターするために使用できる。そのような場合、当該方法は、選択された抗増殖療法または抗腫瘍療法が、上記非ヒト哺乳動物被験体における細胞増殖を減少させることにおいて所望の効果を有するかどうかを検証するために使用できる。この療法が所望の効果を有さない場合、即ち細胞増殖の有意な減少が検出されない場合には、別のまたは改変された抗増殖療法または抗腫瘍療法を、上記非ヒト哺乳動物被験体に適用できる。

【 0 0 8 7 】

当該実施形態の更なる態様は、悪性疾患に罹患している非ヒト哺乳動物被験体における増殖プロセス応答を決定するための方法に関する。当該方法は、上記実施形態による方法またはキットを使用して、上記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動

10

20

30

40

50

物TK1タンパク質のレベルを決定することを含む。当該方法はまた、上記身体サンプル中の上記非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルに基づいて、増殖プロセス応答を決定することを含む。そのような増殖プロセス応答の一例は、免疫反応または免疫反応応答であり得るであろう。

【0088】

一実施形態では、増殖プロセス応答のための少なくとも1つの他のバイオマーカもまた、上記決定において使用されてよい。

【0089】

当該実施形態の更に別の態様は、非ヒト哺乳動物被験体における炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを決定するための方法に関する。当該方法は、上記実施形態による方法またはキットを使用して、上記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定することを含む。当該方法はまた、上記身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルに基づいて、炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを決定することを含む。一実施形態では、炎症、感染症または腫瘍細胞の増殖のための少なくとも1つの他のバイオマーカもまた、上記決定において使用されてよい。

10

【0090】

当該実施形態の更なる態様は、非ヒト哺乳動物被験体における悪性疾患の治療効率を評価するための方法に関する。当該方法は、上記悪性疾患の治療の開始前または開始に関連して、上記実施形態による方法またはキットを使用して、上記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定することを含む。当該方法はまた、上記悪性疾患の治療中または治療後に、上記実施形態による方法またはキットを使用して、上記非ヒト哺乳動物被験体由来の身体サンプル中の非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルを決定することを含む。当該方法は更に、上記悪性疾患の治療の開始前または開始に関連して上記身体サンプル中において決定された非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルと、悪性疾患の治療中または治療後に上記身体サンプル中において決定された非ヒト哺乳動物TK1タンパク質のレベルとの比較に基づいて、上記悪性疾患の治療の効率を評価することを含む。

20

【0091】

上記実施形態の方法およびキットは、例えばイヌ、ネコまたはウマにおける悪性疾患の治療の効率を評価するまたは決定するために使用できる。従って、治療中または治療後に決定されたTK1タンパク質レベルを、治療開始前に、または治療開始に関連して予め測定された対応するTK1タンパク質レベルと比較することにより、選択された治療が非ヒト哺乳動物におけるTK1タンパク質レベルを低下させる点において何らかの医療効果を有するかどうかを決定できる。従って、治療された非ヒト哺乳動物におけるTK1タンパク質レベルの低下は、悪性疾患に関して効果を有する治療、即ち効率的な治療と相関すると決定される。しかしながら、治療された非ヒト哺乳動物においてTK1タンパク質レベルの有意な減少が検出されなければ、その特定の治療は効率的ではなく、上記悪性疾患に関して所望の効果を有さない。

30

【0092】

上記腫瘍は、好ましくは、リンパ腫または白血病などの血液腫瘍、または乳房腫瘍、組織球肉腫、肥満細胞腫、黒色腫、血管肉腫または腺癌などの固形腫瘍である。

40

【0093】

Kiran Kumar 2010は、イヌTK1のアミノ酸196~223に対応する28アミノ酸長のペプチドでウサギを免疫感作することにより産生された、抗イヌTK1抗体の製造を開示した。しかしながら、この抗イヌTK1抗体は、ELISAアッセイで使用したときに低い性能を示し、高いバックグラウンドを有した。長い(28アミノ酸)ペプチドに対するポリクローナル抗体の産生は、バッチ間での大きなバラツキを示した。これは、本実施形態および本明細書に提示される実験データとは明らかに対照的である。本実施形態の抗体は、ELISAアッセイにおいて高い特異性で首尾よく使用でき、健康な被験体と血液学的または固形腫瘍に罹患している被験体を識別できる。

50

【 0 0 9 4 】

実施例

実施例 1

血液腫瘍および固形腫瘍を有するイヌにおける血清TK1 (STK1) タンパク質レベルの決定のための新しいTK1 - ELISAを開発した。健康なイヌ、白血病およびリンパ腫を有するイヌ、ならびに固形腫瘍を有するイヌ由来の血清中で、STK1活性およびSTK1タンパク質レベルの両方を測定した。更に、これらの両方のTK1アッセイのモニタリング効率を試験するために、リンパ腫を有する6匹のイヌ由来の血清サンプルを治療中に追跡した。

【 0 0 9 5 】

材料および方法

血清サンプル

健康なイヌ、血液学的腫瘍を有するイヌおよび固形腫瘍を有するイヌ由来の血清を、スウェーデンの農業科学大学(ウプサラ、スウェーデン)の大学動物病院から集め、分析まで-20で保存した。このプロジェクトは、スウェーデン動物倫理委員会の承認を受けた。この研究は、健康なイヌ(n=30)、血液腫瘍を有するイヌ(n=36:リンパ腫、n=31、白血病n=5)および固形腫瘍を有するイヌ(n=40)由来のサンプルを含んだ。平均年齢および中央年齢は、健康群で6歳(3~10歳に及ぶ)、血液腫瘍で8.5~8歳(3~13歳に及ぶ)、固形腫瘍を有するイヌで9~8歳(3~14歳に及ぶ)であった。

【 0 0 9 6 】

腫瘍診断の手順は以前に記載された通りであった(von Euler et al., 2008)。この研究には合計35匹の品種が含まれた。含まれた最も一般的な品種は、ラブラドルレトリバー(13/105)、ゴールデンレトリバー(12/105)、ロットワイラー(11/105)、混血品種(11/105)、リッセンシュナウザー(11/105)、ドイツシェパード(7/106)、フラットコートレトリバー(5/105)、ノバスコシアレトリバーおよびボクサー(それぞれ3/105)、続いてノーリッチテリア、フォックステリア、ブルテリア、ベルンマウンテンドッグ、ローディアン・リッジバック、イングリッシュ・スプリング・スパニエル、および混血品種(それぞれ2/105)、クランバー・スパニエル、スコッチテリア、ドーベルマン、ホバワート、ノーリッチテリア、ウエストハイランドテリア、シェットランド・シープ・ドッグ、スウェーデン・エルク・ハウンド、フィールド・スパニエル、レオン・バーガー、ブローダー・クーリー、グレイハウンド、コッカー・スパニエル、フレンチブルドッグ、ワイマラナー、バグおよびオーストラリアシェパード(1/105)であった。

【 0 0 9 7 】

TK1抗体

ポリクローナル抗体を、イヌTK1のC末端領域中のペプチドに対し製造した。16量体の抗体を、N末端にシステインを付加した16アミノ酸の合成ペプチド(アミノ酸215~230、GKPGEGKEATGVRKLF、配列番号1; PAb-Arv1)(図1)を用いて産生した。この16量体のペプチドをキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合し、これをウサギ(GenScript, Piscataway, NJ, USA)の免疫感作のための抗原として、フロイントの完全アジュバントと混合した。抗血清を、第3回および第4回の免疫感作の後に集め、以前に記載されたように、ペプチド結合セファロース4Bカラム上で精製した(Wu et al., 2003)。24量体の抗体を、ヒトTK1の活性部位中の長円形のループ(long lasso shaped loop)(アミノ酸161~183、AYTKRLGTEKEVEVIGGADKYHS、配列番号2; Ar-4)に対して、N末端にシステインを付加して、以前に記載されたように(Gasparri et al., 2009)製造した。24量体ペプチドもまたKLHに結合し、マウスを免疫感作し、モノクローナル抗体を先に記載したように調製した(Gasparri et al., 2009)。Ar-4抗体は、AroCell・

10

20

30

40

50

AB (ウブサラ、スウェーデン) により提供された。

【0098】

Ar - 4 のビオチン化

Ar - 4 抗体を、製造業者の指示に従って Chromalink (商標) ビオチン抗体標識化キット (Solulink, California, USA) を使用してビオチン化した。このビオチン化 Ar - 4 抗体を、ストレプトアビジン - HRP を用いるウエスタンブロットングにより分析した。

【0099】

血清 TK1 活性アッセイ

血清サンプル中の TK1 活性を、以前に記載されたように (Sharif et al., 2012a; Kiran Kumar et al., 2013)、最適化された [³H] - dThdリン酸化アッセイを用いて決定した。簡単に言えば、10 μL の血清を、10 mM の Tris - HCl (pH 7.6)、2 mM のジチオスレイトール (DTT)、5 mM の MgCl₂、5 mM の NaF、5 mM の ATP、および 5 μM の [³H] - デオキシチミジンを含む反応混合物と 37 °C で 1 時間インキュベートし、DE - 81 濾紙ディスクに塗布した。この濾紙を次いで 1 mM のギ酸アンモニウムで各 5 分ずつ 2 回洗浄し、結合した生成物を 0.1 M の HCl および 0.2 M の KCl 中で 45 分間溶出させた。放射能を、以前に記載されたように (Sharif et al., 2012a) - シンチレーション計数により決定した。TK1 活性を pmol / 分 / mL として表した。

【0100】

イヌ血清中の TK1 を検出するための サンドイッチ ELISA の開発

Maxisorp、NUNC (デンマーク) タイプの ELISA プレート、炭酸緩衝液 (pH 9.6) 中の 100 μL の PAb - Arv1 抗 TK1 ポリクローナル抗体 (4 μg / mL) でコートし、4 °C で一晩インキュベートした。プレートを、Tecan ハイドロフレックス マイクロプレートウォッシャーを用い、洗浄緩衝液 (0.1 M の Tris、pH 7.4、0.3 M の NaCl、0.05% の Tween および 1% の BSA1) で 4 回洗浄した。その後、全ウェルを、室温で 1 時間、TBS-T で希釈した 5% 脱脂粉乳でブロックした。50 μL のイヌ血清サンプルを 50 μL の血清希釈緩衝液 (AroCell AB、ウブサラ) で希釈し、室温で 1 時間プレインキュベートした。ウェルを再度洗浄し、プレインキュベートした血清サンプルを添加した。次いでプレートを、ロッキングブラットホーム上で室温にて 2 時間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、ビオチン化 Ar - 4 抗体 (洗浄緩衝液中 4 μg / mL) を添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、プレートを上記のように洗浄し、洗浄緩衝液中で 1:32, 000 に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を添加し、1 時間インキュベートした。最終洗浄後に、TMB (Thermo Fisher Scientific) を添加し、15 分間発色させ、次いで 2 N の H₂SO₄ でクエンチした。このプレートを、Infinite・M200 マイクロプレートリーダー (Tecan、Mannedoerf、ドイツ) において 450 nm で読み取った。

【0101】

イヌ TK1 ELISA の検証

イヌ組換え TK1 を以前に記載されたように精製し (Sharif et al., 2012b)、標準曲線を、異なる濃度の組換えイヌ TK1 (サンプル希釈緩衝液中で希釈した 0.6 ~ 10 ng / mL) で確立した。この標準曲線を使用することにより、異なる血清サンプルの平均吸光度に基づいて、血清サンプル中の TK1 濃度を算出した。検出限界を、ゼロ校正物質の値とは有意に異なる値を与える最小検体濃度として推定した。アッセイ間変動もまた、2 つの異なる実験において二重に独立して試験された全ての血清サンプルの平均および SD から決定した。

【0102】

統計解析

健康体、血液学的腫瘍および固形腫瘍中の TK1 活性および TK1 タンパク質の分布を、

10

20

30

40

50

D'AgostinoおよびPearsonオムニバス正規性検定を用いて正規性について試験した。健康なイヌ、ならびに血液学的腫瘍および固形腫瘍を有するイヌにおけるSTK1活性およびタンパク質レベルは、非ガウス分布を示した。スเปルマン相関係数(rs)を用いて、TK1活性とTK1タンパク質レベルの間の相関を決定した。マンホイットニーのt検定を用いて、群間の差を評価した。感度および特異性分析およびアッセイの比較のために、受信者操作特性(ROC)曲線を構築した。統計解析を、Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。有意水準をP < 0.05に設定した。

【0103】

結果

ELISA手順の説明

ELISAの原理は、図2に示したサンドイッチ免疫酵素システムに基づいている。最初のステップは、イヌTK1のC末端領域中のペプチドに対して産生された精製ポリクローナル抗イヌTK1特異的抗体での、マイクロタイタープレートのコーティングである(PAb-Arv1、図1)。TK1のこの部分は、血液中で形成されるTK1タンパク質複合体の露出した領域である。粉乳(5%)でウェルをブロッキングした後、健康なイヌおよび腫瘍イヌ由来のプレインキュベートした血清サンプルを、プレート上の抗体に結合させた。特異的に結合されないタンパク質を、洗浄手順によって除去する。TK1の高度に保存され且つ露出された活性部位領域に対して作製された第2の抗体Ar-4を、ビオチン化し、ウェルに結合されたTK1と反応させた。発色基質(TMB)の添加によって視覚化される、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(HRP)複合体による抗原-抗体結合複合体の検出。呈色反応の強度は、血清サンプルに存在するTK1の量に比例する。

【0104】

ELISAの検出限界および精度

イヌ組換えTK1を、TK1-ELISAの用量応答曲線を生成するための校正物質として使用した。5つの異なる実験からの典型的な検量線を図3に示す。全ての非ゼロ校正点におけるアッセイ間の変動CVsは10%であった。アッセイの検出限界(LOD)は0.46 ng/mLであり、ラン間の不正確さ(CV)は0.63 ng/mLまでの濃度において<20%であった。血清サンプルの場合、アッセイ間変動は5~15%の範囲であり、アッセイ内変動は5%であった。健康なイヌ、血液悪性腫瘍を有するイヌおよび固形腫瘍を有するイヌ由来の、血清TK1活性およびTK1タンパク質レベルの中央値を以下の表1に要約する。

【0105】

【表1】

表1 - 健康なイヌ、血液悪性腫瘍を有するイヌおよび固形腫瘍を有するイヌ由来の血清中のTK1活性およびタンパク質レベル

群	サンプルの 番号 (N)	STK1活性 (pmol/min/mL)		STK1-ELISA (ng/mL)	
		範囲	中央値	範囲	中央値
健康	30	0.7 - 1.4	1.02	< 0.46 - 0.47	< 0.46
リンパ腫	31	0.54 - 29.8	2.43	< 0.46 - 4.38	0.78
白血病	5	1.33 - 58.7	38.3	< 0.46 - 4.19	3.92
乳癌	16	0.62 - 1.83	1.07	< 0.46 - 1.51	0.50
肥満細胞腫	8	0.51 - 1.52	0.85	< 0.46 - 1.1	0.50
悪性黒色腫	11	0.52 - 1.52	1.15	< 0.46 - 3.40	0.53
他の腫瘍	5	0.53 - 1.78	1.08	< 0.46 - 1.13	0.67

LOD未達のTK1-ELISA値を、0.46 ng/mL未達として表す。

【0106】

健康なイヌおよび血液腫瘍を有するイヌにおけるSTK1活性レベル

10

20

30

40

50

健康なイヌ群において、STK1活性は0.7~1.4 pmol/分/mL(表1)の範囲であり、中央値は1.02 pmol/分/mLであった。血液腫瘍を有するイヌ由来の血清中のSTK1活性レベルは、0.5~59 pmol/分/mLの範囲であった(表1)。健康なイヌおよび血液腫瘍を有するイヌで、STK1活性レベルにおいて雄および雌の間で有意差は見られなかった。Mann-WhitneyのU検定を用いた統計解析は、STK1活性が、健康なイヌと比較して血液腫瘍群で有意に高かった($P < 0.0001$ 、図4A)ことを示した。STK1活性アッセイ結果のROC曲線分析は、0.83の曲線下面積(AUC)($P < 0.0001$ 、95%CI、0.72~0.94)を示した(図4B)。1.35 pmol/分/mLのカットオフ値で、感度は75%(95%CI、0.578~0.878)であり、特異性は96%(95%CI、0.82~0.99)であった。

10

【0107】

健康なイヌおよび血液悪性腫瘍を有するイヌにおけるTK1・ELISA測定
臨床サンプル中のTK1タンパク質レベルを、異なる濃度の組換えイヌTK1を標準として使用することにより決定した。健康なイヌでは、STK1タンパク質レベルは0.46 ng/mL未満であり、30個の血清のうちの一つは0.47 ng/mLのタンパク質値を有した。30頭の健康なイヌに基づく正常な基準の推定上限は、0.46 ng/mLであった。リンパ腫または白血病のイヌ由来の血清は一般に、 $< 0.46 \sim 4.4$ ng/mLの範囲の、より高いSTK1タンパク質レベルを有した。健康なイヌと血液学的腫瘍のイヌの間でSTK1タンパク質レベルの中央値に有意差が見られた($P < 0.0001$ 、図4C)。ROC曲線分析は、0.94のAUCを示した($P < 0.0001$ 、95%CI、0.89~0.99)。0.46 ng/mLのカットオフ値を用いて、真陽性率は78%(95%CI、0.60~0.898)であり、偽陽性率は4%(95%CI、0.82~0.99)であった(図4D)。

20

【0108】

固形腫瘍を有するイヌ由来の血清中のSTK1の活性レベルおよびタンパク質レベル
固形腫瘍を有するイヌ由来の血清サンプルの大部分は、カットオフ値未満のSTK1活性を有した。STK1活性レベルは0.5~2.5 pmol/分/mLの範囲であった(中央値=1.02)。固形腫瘍群と健康群の間に有意差はなかった($P = 0.193$)(図5A)。ROC曲線分析は、0.56のAUCを示した($P = 0.43$ 、95%CI、0.41~0.69)。1.35 pmol/分/mLのカットオフ値を用いて、真陽性率は27%(95%CI、0.14~0.43)であり、偽陽性率は4%(95%CI、0.82~0.99)であった(図5B)。しかし、固形腫瘍群のイヌ由来の血清におけるTK1タンパク質レベル($< 0.46 \sim 3.4$ ng/mLの範囲)は、健康群と比較して有意に高かった($P < 0.0001$ 、図5C)。更に、ROC曲線分析は、0.88のAUC($P < 0.0001$ 、95%CI、0.80~0.95)を有した(図5D)。0.46 ng/mLのカットオフ値で、感度は62%(95%CI、0.458~0.772)であり、特異性は96%(95%CI、0.82~0.99)であった。これらの結果は、TK1-ELISAが固形腫瘍を有するイヌと健康なイヌを区別し得ることを強く示している。

30

40

【0109】

全般的に、健康な、血液学的腫瘍および固形腫瘍のイヌにおけるSTK1活性アッセイ値は、STK1・ELISA(ng/mL)値に対して有意な相関、即ち、線形回帰分析を用いて $r = 0.64$ ($P < 0.0001$)を示した。血液学的腫瘍および固形腫瘍を有するイヌ由来の血清は、リンパ腫、白血病および乳腺腫瘍、肥満細胞腫および黒色腫として更に細分類された。図6Aおよび図6Bは、異なる下位分類におけるlog STK1活性分布を示す一方、図6Cおよび6Dは、異なる下位分類におけるlog STK1タンパク質レベルを示す。

【0110】

リンパ腫を有するイヌの化学療法中に追跡される血清TK1活性およびタンパク質レベル

50

リンパ腫を有するイヌは、しばしばドキシソルピシンに基づく多剤プロトコル (A D R I A - P l u s) を用いて治療される。A D R I A - p l u s の各投与の前後に、6匹のイヌから血清サンプルを採取した。当初、5匹のイヌで高いS T K 1活性およびS T K 1タンパク質値が見出され、6匹のイヌのうち4匹は、最初の治療後にS T K 1活性およびS T K 1タンパク質レベルの著しい低下を示し、これはカットオフ値と同等またはそれ以下のレベルに至った (図7A、図7B)。2匹の患者 (番号8、9) では、3回目の治療中にS T K 1活性およびS T K 1タンパク質が増加したが、4回目の治療後にレベルは減少した。2匹の患者 (患者番号5、17) では、S T K 1活性およびS T K 1タンパク質レベルが第1回の治療後に増加し第2回の治療後に減少したが、第3回および第4回の治療後には再び増加し、その後、第5回の治療後に減少した。1匹の患者 (患者番号19) は、2回目の治療後に明らかに完全寛解状態にあった。完全寛解状態にあったリンパ腫を有するイヌのS T K 1活性およびS T K 1タンパク質の平均値は、健康対照におけるS T K 1と顕著に異ならなかった。しかしながら、2匹の患者 (患者番号11、37) は、化学療法に対する異なる応答パターンを示した。患者番号11は、第1回の治療後にS T K 1活性およびS T K 1タンパク質レベルの顕著な減少を示した。その後、第2回および第3回の治療後にS T K 1レベルが上昇し、この患者は腫瘍再発を有し、それ以上治療には応答しなかった。しかしながら、2匹の患者 (患者番号11、37) は、化学療法に対する異なる応答パターンを示した。患者番号11は、第1回の治療後に、S T K 1活性およびS T K 1タンパク質レベルの顕著な減少を示した。その後、第2回および第3回の治療後にS T K 1レベルが上昇し、この患者は腫瘍再発を有し、それ以上治療には応答しなかった。患者番号37は、第1回の治療後にS T K 1活性およびS T K 1タンパク質レベルの顕著な増加を示した。更なる治療過程に際し、第2回および第3回の治療後にはS T K 1レベルに僅かな減少が見られたが、S T K 1活性およびS T K 1タンパク質レベルは対照と比較して顕著に高かった。更に、このイヌもまた治療に応答せず、イヌは両方とも後で安楽死させた。ここに示した結果は、S T K 1活性およびS T K 1タンパク質アッセイの両方が、イヌリンパ腫の予後および治療効率に関する情報を提供し得ることを強く示している。

【0111】

考察

以前の研究は、血清T K 1活性測定値が、イヌの血液腫瘍の予後および治療モニタリングにとって有益であることを実証している。しかしながら、これらの活性アッセイは、危険で高価な放射性同位体の使用を伴うため複雑であり、従ってT K 1活性アッセイの臨床的有用性を制限する。E L I S A はほぼ全ての臨床検査室で一般的に使用されているため、E L I S A イムノアッセイを開発することで、T K 1のバイオマーカーとしての臨床的有用性が大幅に向上する。T K 1抗体に基づくイムノアッセイを用いるヒトの医学研究では、それらが種々の腫瘍疾患の予後およびモニタリングのための敏感なツールであることが示された。ヒト医学において抗体ベースのT K 1 - E L I S A を確立するための幾つかの試みがなされてきたが、ごく最近になってやっと、ある堅牢なE L I S A が研究用のみの製品として利用可能である (A r o C e l l A B、スウェーデン)。これはおそらく、T K 1の血清型に対して十分な親和性を有する抗体を得るのが困難なためであった。血清中に見出されるT K 1オリゴマーの複雑さが、異なるタイプの抗T K 1抗体との再現性のある反応性を妨げるという可能性が最も高い。

【0112】

1つの予備的研究で、ヒトT K 1の活性部位中の長円形のループ (l o n g l a s s o l o o p) (アミノ酸161~183) に対する抗体が使用された。この領域は、イヌT K 1配列 (図1) において高度に保存されており、A r - 4 (v o n E u l e r & E r i k s s o n , 2 0 1 1) の産生にも使用された。これらの抗体が、イヌリンパ腫組織中の細胞T K 1を検出したことは明らかであった。別の研究では、イヌT K 1のC末端領域由来のペプチドに対して産生された2つの抗体を用いて、イヌT K 1の組換え型、細胞型および血清型が検出でき特徴付けられた (S h a r i f e t a l . , 2 0 1 2 b)

10

20

30

40

50

。幾つかの類似点があるが、特にヒトおよびイヌ血清 T K 1 のオリゴマー構造において相違点も存在する。

【 0 1 1 3 】

最近の研究は、イヌ抗 T K 1 抗体を用いたイムノアフィニティアッセイが、血液学的腫瘍および固形腫瘍由来の血清中の T K 1 レベルを測定できることを報告し、かつ T K 1 タンパク質アッセイが T K 1 活性アッセイよりも感度が高いことを示した (K i r a n K u m a r ら、2 0 1 3) 。更に、研究は、固形腫瘍を有するイヌ由来の血清は、健康なイヌと比較して低い T K 1 活性を有するが、比較的高レベルの T K 1 タンパク質を有することを示している。

【 0 1 1 4 】

イヌ T K 1 - E L I S A が本明細書に開示されるように開発され、それは従来の T K 1 放射性同位元素アッセイの限界を克服できる。血液腫瘍の R O C 曲線分析は、T K 1 - E L I S A および T K 1 活性アッセイの両方が 7 5 % の感度および 4 % の偽陽性率を有することを示した。これは、両方のアッセイが、臨床的な日常的实施のために十分正確で且つ敏感であり得ることを示す。しかしながら、T K 1 活性アッセイは、固形腫瘍患者と健康体を区別できず、これははるかに低い感度 (2 7 %) の R O C 曲線によって示された。T K 1 - E L I S A は、これらの群を区別でき、T K 1 活性アッセイよりも 2 倍高い感度 (6 2 %) を有した。更に、T K 1 タンパク質レベルは、腫瘍寛解をもたらす化学療法後に正常 (ベースラインレベル) に戻り、リンパ腫を有するイヌの T K 1 活性レベルと同様に、再発患者ではより高いレベルに増加する。治療中の少数の患者において T K 1 タンパク質レベルの一時的な上昇が見られ、これは薬物毒性のために死んだ細胞からの T K 1 放出に起因する可能性がある。

【 0 1 1 5 】

更に、以前の研究からのサイズ排除分析は、血清 T K 1 が高分子量凝集体として存在し、これはイヌリンパ腫の場合には酵素的に活性であることを示した。興味深いことに、乳房腫瘍イヌ由来の血清は、活性のある T K 1 高分子量凝集体の小部分を有したが、タンパク質の大部分は明らかに不活性であった (J a g a r l a m u d i e t a l . , 2 0 1 4) 。上記 2 つのアッセイの結果の間には依然として強い相関 ($r_s = 0.64$) が見られた。これは、T K 1 の分子形態が、上記 2 つのアッセイ間で観察された全体的な相関に寄与していることを示す。新しい E L I S A の有効性は、増殖バイオマーカとしての T K 1 の臨床的有用性を増加させるであろうし、また獣医学における予後および血液腫瘍のモニタリングのために価値を有するに違いない。

【 0 1 1 6 】

本研究は、T K 1 タンパク質レベルを決定するための新しい T K 1 - E L I S A を記載し、これはイヌの血液腫瘍の診断およびモニタリングのための潜在的マーカであり得る。T K 1 - E L I S A は実施が容易で、迅速であり、また既存の T K 1 活性アッセイと同様に高感度で且つ特異的である。

【 0 1 1 7 】

実施例 2

以下の実験は、イヌおよびネコの T K 1 配列の異なる領域由来のペプチドに対して生成されたイヌ T K 1 抗血清の反応性を実証した。T K 1 のペプチド配列の大部分は、幾つかのアミノ酸の違いを除き、ヒト、イヌ、ネコおよびウマの T K 1 配列において保存されている。図 1 を参照されたい。しかし、T K 1 タンパク質の C 末端において、上記複数の T K 1 配列間に相当に大きな多様性が存在する。

【 0 1 1 8 】

T K 1 抗血清

二つの異なるポリクローナルウサギ抗血清 (C T K 1 p - 2 1 1、C T K 1 p - 2 1 5) が、イヌ T K 1 の C 末端領域由来のペプチドを用いて産生され、かつ 1 つの抗血清 (C T K 1 p - 1 6 1) がイヌ T K 1 の活性部位領域から産生された。第 1 のイヌ T K 1 ペプチド配列抗血清 (C T K 1 p - 2 1 5) は、1 6 アミノ酸合成ペプチド (イヌ T K 1 のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸 215 - 230 ; 図 1) に N 末端システインが付加されたもの (C G K P G E G K E A T G V R K L F 、配列番号 : 5) に対するものであった。第 2 の抗血清 (C T K 1 p - 211) は、15 アミノ酸ペプチド (イヌ T K 1 のアミノ酸 211 - 225 ; 図 1) に N - 末端システインが付加されたもの (C V L V P G K P G E G K E A T G 、配列番号 12) を用いて産生された。C T K 1 p - 161 抗血清は、イヌ T K 1 の高度に保存された活性部位配列 (イヌ T K 1 のアミノ酸 161 - 183 ; 図 1) に N 末端システインが付加されたもの (C A Y T K R L G T E K E V E V I G G A D K Y H S 、配列番号 8) を用いて産生された。F T K 1 p - 213 抗血清は、ネコ T K 1 の C 末端領域 (ネコ T K 1 のアミノ酸 213 - 227 ; 図 1) に N 末端システインが付加されたもの (C G K P G E A S G A R K L F A P 、配列番号 14) に対して生成された。これらペプチドの全ては、キャリアタンパク質 K L H へのカップリングのために N 末端に付加されたシステインを有した。ペプチドキャリア複合体を、ウサギ (G e n S c r i p t , P i s c a t a w a y , N J , U S A) の免疫感作のための抗原として使用した。試験した抗血清を、第 3 回および第 4 回の免疫感作後に収集した。ネコおよびウマ組換え T K 1 タンパク質のクローニングおよび発現を、イヌ T K 1 タンパク質について記載したように行った (J a g a r l a m u d i e t a l . , 2015) 。

10

【0119】

ドットプロットイムノアッセイ

4 つの異なる T K 1 抗血清の全てを、ドットプロットアッセイを用いて、組換えイヌ、ネコおよびウマ T K 1 との反応性について試験した。簡単に言えば、3 μ L の異なる希釈の組換え T K 1 調製物を、ニトロセルロース膜 (B i o - R a d) 上に塗布した。膜を乾燥させ、T B S T (トリス緩衝生理食塩水 (T B S) およびポリソルベート 20 (T w e e n 20 としても知られている) の混合物) で希釈した 5 % 脱脂粉乳で室温にて 1 時間ブロックした。この膜を T B S T で 3 回洗浄し、次いで T S B T 中に希釈した (1 : 300) 異なる T K 1 抗血清と室温で 2 時間インキュベートした。洗浄手順を繰り返し、その膜をストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) (希釈 : T B S 中で 1 : 20 , 000) と 1 時間インキュベートした。最終洗浄の後、その膜を E C L 化学発光剤 (G E h e a l t h c a r e , ウプサラ) と 1 分間インキュベートした。膜を B i o - R a d 社の c h e m i ・ d o c タッチシステムでスキャンした。ドットの強度を、イメージゲージ 3 ソフトウェアで定量した。

20

30

【0120】

結果および考察

図 8 A ~ 8 D は、4 つの異なる T K 1 抗血清とのイヌ、ネコおよびウマ組換え T K 1 によるドットプロットイムノアッセイの結果を示す。図 9 A ~ 9 C は、4 つの異なる T K 1 抗血清との異なる濃度のイヌ、ネコおよびウマ組換え T K 1 による任意単位でのドット強度を示す。

【0121】

図 8 および 9 に示すように、組換えイヌ、ネコおよびウマ T K 1 と反応する抗体の産生を誘発するための、様々な C 末端ペプチド (C T K 1 p - 215 、 C T K 1 p - 211 および F T K 1 p - 213) の能力には大きな差がある。明らかに、C T K 1 p - 211 は、試験した全ての組換え T K 1 タンパク質との高い反応性を有する抗体を与えたが、イヌ T K 1 に対する明確な選択性を示した。C T K 1 p - 215 はイヌおよびウマ T K 1 に対する抗血清を与え、一方で F T K 1 p - 213 はウマ T K 1 と反応性の抗体を産生したのみであった。C T K 1 p - 161 は、3 種類の T K 1 タンパク質の全てと反応する抗体を生じ、ネコ T K 1 について優れていた。

40

【0122】

実施例 3

実施例 1 の手順を繰り返したが、以下の違いがあった。

【0123】

イヌ血清中の T K 1 を検出するためのサンドイッチ E L I S A 法

50

Maxisorp、NUNC（デンマーク）マイクロタイタープレートを、炭酸緩衝液（pH 9.6）中のCTK1p-215抗TK1ウサギポリクローナル抗体（4 μg/mL）100 μLでコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。プレートを、Tecanハイドロ・フレックス・マイクロプレート洗浄機を用いて、洗浄用緩衝液（Tris、0.1 M、pH 7.4、NaCl 0.3 M、Tween 0.05%およびBSA 1%）で4回洗浄した。その後、全ウェルを、室温で1時間、TBSTで希釈した5%脱脂粉乳でブロックした。50 μLのイヌ血清サンプルを50 μLのサンプル希釈バッファーで希釈し、室温で1時間プレインキュベートした。プレートを再度洗浄し、プレインキュベートした血清サンプルを添加した。次いで、プレートを、ロッキングプラットホーム上にて室温で2時間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、ビオチン化CTK1p-161抗体（洗浄緩衝液中4 μg/mL）を添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを上記のように洗浄し、洗浄緩衝液中で1:10,000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）（Thermo Fisher Scientific）を添加し、30分間インキュベートした。最終洗浄後に、TMB（Thermo Fisher Scientific）を添加し、15分間発色させ、次いで2 NのH₂SO₄でクエンチした。このプレートを、参照波長として540 nmを使用してInfiniteのM200マイクロプレートリーダー（Tecan, Mannedoerf, ドイツ）において450 nmで読み取った。

10

【0124】

この実施例3からの結果を、図10および図11A～図11Dに示す。より詳細には、図10は、異なる濃度の組換えTK1についての、CTK1p-215コーティングおよび検出抗体としてCTK1p-161を用いた標準曲線を示す。図11Aは、健康なイヌおよび血液悪性腫瘍を有するイヌ由来の血清中の、log STK1・ELISAタンパク質レベルを示す。図11Bは、血液腫瘍のイヌと健康なイヌの識別のための対応するROC曲線を示す。図11Cは、健康なイヌおよび固形腫瘍を有するイヌ由来の血清中のlog STK1・ELISAタンパク質レベルを示す。図11Dは、固形腫瘍イヌと健康なイヌの識別のための対応するROC曲線を示す。

20

【0125】

同じ手順を使用したが、抗体を変更した。CTK1p-211抗TK1ポリクローナル抗体をコーティングに使用し、ビオチン化CTK1p-215を検出に使用した。

30

【0126】

これらの抗体の結果を、図12および図13A～13Bに示す。図12は、異なる濃度の組換えTK1についての、CTK1p-211コーティングおよび検出抗体としてCTK1p-215を用いた標準曲線を示す。図13Aは、健康なイヌおよび血液悪性腫瘍を有するイヌ由来の血清中のlog STK1・ELISAタンパク質レベルを示す。図13Bは、健康なイヌと血液学的腫瘍イヌの識別のための、対応するROC曲線を示す。

【0127】

上述した実施形態は、本発明の幾つかの例示的な実施形態として理解されるべきである。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変更、組み合わせ、および変更を実施形態に加え得ることを理解するであろう。特に、異なる実施形態における異なる部分解決策は、技術的に可能な場合には他の構成で組み合わせることができる。しかしながら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって定められるものである。

40

【0128】

参考文献

Alegre, M.M., Weyant, M.J., Bennett, D.T., Yu, J.A., Ramsden, M.K., Elnaggar, A., Robison, R., O'Neill, K.L., 2014. Serum detection of thymidine kinase 1 as a means of early detection of lung cancer. *Anticancer Research* 34, 2145-2152.

50

Carlsson, L., Larsson, A., Lindman, H., 2009. Elevated levels of thymidine kinase 1 peptide in serum from patients with breast cancer. *Uppsala Journal of Medical Sciences* 114, 116-120.

Gasparri, F., Wang, N., Skog, S., Galvani, A., Eriksson, S., 2009. Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan (TM) assays. *Eur J Cell Biol* 88, 779-785.

10

Jagarlamudi, K.K., Westberg, S., Ronnberg, H., Eriksson, S., 2014. Properties of cellular and serum forms of thymidine kinase 1 (TK1) in dogs with acute lymphocytic leukemia (ALL) and canine mammary tumors (CMTs): implications for TK1 as a proliferation biomarker. *BMC veterinary research*, 10:228.

Jagarlamudi, K.K., Hansson, L.O., Eriksson, S., 2015. Breast and prostate cancer patients differ significantly in their serum Thymidine kinase 1 (TK1) specific activities compared with those hematological malignancies and blood donors: implications of using serum TK1 as a biomarker. *BMC Cancer*, 15:1073.

20

Kiran Kumar, J., Sharif, H., Westberg, S., von Euler, H., Eriksson, S., 2013. High levels of inactive thymidine kinase 1 polypeptide in sera from dogs with solid tumours by immunoaffinity methods: Implications for in vitro diagnostics. *The Veterinary Journal* 197, 854-860.

30

Kiran Kumar, J., Immunoassays for detection of serum Thymidine kinase 1 in Dog lymphomas and carcinomas, Master Thesis in Animal Sciences, Uppsala 2010.

Sharif, H., von Euler, H., Westberg, S., He, E., Wang, L., Eriksson, S., 2012 a. A sensitive and kinetically defined radiochemical assay for canine and human serum thymidine kinase (TK1) to monitor canine lymphoma. *The Veterinary Journal* 194, 40-47.

40

Sharif, H., Jagarlamudi, K.K., Wang, L., He, E., Eriksson, S., 2012 b. Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of Thymidine Kinase 1 from dogs and humans. *BMC Biochemistry* 13, 12.

von Euler, H., Ohrvik, A.B., Eriksson, S.K., 2006. A non-radiometric method for mea

50

asuring serum thymidine kinase activity in malignant lymphomas in dogs. Research in Veterinary Science 80, 17-24.

von Euler, H., Rivera, P., Aronsson, A.C., Bengtsson, C., Hansson, L.O., Eriksson, S.K., 2008. Monitoring therapy in canine malignant lymphoma and leukemia with serum thymidine kinase 1 activity - Evaluation of a new, fully automated non-radiometric assay. International Journal Oncology 34, 505-510.

10

von Euler, H., Eriksson, S., 2011. Comparative aspects of thymidine kinase 1 in human and canine tumor diseases. Vet Comp Oncol, 9: 1-15.

Wu, C., Yang, R., Zhou, J., Bao, S., Zou, L., Zhang, P., Mao, Y., Wu, J., He, Q., 2003. Production and characterization of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. Journal of Immunological Methods 277, 157-169.

20

【図面】

【図 1】

```

MSCINLPTVLFSGSPKTRGQIQVILGPMFSGKSTELMRRVRRFQIAQYKLVIKYAKDTR-60
MSCINLPTVLFSGSPKTRGQIQVILGPMFSGKSTELMRRVRRFQIAQYKLVIKYAKDTR-60
MSCINLPTVLFSGSPKTRGQIQVILGPMFSGKSTELMRRVRRFQIAQYKLVIKYAKDTR-60
*****
YSSSFCTHRTMEALPACLLRDVAQAEALGVAVIGIDEGQFFPDIMEFCEANAGKTVI-120
YSSSFCTHRTMEALPACLLRDVAQAEALGVAVIGIDEGQFFPDIVEISETMANAGKTVI-120
YSSSFCTHRTMEALPACLLRDVAQAEALGVAVIGIDEGQFFPDIVEISETMANAGKTVI-120
YSSNFCTHRTMEALPACLLRDVAQAEALGVAVIGIDEGQFFPDIVEISETMANAGKTVI-120
*****
CTK1p-161 / Ar4
VAALDGTQRKPFAGAILNLVPLAESVVKLTAVCMCFREAAAYTKRLGTEKEVEVIGGADK-180
VAALDGTQRKAFGTIILNPLAESVVKLTAVCMCFREAAAYTKRLGTEKEVEVIGGADK-180
VAALDGTQRKAFGTIILNPLAESVVKLTAVCMCFREAAAYTKRLGTEKEVEVIGGADK-180
*****
CTK1p-211
YHSVCRLCYFKKASGQAGPD---NKENCFV---GKPG---EAVAAKRLFAPQQLQCSFAN-234
YHSVCRLCYFKKASGLPAGDGENKENCP---GKPG---EASGARKLFAPHQILQCSFAN-237
YHSVCRLCYFKKASGPPMGLSDSKENKENVLVLVPGKPGEGKEATGVRKLFAPHQILQCSFAN-237
YHSVCRLCYFKKPLGQAGLDSTENKENFV---GKPG---EATGARKLFAPHQILQCSFAN-237
*****
CTK1p-215 / Pab-Arv1
CTK1p-213

```

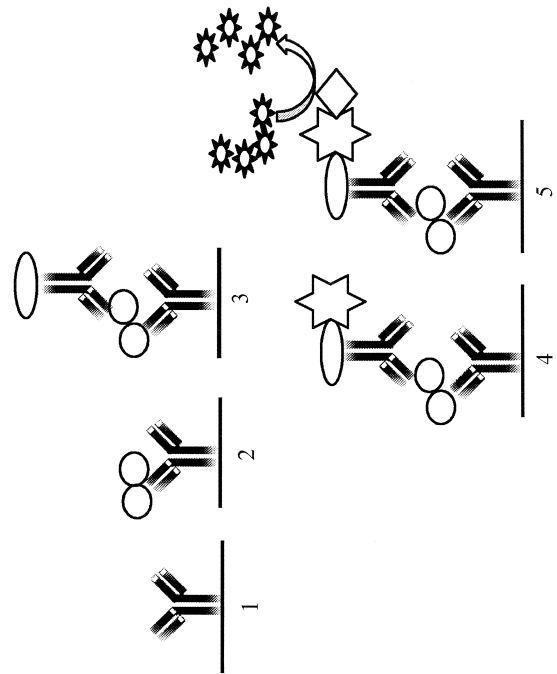
ヒト
ネコ
イヌ
馬

ヒト
ネコ
イヌ
馬

ヒト
ネコ
イヌ
馬

ヒト
ネコ
イヌ
馬

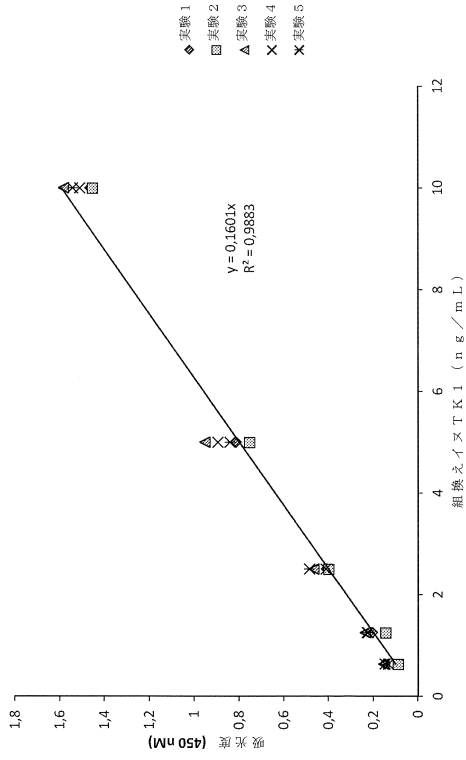
【図 2】



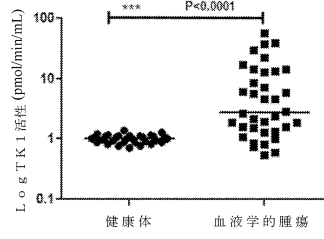
30

40

【図 3】



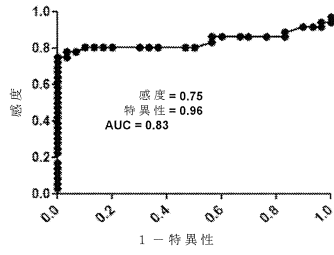
【図 4 A】



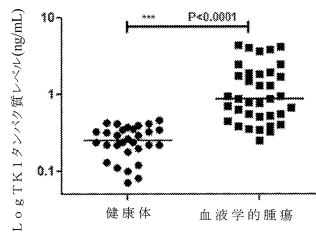
10

20

【図 4 B】



【図 4 C】

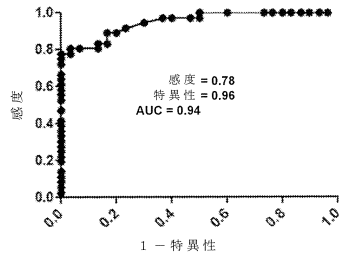


30

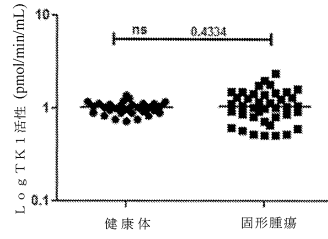
40

50

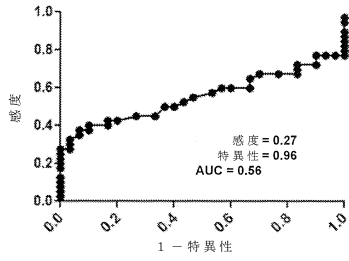
【図 4 D】



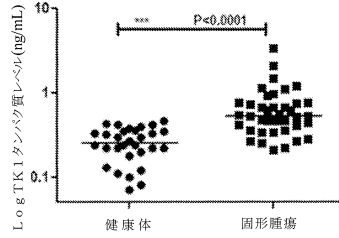
【図 5 A】



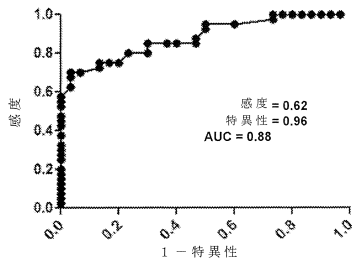
【図 5 B】



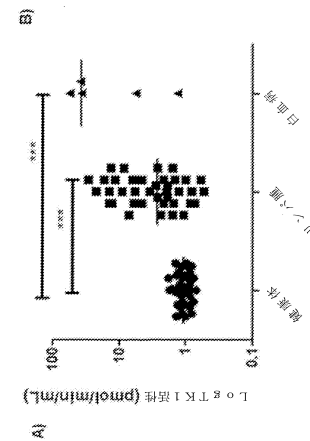
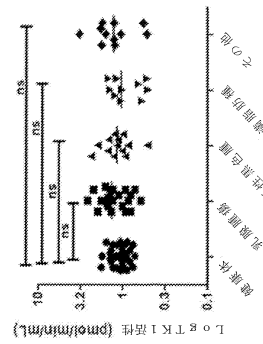
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6 - 1】



10

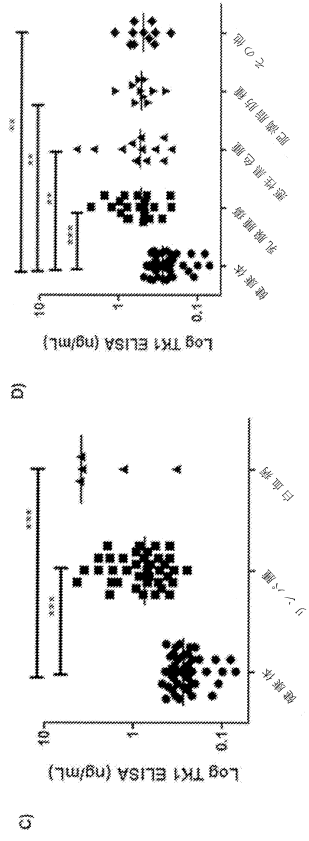
20

30

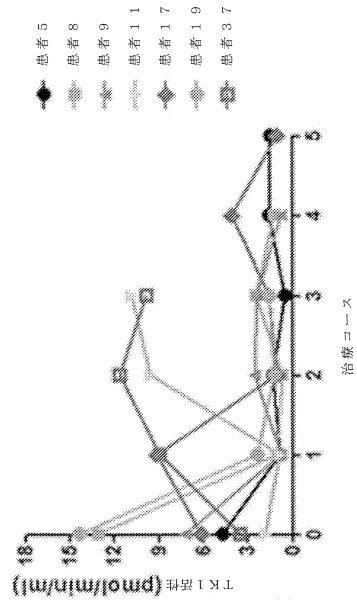
40

50

【図 6 - 2】



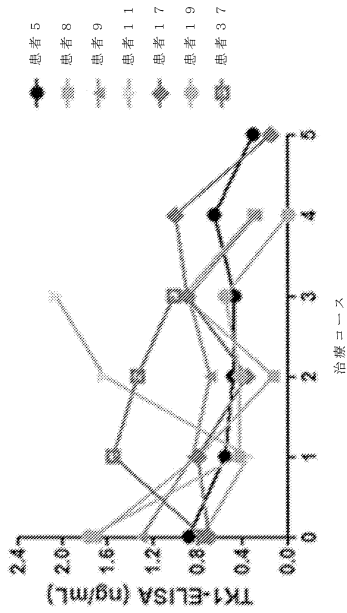
【図 7 A】



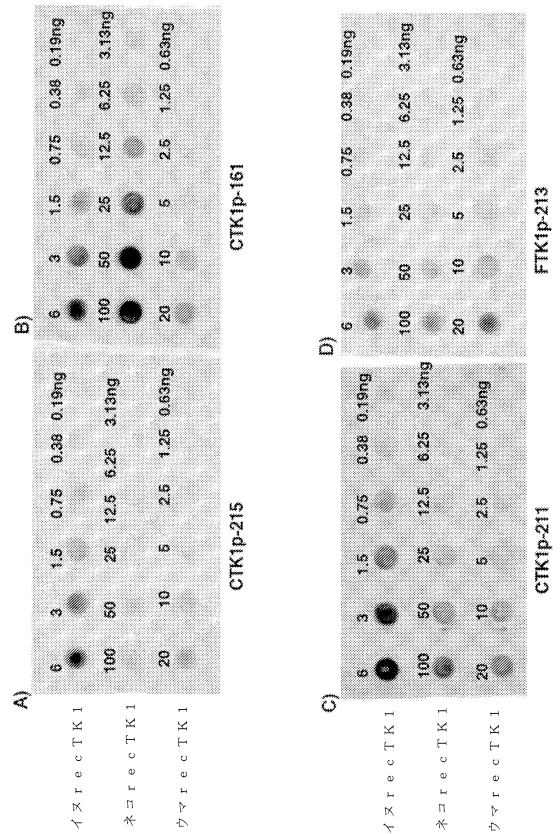
10

20

【図 7 B】



【図 8】

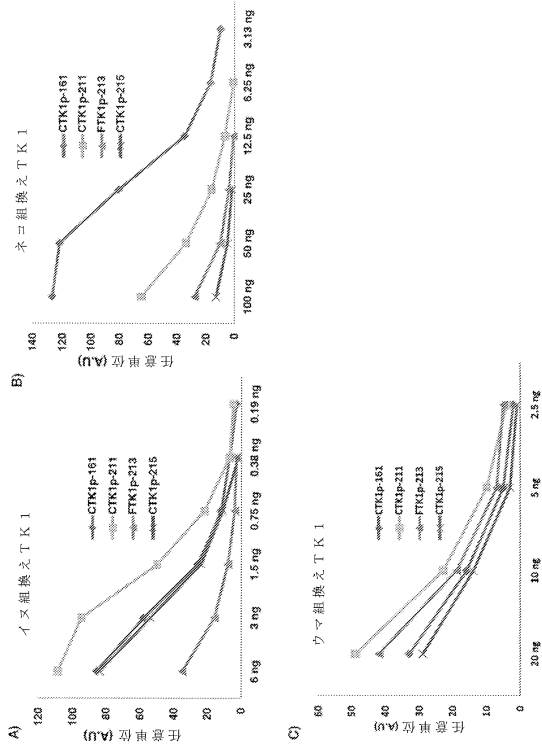


30

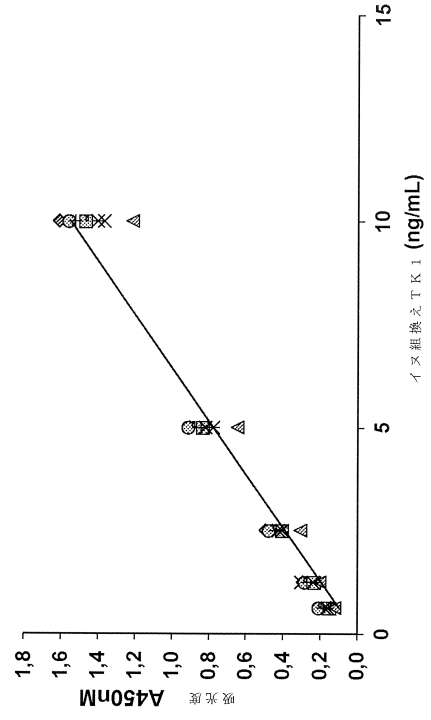
40

50

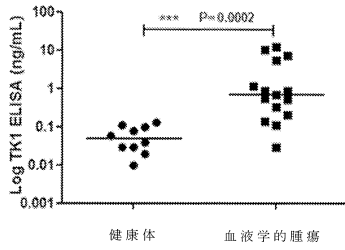
【 9 】



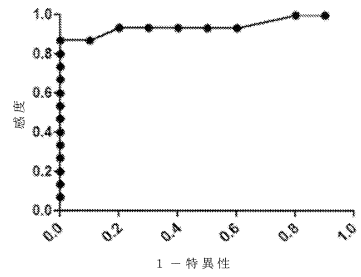
【 10 】



【 11 A 】



【 11 B 】



10

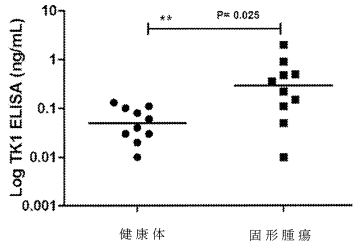
20

30

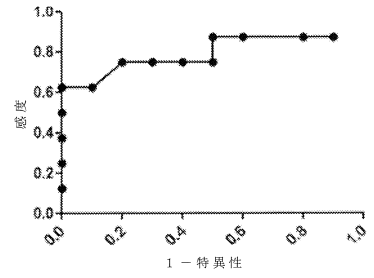
40

50

【図 1 1 C】

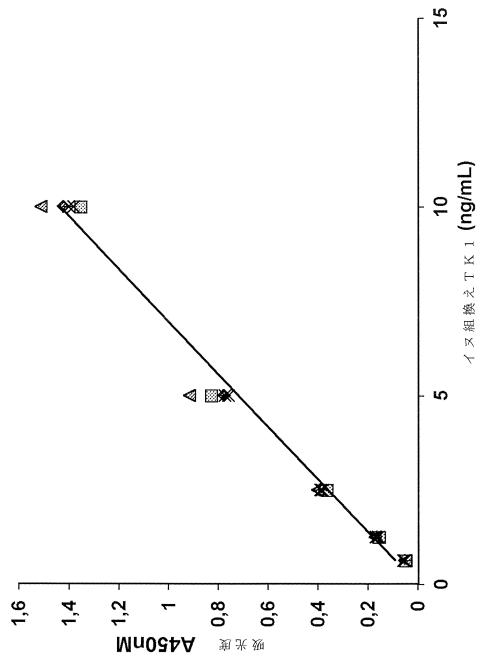


【図 1 1 D】

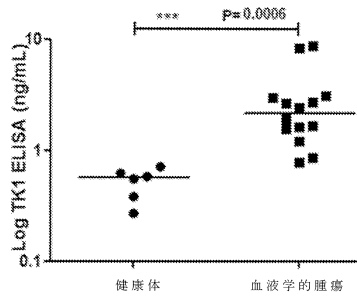


10

【図 1 2】

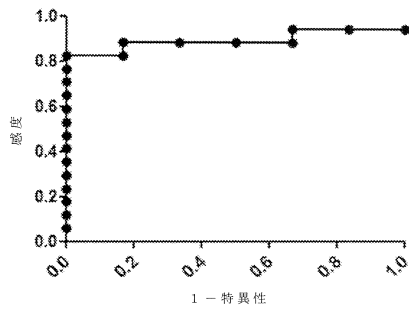


【図 1 3 A】



20

【図 1 3 B】



40

【配列表】

0007015294000001.app

50

フロントページの続き

- ゲ, ビヨンボ 55
- (72)発明者 ロンバーグ, ヘンリケ
スウェーデン国, エスイー - 7 5 2 4 0 ウブサラ, グラバルグスヴァーゲン 4
- (72)発明者 ジャガラムディ, キラン クマール
スウェーデン国, エスイー - 7 5 2 5 8 ウブサラ, プロドステンスヴァーゲン 1 4
- 審査官 三好 貴大
- (56)参考文献 特表2008-500396(JP, A)
特表2006-526156(JP, A)
国際公開第2015/094106(WO, A1)
国際公開第2008/142664(WO, A2)
米国特許第05698409(US, A)
Kiran Kumar Jagarlamudi et al., A New Sandwich ELISA for Quantification of Thymidine Kinase 1 Protein Levels in Sera from Dogs with Different Malignancies Can Aid in Disease Management, PLoS ONE, 2015年09月14日, 10(9), e0137871
Sharif Hanan et al., Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of Thymidine Kinase 1 from dogs and humans, BMC Biochemistry, 2012年, 13:12, 1-10
Kiran Kumar Jagarlamudi et al., Properties of cellular and serum forms of thymidine kinase 1 (TK1) in dogs with acute lymphocytic leukemia (ALL) and canine mammary tumors (CMTs): implications for TK1 as a proliferation biomarker, BMC Veterinary Research, 2014年10月08日, 10:228, 1-12
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 0 7 K 1 6 / 4 0
C 1 2 N 9 / 1 2