



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 899**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02703238 .2**
86 Fecha de presentación : **23.01.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1370869**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54 Título: **Detección y cuantificación de Cripto-1.**

30 Prioridad: **26.01.2001 US 264643 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **The Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services National Institutes of Health, suite 325 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es: **Bianco, Caterina y Salomon, David**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 278 899 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección y cuantificación de Cripto-1.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos y composiciones para la detección y cuantificación de Cripto-1. De manera concreta, la presente invención proporciona procedimientos y composiciones para la detección y cuantificación de Cripto-1 en muestras tales como leche, plasma, suero y otros fluidos biológicos.

10 **Antecedentes de la invención**

La Cripto-1 humana (CR-1) es un miembro de una familia más grande de proteínas estructuralmente relacionadas, denominada la familia EGF-CFC que incluye CR-1 de ratón, ratón *críptico*, FRL-1 de *Xenopus* y pez cebra de ojo pequeño (oep) (Ciccociola y col., EMBO J., 8:1987-1991 [1090]; Dono y col., Develop., 118:1157-1168 [1993]; Shen y col., Develop., 124:428-442 [1997]; Kinoshita y col., Cell 83:621-630 [1995]; y Zhang y col., Cell 92:241-251 [1997]). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de un dominio similar a la EGF modificada y por un segundo dominio rico en cisteína denominado dominio CFC (Salomón y col., BioEssays 21:61-70 [1999]) y la Patente de los Estados Unidos 5.792.616. Ellas comparten también una secuencia señal convencional y un término C hidrófobo que es esencial para el anclado a la membrana por una fracción glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Minchiotti y col., Mech. Develop., 90:133-142 [2000]). Los genes CR-1 humano y CR-1 de ratón codifican la glicoproteínas de los aminoácidos 188 y 171 de manera respectiva, con pesos moleculares de 28 y 24 kDa, de manera respectiva (Brandt y col., J. Biol. Chem., 269: 17320-17328 [1994]). Las proteínas EGF-CFC llevan a cabo un papel esencial durante la embriogénesis temprana de los vertebrados promoviendo la formación del mesodermo y la migración celular durante la gastrulación (Zhang y col., más arriba; Gritsman y col., Cell 97:121-132 [1999]; y Ding y col., Nature 395: 702-707 [1998]). El ARNm de CR-1 y la proteína inmunorreactiva se expresan en diversas líneas celulares de cánceres de mama humanos, en aproximadamente el 80% de los carcinomas de mama primarios y en tumores de mama que se presentan en ratones que sobreexpresan diferentes transgenes en la glándula mamaria tal como *c-neu*, el factor α de crecimiento transformante (TGF α), int-3, el gen T del políoma medio, y el gen T grande del SV40 (Kenney y col., Mol Carcinogen., 15:44-56 [1996]; Qi y col., Brit. J. Cancer 69:903-910 [1994]; y Dublín y col., Int. J. Oncol., 7:617-622 [1995]). Se puede detectar también CR-1 en la glándula mamaria de ratón en desarrollo con diferentes niveles de expresión, en la glándula mamaria de virgen, de embarazada, de lactante y de anciana (Kenney y col., Mol Reprod. Develop., 41:277-286 [1995]). En la glándula mamaria de virgen, la expresión de CR-1 se encuentra principalmente en las células madre del remate de las yemas de los extremos terminales en crecimiento y la expresión de CR-1 aumenta en varias veces en las células del epitelio ductal durante el embarazo, la lactancia y en la glándula mamaria de anciana (Kenney y col., Mol. Reprod. Develop., 41:277-286 [1995]; y Herrington y col., J. Cell. Physiol., 131:215-226 [1997]). De manera adicional, CR-1 puede modular la expresión de las proteínas de la leche en una línea celular epitelial mamaria de ratón (HC-11) y en cultivos primarios de explante mamario de ratón (De Santis y col., Cell Growth Different, 8:1257-1266 [1997]). Sin embargo, a pesar de la identificación de CR-1 en glándulas mamarías, su papel en la salud y enfermedad del mamífero ha permanecido durante bastante tiempo desconocido. De esta manera permanece una necesidad en la técnica de procedimientos que proporcionen la detección y cuantificación simple de Cripto-1 en diversos fluidos biológicos.

Resumen de la invención

45 La presente invención proporciona procedimientos para la detección y cuantificación de Cripto-1. De manera concreta, la presente invención proporciona procedimientos para la detección y cuantificación de Cripto-1 en muestras tales como leche (por ejemplo, leche humana) y otros fluidos biológicos.

50 La presente invención proporciona procedimientos para la detección de Cripto-1, que comprenden: proporcionar un fluido biológico sospechoso de contener Cripto-1, y un anticuerpo dirigido contra Cripto-1; exponer el fluido biológico al anticuerpo bajo condiciones tales que Cripto-1 y el anticuerpo enlacen para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y detectar el complejo antígeno-anticuerpo. En algunas formas de realización preferidas se selecciona el fluido biológico entre el grupo constituido por leche, suero, y plasma. En algunas formas de realización más particularmente preferidas, el fluido biológico es de un ser humano. En formas de realización adicionales, el anticuerpo se selecciona entre el grupo constituido por anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. En formas de realización preferidas alternativas el procedimiento es un procedimiento de ensayo inmunsorbente de enzimas ligadas. En formas de realización más adicionales, el procedimiento comprende además la etapa de cuantificar la cantidad de Cripto-1 en el fluido biológico midiendo la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo.

60 La presente invención proporciona también procedimientos para cuantificar Cripto-1 en un fluido biológico que comprende: proporcionar un fluido biológico que contenga Cripto-1, y un anticuerpo dirigido contra Cripto-1; exponer el fluido biológico al anticuerpo bajo condiciones tales que Cripto-1 y el anticuerpo enlacen para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y medir la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo. En algunas formas de realización preferidas, se selecciona el fluido biológico entre el grupo constituido por leche, suero, y plasma. En algunas formas de realización particularmente preferidas, el fluido biológico es de un ser humano. En formas de realización adicionales, se selecciona el anticuerpo entre el grupo constituido por anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. En formas de realización preferidas alternativas, el procedimiento es un procedimiento de ensayo inmunsorbente de enzimas ligadas.

Descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona los resultados del análisis de la transferencia Western de CR-1 en 24 muestra de leche humana (ensayado en un gel SDS-PAGE al 4-20%) y sondadas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CR-1.

La Figura 2 muestra un análisis de la transferencia Western de CR-1 en leche humana usando anticuerpo anti-CR-1 policlonal que se preincubó con CR-1 recombinante. Se ensayaron 1-9 muestras de leche humana sobre un gel SDS-PAGE al 4-20% y se sondaron con diluciones 1:1000 de anticuerpo anti-CR1 policlonal de conejo que se había preincubado con proteína CR-1 recombinante (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 2 horas a temperatura ambiente.

La Figura 3 proporciona los resultados del ELISA para la detección de CR-1 en muestras de leche humana. En estos ensayos, se recubrieron 96 pocillos de microvaloración durante la noche con 200 μl de muestras de leche humana deslipidizada y se bloquearon con leche al 2%. Se estimó el panel A que proporciona los resultados que muestran la concentración de CR-1 en las muestras usando diferentes concentraciones de proteína CR-1 recombinante. El panel B proporciona los resultados de las placas incubadas con anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo.

La Figura 4 proporciona los resultados de los análisis de la transferencia Western de CR-1 inmunopurificada derivada de leche, sondada con anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo. En este experimento, 100 ng de proteína CR-1 recombinante (hilera 1) y 40 μl de la muestra de leche inmunopurificada (hilera 2) se ensayaron sobre un gel SDS-PAGE al 4-20% y tras la transferencia para el análisis Western, se sondaron las muestras con dilución 1:1000 de anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo.

La Figura 5 proporciona los resultados SDS-PAGE de los experimentos que implican la fosforilación de MAPK en células NMuMg epiteliales mamarias de ratón inducidas por la CR-1 purificada a partir de leche humana. Se estimularon células NMuMG privadas de suero durante 5 minutos a 37°C, con diferentes concentraciones de CR-1 que se había inmunopurificado a partir de leche humana a diversas concentraciones. Se ensayaron los lisados celulares sobre un gel SDS-PAGE al 10%. Tras la transferencia para el análisis Western, se sondaron las muestras con un anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo MAPK (Biolab) que reconoce las formas fosforiladas activadas de MAPK (p44 y p42). La hilera 1 contiene las células privadas de suero; la hilera 2 contiene 100 ng/ml de rhCR-1; la hilera 3 contiene 50 ng/ml de CR-1 de leche; la hilera 4 contiene 100 ng/ml de CR-1 de leche; la hilera 5 contiene 300 ng/ml de CR-1 de leche; y la hilera 6 contiene 500 ng/ml de CR-1 de leche.

La Figura 6 proporciona un gráfico que muestra los resultados de OD₄₅₀ para 28 muestras de plasma humano, que indican la presencia de CR-1 en concentraciones variables en estas muestras.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona los procedimientos y composiciones para la detección y cuantificación de Cripto-1. De manera concreta, la presente invención proporciona los procedimientos y composiciones para la detección y cuantificación de Cripto-1 en muestras tales como leche, suero, plasma, y otros fluidos biológicos.

De manera adicional a los nutrientes, vitaminas y minerales que contiene, la leche humana se compone también de una variedad de factores de crecimiento y citoquinas que se piensa son importantes en la regulación de las funciones del crecimiento y secretora de la glándula mamaria y en la regulación del crecimiento, desarrollo y maduración de la mucosa intestinal y el sistema inmune en el recién nacido (Kidwell y col., En Atkinson y Lonnerdal (eds), *Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk*, CRC Press, Boca Raton, FL [1989], pp. 77-91).

Entre los diversos factores de crecimiento identificados en la leche humana, EGF y TGF α son los factores mitogénicos más importantes para el epitelio mamario normal (Carpenter, *Science* 210:198-199 [1980]; y Okada y col., *Life Sci.*, 48:1540-1543 [1991]). A este respecto, diversos estudios han demostrado que EGF y TGF α estimulan la proliferación de células epiteliales mamarias humanas y de ratón y se contempla que su presencia en la leche humana es fisiológicamente importante para el crecimiento celular epitelial mamario y la diferenciación (Snedeker y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:1063-1069 [1991]).

Por tanto, la leche humana contiene una variedad de diferentes proteínas y péptidos que poseen actividad biológica (Rodríguez-Palmero y col., *Clin. Perinatol.*, 26:355-359 [1999]). Entre las muchas sustancias bioactivas presentes en la leche, están un gran número de factores de crecimiento y citoquinas (Grosvenor y col., *Endocrin. Rev.*, 14:710-728 [1992]). Estas incluyen insulina, factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), EGF, TGF α , factor β 1 transformante del crecimiento (TGF- β 1) y TGF- β 2, bombesina, factores I y II del crecimiento mamario derivado, factor estimulante de colonias, factores I, II y III del crecimiento de la leche humana, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento del hepatocito, factor de crecimiento celular endotelial vascular, betacelulosa, factor estimulante de las colonias de granulocitos (GSF), factor α de necrosis tumoral (TNF α), interleuquina-1 (IL-1), e interleuquina-6 (IL-6) (Grosvenor y col., *Endocrin. Rev.*, 14:710-728 [1992]; Scahms, *Endocrin. Regul.*, 28:3-8 [1994]; Yamada y col., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 40:112-120 [1998]; Bryan y col., *Pediatr. Res.*, 45:858-859 [1999]; Sifakas y col., *Pediatr. Res.*, 45:652-657 [1999]; Hawkes y col., *Pediatr. Res.*, 46:194-199 [1999]; Donnet-Hughes y col., *Immunol. Cell Biol.*, 78:74-79 [2000]; Calhoun y col., *Pediatr.*, 105:1-6 [2000]; y Dunbar y col., *Biochem. J.*, 344:713-721 [1999]).

Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de la presente invención demostraron por primera vez que un miembro de la familia EGF-CFC de péptidos, CR-1, está presente en la leche humana. Tal como se describe en el presente documento, se analizaron veinticuatro muestras de leche humana para la presencia de CR-1 usando el análisis de la transferencia Western y ELISA. Se identificó la proteína CR-1 en todas las muestras con concentraciones entre 62 y 118 ng/ml. Se ha informado de concentraciones similares para la EGF en leche humana (Carpenter, *Science* 210:198-199 [1980]; y Okada *et al.*, *Life Sci.*, 48:1540-1543 [1991]). Desafortunadamente, no existía información disponible en el momento en el que se recogieron las muestras de leche tras la liberación; por tanto, no fue posible discernir si puede existir una correlación potencial entre la concentración de CR-1 en leche humana y un período definido de lactancia. A este respecto, diversos factores de crecimiento alcanzan sus concentraciones más altas en el calostro, que caen rápidamente en el posparto y permanecen constantes hasta el final de la lactancia (Yamada *et al.*, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 40:112-120 [1998]; Bryan *et al.*, *Pediatr. Res.*, 45:858-859 [1999]; y Read *et al.*, *Pediatr. Res.*, 18:133-139 [1984]). CR-1, que se purificó a partir de leche humana mediante cromatografía de inmunoafinidad fue diferente en tamaño de la proteína CR-1 recombinante humana, tal como se evaluó mediante el análisis de la transferencia Western. A este respecto, la proteína CR-1 humana contiene un sitio de N-glicosilación sencillo, cinco sitios potenciales de miristilación y tres sitios consenso para la fosforilación potencial mediante la proteína quinasa A y la proteína quinasa C (Brand *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:17320-17328 [1994]). De hecho, de manera adicional a las proteínas CR-1 humana y de ratón de 28 y 24 kDa de tamaño, se han descrito otras proteínas que oscilan entre 14 y 60 kDa que están inmunológicamente relacionadas con la CR-1 de ratón (Kenney *et al.*, *Mol. Carcinogen.*, 15:44-56 [1996]; y Seno *et al.*, *Growth Factors* 15:215-229 [1997]). Se contempla que estas modificaciones postraduccionales sean responsables de la diferencia en la movilidad de la CR-1 derivada de leche frente a la proteína CR-1 recombinante humana. Sin embargo, no es necesaria una comprensión del(os) mecanismo(s) implicado(s) con el fin del uso de la presente invención. Finalmente, la proteína CR-1 derivada de leche es biológicamente activa debido a que es capaz de estimular la fosforilación de MAPK en las células NMuMG epiteliales mamarias de ratón. La activación de la vía de MAPK está mediada por el enlace de CR-1 a un receptor superficial celular todavía desconocido (Bianco *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:8624-8629 [1999]).

Se contempla que la presencia de CR-1 biológicamente activa en leche sea fisiológicamente significativa, basándose en algunos de los efectos biológicos de este factor de crecimiento. Por ejemplo, además de producir un efecto mitogénico en las células epiteliales mamarias de ratón mediante la activación de la vía *ras/raff*/MAPK (Kankan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:3330-3335 [1997]), CR-1 puede modular también la diferenciación de una línea celular epitelial mamaria de ratón (HC-11) y los cultivos primarios de explantes mamarios de ratón establecidos a partir de ratones a mitad de embarazo (De Santis *et al.*, *Cell Growth Different.*, 8:1257-1266 [1997]). Las células HC-11 y las células primarias epiteliales mamarias de ratón responden a las hormonas lactogénicas dexametasona, insulina y prolactina (DIP) expresando las proteínas de la leche tales como la β -caseína y la proteína ácida del suero (WAP). CR-1 es un inhibidor de la expresión de la β -caseína y WAP en las células HC-11 confluentes y en los cultivos primarios estáticos de explante mamario de ratón en respuesta a las hormonas lactogénicas. Sin embargo, en el crecimiento logarítmico de las células HC-11, CR-1 puede sensibilizar las células para un incremento posterior inducido por la hormona lactogénica subsiguiente en la expresión de la β -caseína (De Santis *et al.*, *Cell Growth Different.*, 8:1257-1266 [1997]). El efecto inhibidor de CR-1 sobre la expresión de la β -caseína en respuesta a las DIP en las células HC-11 está mediado a través de la activación de p21^{ras} y de la vía dependiente de la fosfatidilinositol 3'-quinasa. Por tanto, CR-1 tiene un efecto mitogénico o de diferenciación en las células epiteliales mamarias de ratón dependiendo de que esté activada la vía de la señal de transducción. De esta manera, se contempla que CR-1 module dos respuestas diferentes en la leche humana. Durante el embarazo, cuando la expresión de CR-1 es elevada (Kenney *et al.*, *Mol. Reprod. Develop.*, 41:277-286 [1995]; y Herrington *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 131:215-226 [1997]), se contempla que CR-1 ejerza su efecto mitogénico sobre el epitelio mamario, estimulando por tanto la proliferación y diferenciación de las células epiteliales mamarias con la inducción de la expresión de la proteína de la leche. Por contraste, durante la lactancia, cuando la proliferación celular ha cesado, se contempla que la CR-1 presente en la leche sea importante en la reducción de la expresión de la proteína de la leche y por tanto inhibiendo la diferenciación y facilitando la involución de la glándula mamaria. Por tanto, esta función se apoya por la demostración reciente de que CR-1 puede inducir la apoptosis en las células HC-11 confluentes, con el factor de supervivencia disminuido (De Santis *et al.*, *Cell Death Different.*, 7:189-196 [2000]). Este efecto está mediado a través de un aumento en la expresión de una proteasa similar a la caspasa 3 y una infrarregulación en el nivel de Bcl-x₁ (De Santis *et al.*, *Cell Death Different.*, 7:189-196 [2000]). Sin embargo, no es necesaria una comprensión del(os) mecanismo(s) con el fin del uso de la presente invención. Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada por ningún mecanismo particular.

De manera adicional a la regulación del crecimiento y la morfogénesis de la glándula mamaria de ratón, se ha demostrado que CR-1 puede ser relevante en la patogénesis del cáncer de mama humano (Qi *et al.*, *Brit. J. Cancer* 69:903-910 [1994]; Dublín *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 7:617-622 [1995]; y Salomón *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19:183-232 [1995]). Se ha detectado la expresión de CR-1 en aproximadamente el 80% de los carcinomas ductales o lobulares infiltrantes y en el 50% del carcinoma ductal *in situ* (Qi *et al.*, *Brit. J. Cancer* 69:903-910 [1994]). De manera interesante, únicamente un 15% de los especímenes de epitelio mamario adyacente no implicado fueron positivos para la expresión de CR-1, indicando un papel para CR-1 como marcador del tumor potencial para esta enfermedad (Qi *et al.*, *Brit. J. Cancer* 69:903-910 [1994]). Sin embargo, no se encontró correlación significativa entre la expresión de CR-1 y diversos parámetros clinicopatológicos, tales como tamaño del tumor, implicación del nódulo linfático, índice proliferativo o estatus del receptor del estrógeno y la progesterona (Dublín *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 7:617-622 [1995]). Los datos incluidos en el presente documento, que demuestran la presencia de CR-1 en la leche humana, indican que CR-1 expresada a niveles suficientemente altos por los tumores de mama es liberada por las células cancerosas y alcanza la circulación sanguínea. Por tanto, se contempla que la detección y medida de los niveles de CR-1 en el

suero y/o el plasma humano encontrarán significación clínica en el diagnóstico del cáncer de mama. De hecho, se ha informado que diversos factores de crecimiento y citoquinas diferentes están presentes en el plasma o el suero de pacientes humanos con cáncer de mama, y sus concentraciones están significativamente correlacionadas con la progresión de la enfermedad y la respuesta a la quimioterapia y a la terapia endocrina (Zhang *y col.*, *Anticancer Res.*, 19:1427-1432 [1999]; Taniguchi *y col.*, *Clin. Cancer Res.*, 1:1031-1034 [1995]; y Dorix *y col.*, *Br. J. Cancer* 76:238-243 [1997]). Por tanto, se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de la presente invención para detectar la CR-1 en el plasma humano de pacientes con cáncer de mama.

Durante el desarrollo de la presente invención, se llevó a cabo una evaluación para determinar si el incremento en la expresión de CR-1 que se detectó en la glándula mamaria de ratón durante el embarazo y la lactancia se asociaba con la secreción de este factor de crecimiento en la leche. Basándose en estos resultados tempranos, se desarrolló la presente invención, que proporciona los procedimientos de análisis ELISA y análisis de la transferencia Western adecuados para la detección y la cuantificación de CR-1 en leche humana y otras muestras. Tal como se ha indicado en el presente documento, los procedimientos y composiciones proporcionan los medios para detectar una banda específica para CR-1 de 28 kDa en muestras de leche con concentraciones entre 62 y 118 ng/ml. De manera adicional, tal como se describe en mayor detalle en el presente documento, la CR-1 purificada a partir de leche humana usando una columna de inmunoafinidad, fue capaz de estimular la fosforilación de MAPK en las células NMuMG epiteliales mamarias de ratón.

Se analizaron veinticuatro muestras de leche humana para la expresión de CR-1 mediante análisis de la transferencia Western usando un anticuerpo mono específico anti-CR-1 policlonal de conejo. Se identificó una banda de 28 kDa que se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo a una intensidad variable en las muestras de leche humana (Véase la Figura 1). Todas las muestras expresaron la proteína CR-1 inmunorreactiva pero en diversos grados.

Para demostrar que la banda reconocida por el anticuerpo anti-CR-1 es específica, se sondaron las muestras 1 a 9 con al anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo que se había preincubado con un exceso de CR-1 recombinante. No se detectaron bandas cuando se incubaron las muestras con el anticuerpo anti CR-1 preabsorbido con la proteína CR-1, demostrando la especificidad de la banda que fue reconocida por el anticuerpo anti-CR-1 (Figura 2). Se evaluó y cuantificó también la presencia y cantidad de CR-1 en la leche humana mediante ELISA. Usando la proteína CR-1 recombinante como un patrón a diferentes concentraciones, se estimó la concentración de CR-1 en las muestras de leche humana deslipidizadas. El panel A de la Figura 3 muestra que el anticuerpo policlonal anti-CR-1 de conejo puede detectar de manera lineal la CR-1 humana recombinante en un intervalo de concentración de 100 pg a 1 µg. La CR-1 inmunorreactiva estuvo presente a concentraciones entre 62 y 118 ng/ml en las muestras de leche (Véase, Figura 3, Panel B). Hubo una correlación significativa entre las cantidades relativas de proteína inmunorreactiva CR-1 de 28 kDa en las muestras de leche tal como se detectó mediante análisis de la transferencia Western y la concentración de CR-1 inmunorreactiva que se midió en el ELISA.

Para evaluar si la CR-1 en leche humana es biológicamente activa en las células epiteliales mamarias, se escogió para la purificación una única muestra de leche humana con altos niveles de expresión de CR-1 tal como se determinó mediante el análisis de la transferencia Western y ELISA (muestra número 2). Se purificó CR-1 a partir de leche humana deslipidizada usando una columna de inmunoafinidad a la cual se enlazó el anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo. Tras la concentración, diálisis y estimación de la concentración de CR-1 tal como se determinó mediante el análisis de la transferencia Western (Figura 4), se evaluó la proteína CR-1 purificada para su actividad sobre las células NMuMG epiteliales mamarias de ratón.

Se ha demostrado previamente en diversas líneas celulares epiteliales mamarias de ratón y ser humano que CR-1 puede inducir un rápido aumento en la fosforilación de la tirosina de las isoformas p66, p52 y p46 de Shc que después pueden activar la vía *ras/raf*/MAPK tal como se evidenció por la un aumento de la fosforilación de las isoformas p42 y p44 de MAPK (Kankan *y col.*, *J. Biol. Chem.*, 272:3330-3335 [1997]). Las células NMuMG epiteliales mamarias de ratón responden a la CR-1 recombinante o sintetizada químicamente con un aumento en la fosforilación de Shc y MAPK (Seno *y col.*, *Growth Factors* 15:215-229 [1998]; y Kankan *y col.*, más arriba). Para determinar si la CR-1 purificada a partir de la leche humana tenía una actividad comparable a la CR-1 recombinante, se trató el suero privado de células NMuMG con diferentes concentraciones de proteína CR-1 derivada de leche inmunopurificada y se comparó con la CR-1 humana recombinante. Se detectó una activación dependiente de la dosis de MAPK tras el tratamiento de las células con CR-1 derivada de leche (Véase la Figura 5). La CR-1 humana recombinante (100 ng/ml) fue también capaz de estimular la fosforilación de MAPK que fue casi equivalente al nivel de estimulación de MAPK por 100 ng/l de CR-1 derivada de leche.

Definiciones

Los términos “muestra” y “espécimen” en la presente memoria y reivindicaciones se usan en el sentido más amplio. En las formas de realización preferidas, estos términos abarcan todos los tipos de muestras obtenidos de seres humanos y otros animales, que incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales tales como orina, sangre, fluido cerebrospinal (CSF), materia fecal, semen, y saliva. Sin embargo, las muestras biológicas pueden ser animales, incluyendo seres humanos, fluidos o tejidos, de tal manera que estos ejemplos no se consideran como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

ES 2 278 899 T3

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de fluido” se refiere a una muestra que es líquida. Por ejemplo, el término abarca los fluidos corporales (*por ejemplo*, “fluidos biológicos”), tales como leche, sangre, suero, plasma, CSF, orina, semen, saliva, fluido seroso, etc. No se pretende que la presente invención esté limitada por ningún fluido en particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se usa en referencia a cualquier molécula de inmunoglobulina que reacciona con un antígeno específico. Se pretende que el término abarque cualquier inmunoglobulina (por ejemplo., IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc) obtenida a partir de cualquier fuente (por ejemplo, seres humanos, roedores, primates no humanos, lagomorfos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se usa en referencia a cualquier sustancia que es capaz de reaccionar con un anticuerpo. Se pretende que este término abarque cualquier antígeno e “inmunógeno” (es decir, una sustancia que induce la formación de anticuerpos). De esta manera, en una reacción inmunógena, los anticuerpos se producen en respuesta a la presencia de un antígeno o porción de un antígeno.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “fragmento de antígeno” y “porción de un antígeno” se usan en referencia a un trozo de un antígeno. Se pueden producir los fragmentos o porciones de antígeno en diversos tamaños, oscilando entre un porcentaje pequeño del antígeno completo hasta un porcentaje grande pero no del 100% del antígeno. Sin embargo, en situaciones en la que se especifica “al menos una porción de antígeno”, se contempla que pueda estar presente el antígeno completo. En algunas formas de realización preferidas, los fragmentos o porciones de antígeno comprenden un “epítoto” (*por ejemplo*, un “determinante antigénico”) reconocido por un anticuerpo. En otras formas de realización, los fragmentos o porciones de antígeno son inmunogénicos (*es decir*, tales fragmentos o porciones son capaces de inducir una respuesta inmune), mientras que en otras formas de realización, los fragmentos o porciones de antígeno no son inmunogénicos (*es decir*, dichos fragmentos o porciones no son capaces de inducir una respuesta inmune).

Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunoensayo” se usa en referencia a cualquier procedimiento en el que se usan anticuerpos en la detección de un antígeno. Se contempla que se abarquen por esta definición una diversidad de formatos de inmunoensayos, que incluyen, pero no se limitan a inmunoensayos directos, inmunoensayos indirectos, e inmunoensayos “sándwich”. Un formato particularmente preferido es un ensayo inmunosorbente de enzimas ligadas (ELISA). Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a este formato. Se contempla que otros formatos, que incluyen radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunofluorescentes (IFA), y otros formatos de ensayo, que incluyen, pero no se limitan a, variaciones sobre el procedimiento ELISA, encontrarán uso en el procedimiento de la presente invención. Por tanto, se contempla que otros formatos de la reacción antígeno-anticuerpo encontrarán uso en la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a la “floculación” (*es decir*, una suspensión coloidal producida tras la formación de los complejos antígeno-anticuerpo), “aglutinación” (*es decir*, agrupamiento de células u otras sustancias tras la exposición al anticuerpo), “aglutinación de partículas” (*es decir*, agrupamiento de partículas recubiertas con antígeno en presencia del anticuerpo o el agrupamiento de partículas recubiertas con anticuerpo en presencia del antígeno), “fijación del complemento” (*es decir*, el uso del complemento en un procedimiento de reacción anticuerpo-antígeno) y otros procedimientos comúnmente usados en serología, inmunología, inmunohistoquímica, histoquímica, y los campos relacionados.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tinción celular” se usa en referencia a los procedimientos usados para marcar o teñir las células para mejorar su visualización. Esta tinción o marcado se consigue mediante el uso de diversos compuestos, que incluyen, pero no se limitan a, fluorocromos, enzimas, oro, y yodo. Se contempla que la definición abarque dichos procedimientos tales como “ensayos cromogénicos *in situ*” en los que se lleva a cabo un ensayo (es decir, un ensayo) sobre una muestra *in situ*. Se contempla también que el ensayo cromogénico *in situ* implicará el uso de un inmunoensayo (es decir, un ELISA) o de inmunocitoquímica. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada por ningún formato de ensayo en particular para la tinción celular.

Tal como se usan en el presente documento, el término “captura de anticuerpo” se refiere a un anticuerpo que se usa para enlazar un antígeno y permitir por tanto el reconocimiento del antígeno por un anticuerpo aplicado después. Por ejemplo, en algunas formas de realización preferidas, el anticuerpo de captura se enlaza a un pocillo de microvaloración y sirve para enlazar los antígenos (*por ejemplo*, Cripto-1) presentes en una muestra añadida al pocillo. A continuación se usa otro anticuerpo (denominado “anticuerpo primario”) para enlazarse al complejo antígeno-anticuerpo, para formar un “sandwich” formado por anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Se puede llevar a cabo la detección de este complejo mediante diversos procedimientos. En algunas formas de realización particularmente preferidas, se preparó el anticuerpo primario con una marca tal como biotina, un enzima, un marcador fluorescente, o radiactividad, y se detectó usando directamente esta marca. De manera alternativa, se añadió un “anticuerpo secundario” marcado o “anticuerpo indicador” que reconocía el anticuerpo primario, formando un complejo formado por anticuerpo-antígeno-anticuerpo-antígeno. De nuevo, se añaden a continuación los reactivos indicadores apropiados para detectar el anticuerpo marcado. En otras formas de realización se añaden cualquier número de anticuerpos adicionales tal como se desee. En algunas formas de realización, se marcan también estos anticuerpos con un marcador, que incluye, pero no se limita a un enzima, marcador fluorescente, o radiactividad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “reactivo indicador” o “molécula indicadora” se usa en referencia a los compuestos que son capaces de detectar la presencia del anticuerpo enlazado al antígeno. Por ejemplo, en las formas de realización preferidas, un reactivo indicador es una sustancia colorimétrica que se liga a un sustrato

ES 2 278 899 T3

enzimático. Tras el enlace del anticuerpo y el antígeno, el enzima actúa sobre su sustrato y produce la producción de un color. Otros reactivos indicadores incluyen, pero no se limitan a compuestos o moléculas fluorogénicas, cromogénicas, luminogénicas, y radiactivas. Esta definición abarca también el uso de compuestos basados en biotina y avidina (*por ejemplo*, que incluyen los compuestos pero que no se limitan a neutravidina y estreptavidina) como parte del sistema de detección. En una forma de realización de la presente invención, se usan anticuerpos biotinilados en conjunción con un soporte sólido recubierto de avidina.

Tal como se usa en el presente documento el término “señal” se usa en referencia a un indicador de que se producido una reacción, por ejemplo, el enlace del anticuerpo al antígeno. Se contempla que se usarán con la presente invención señales en forma de radiactividad, reacciones fluorogénicas, y reacciones enzimáticas. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada por ninguna señal concreta. En algunas formas de realización, la señal se evalúa cuantitativa y/o cualitativamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “amplificador” se usa en referencia a un sistema que mejora la señal en un procedimiento de ensayo tal como un ELISA. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada al uso de amplificadores en ningún sistema o formato de ensayo concreto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “soporte sólido” se usa en referencia a cualquier material sólido adecuado para la unión de diversos reactivos tales como anticuerpos, antígenos, y/u otros compuestos. Por ejemplo, en el procedimiento ELISA, los pocillos de placas de microvaloración proporcionan a menudo soportes sólidos. Otros ejemplos de soportes sólidos incluyen portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, perlas, partículas, matraces de cultivo celular, así como muchos otros artículos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “kit” se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. En las formas de realización preferidas, los kits de la presente invención comprenden placas de microvaloración, tampones, anticuerpos marcados, controles positivos y negativos, manuales de instrucción para usuarios, etc. No se pretende que los kits de la presente invención estén limitados por ningún componente, reactivos, etc. concretos. Por tanto, se pretende que encontrarán uso con la presente invención diversos formatos de kits.

Procedimiento experimental

Se proporcionan los siguientes ejemplos con el fin de demostrar e ilustrar de manera adicional algunas formas de realización preferidas y aspectos de la presente invención y no se consideran como limitantes del alcance de la misma.

En la descripción experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); BSA (albúmina de suero bovino); CFA (adyuvante de Freund completo); IFA (adyuvante de Freund incompleto); IgG (Inmunoglobulina G); IM (intramuscular); IP (intraperitoneal); IV (intravenosa o intravascular); SC (subcutánea); H₂O (agua); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); pb (par de bases); kb (par de kilobases); KD (kilodaltons); g (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); nm (nanómetros); µm (micrómetros); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); V (voltios); MW (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) hora/horas); MgCl₂ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); DO₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); PBS (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 150 mM, tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2]); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); PEG (polietilenglicol); PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo); RT-PCR (PCR mediante transcripción inversa); SDS (dodecil sulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminoetano); p/v (peso a volumen); v/v (volumen a volumen); 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 Laboratorios, Gaithersburg, MD); BioRad (BioRad, Richmond, CA); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); New England Biolabs (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); Pharmacia (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ); y Sigma (Sigma Chemical Co., San Luis, MO).

En estos experimentos, se usaron muestras de leche humana obtenidas de 24 mujeres sanas. No están disponibles los datos acerca del tiempo en el que se recogieron las muestras tras la dosificación. Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 10 min y se recogió la capa acuosa de la leche tras la eliminación de la capa de lípidos.

Se cultivaron células NMuMG epiteliales mamarias de ratón normal en medio Eagle modificado de Dulbecco que contenía suero bovino fetal al 10%. Se expresó la proteína CR-1 humana recombinante (rhCR-1) en *E. coli* y se purificó tal como se conoce en la técnica (Véase, Seno y *col.*, Growth Factors 15:215-229 [1998]).

Ejemplo 1

Análisis de la transferencia Western

En estos experimentos, se cargaron 40 µl de muestras de leche humana deslipidizada sobre un gel de SDS-PAGE al 4-20% y se ensayaron bajo condiciones de reducción. Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas sobre el gel a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche seca al 5% en solución salina tamponada con Tris 20 mM con tensioactivo TWEEN® al 0,05%. Se incubaron las membranas durante la noche a 4°C en una dilución 1:1000 de

ES 2 278 899 T3

anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo (Biocon). Se sondó una membrana en una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo que se había preincubado con CR-1 recombinante humano (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 2 h a temperatura ambiente. Se detectó el anticuerpo de conejo enlazado usando una dilución 1:2000 de IgG de anti-conejo cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham) y se detectaron las bandas inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia mejorada (Amersham).

Tal como se muestra en la Figura 1, se identificó una banda de 28 kDa reactiva con el anticuerpo anti-R1 policlonal de conejo a una intensidad variable en las muestras de leche humana. Todas las muestras ensayadas expresaron la proteína CR-1 inmunorreactiva pero en diversos grados.

Para demostrar que la banda reconocida por el anticuerpo anti-CR1 es específica, se sondaron las muestras 1 a 9 con el anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo que se había preincubado con un exceso de CR-1 recombinante. No se detectaron bandas cuando se incubaron las muestras con el anticuerpo anti-CR-1 preabsorbido con la proteína CR-1, lo que demuestra la especificidad de la banda que fue reconocida por el anticuerpo anti-CR-1 (Figura 2). Se evaluó también la presencia y cantidad de CR-1 en la leche humana y se cuantificó mediante ELISA, tal como se describe a continuación en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2

20 *Ensayo inmunosorbente de enzimas ligadas (ELISA)*

En estos experimentos, se añadieron 200 μl de cada muestra de leche deslipidizada a placas de microvaloración de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 4°C. Se absorbió también la proteína CR-1 recombinante humana a concentraciones que oscilan entre 100 pg y 1 μg . Se bloquearon las placas con leche al 2% (Kirkegaard & Perry) durante 1 h a 37°C y se incubaron en una dilución 1:3000 de anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo (Biocon) durante 1 h a 37°C. Tras lavar las placas 3 veces con tampón de lavado (Kirkegaard & Perry), se añadió una dilución 1:3000 de IgG de anti-conejo de burro conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham) y se incubaron durante 1 h a 37°C. A continuación, las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado y se añadieron a los pocillos 100 μl de tampón con sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry). Para permitir el desarrollo del color, se incubaron las placas en la oscuridad durante 5 min. Se detuvo la reacción mediante la adición de solución de detención (Kirkegaard & Perry) y se leyó la absorbancia a 450 nm. Se llevó a cabo el experimento por triplicado y se repitió tres veces.

En la Figura 3 se muestran los resultados de algunos experimentos ELISA. El Panel A de la Figura 3 proporciona los resultados para las placas en los que se estimó la concentración de CR-1 en las muestras usando diferentes concentraciones de proteína CR-1 recombinante. Esta Figura muestra que el anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo puede detectar CR-1 humana recombinante de manera lineal sobre un intervalo de concentración de 100 pg a 1 μg . De manera adicional, tal como se ha indicado en el Panel B de la Figura 3, la CR-1 inmunorreactiva estuvo presente a concentraciones entre 62 y 118 ng/ml en las muestras de leche. Hubo una correlación significativa entre las cantidades relativas de proteína inmunorreactiva CR-1 de 28 kDa en las muestras de leche tal como se detectó mediante el análisis de la transferencia Western (tal como se ha descrito en el Ejemplo 1) y la concentración de CR-1 inmunorreactiva que se midió en el ELISA descrito en este Ejemplo.

Ejemplo 3

45 *Inmunopurificación de la Proteína CR-1 de leche humana*

Se purificó la proteína CR-1 de la leche humana usando un kit de inmovilización AMINOLINK® Plus (Pierce), tal como indican las instrucciones del fabricante. De manera breve, la IgG del anti-CR-1 policlonal de conejo se acopló con el gel de acoplamiento del AMINOLINK® Plus usando un tampón de acoplamiento de pH 10 que contenía citrato de sodio 0,1 M y carbonato de sodio 0,05 M. A continuación se usó la columna acoplada con el anticuerpo anti-CR-1 para la purificación por afinidad de CR-1 de la leche humana deslipidizada. Se escogió para la purificación la muestra de leche humana número 2, debido a sus altos niveles de CR-1 tal como se detectó mediante análisis de la transferencia Western (Véase el Ejemplo 1) y mediante ELISA (Véase el Ejemplo 2).

Se aplicaron cinco ml de leche humana a la columna y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el lavado con PBS, se eluyó la proteína CR-1 enlazada en diversas fracciones con glicina 0,1 M pH 2,5, y se neutralizó con Tris 1 M pH 9,5. Las fracciones que contenían la proteína se reunieron, se concentraron con un concentrador CENTRICON® 10 (Amicon) y se dializaron frente a PBS. Se estimó la concentración de la proteína purificada mediante análisis de la transferencia Western usando concentraciones conocidas de CR-1 recombinante humana como patrón, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. En este análisis de la transferencia Western, se ensayaron 100 ng de proteína CR-1 recombinante humana (hilera 1) y 40 μl de la muestra de leche inmunopurificada (hilera 2) sobre un gel SDS-PAGE al 4-20% y se sondaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo. En la Figura 4 se muestran los resultados.

Ejemplo 4

Bioensayo de proteína CR-1 derivada de leche

5 Para ensayar la actividad de la proteína CR-1 purificada de la leche humana, se sembraron células NMuMG epite-
 liales mamarias de ratón en placas de 100 mm y se hicieron crecer hasta que alcanzaron un 70-80% de confluencia. A
 continuación se cambiaron las células a un medio de Eagle modificado de Dulbecco libre de suero que contenía trans-
 ferrina humana (10 $\mu\text{g/ml}$) y fetuina Pedersen de tipo IV (1 mg/ml) durante 24 h. Se estimularon las células durante 5
 10 min a 37°C con proteína CR-1 humana recombinante a 100 ng/ml de CR-1 que se purificó a partir de leche humana
 mediante cromatografía de inmunoafinidad tal como se ha descrito en el en el Ejemplo 2. Se lisaron las células en un
 tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato al 0,5%, MgCl_2 5
 mM, 2 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina, 2 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM,
 y fluoruro de sodio 20 mM.

15 Se ensayaron los lisados brutos de las proteínas (30 $\mu\text{g/muestra}$) sobre un gel SDS-PAGE al 10%, se transfirieron
 a una membrana de PVDF, se bloquearon en una solución preparada a partir de leche seca al 5% (Véase el Ejemplo
 1) y se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo antifosfo MAPK policlonal de conejo (Biolab). Tras la
 incubación con una IgG de anticonejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham), se detectaron
 20 las bandas inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia mejorada (Amersham).

La Figura 5 proporciona los resultados de los lisados celulares que se ensayaron sobre un gel SDS-PAGE al 10%
 y se sondó con un anticuerpo policlonal de conejo antifosfo MAPK (Biolab) que reconoce las formas fosforiladas
 activadas de MAPK (p44 y p42). En esta Figura, la hilera 1 contiene las células privadas de suero, la hilera 2 contiene
 rhCR-1 (100 ng/ml); la hilera 3 contiene la CR-1 de leche (50 ng/ml); la hilera 4 contiene la CR-1 de leche (100
 25 ng/ml); la hilera 5 contiene la CR-1 de leche (300 ng/ml); y la hilera 6 contiene la CR-1 de leche (500 ng/ml).

Tal como se ha indicado en la Figura 5, se detectó una activación dependiente de la dosis de MAPK tras el trata-
 miento de las células con CR-1 derivada de leche. La CR-1 recombinante humana (100 ng/ml) fue también capaz de
 30 estimular la fosforilación de MAPK a un nivel que fue casi equivalente al nivel de estimulación de MAPK mediante
 100 ng/ml de la CR-1-derivada de leche.

Ejemplo 5

Detección de cripto-1 en plasma humano

35 En estos experimentos, se añadieron alícuotas de 200 μl procedentes de muestras de plasma humano obtenidas a
 partir de 38 pacientes con cáncer de mama a placas de microvaloración de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a
 4°C. Se absorbió también la proteína CR-1 recombinante humana a concentraciones que oscilaban entre 100 pg y 1 μg .
 Se bloquearon las placas con solución de leche al 2% (Kirkegaard & Perry) durante 1 h a 37°C, y se incubaron con una
 40 dilución 1:3000 de anticuerpo anti-CR-1 policlonal de conejo (Biocon) durante 1 h a 37°C. Tras lavar las placas 3 veces
 con tampón de lavado (Kirkegaard & Perry), se añadió una dilución 1:3000 de IgG de anticonejo de burro conjugada
 con peroxidasa de rábano picante (Amersham) durante 1 h a 37°C. A continuación se lavaron las placas cinco veces
 con tampón de lavado y se añadieron 100 μl de tampón con sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry) a los
 pocillos. Para permitir el desarrollo del color, se incubaron las placas en la oscuridad durante 5 minutos. Se detuvo la
 45 reacción mediante la adición de una solución de detención (Kirkegaard & Perry) y se leyó la absorbancia a 450 nm.
 El experimento se llevó a cabo por triplicado y se repitió tres veces. En la Figura 6 se muestran los resultados de estos
 experimentos ELISA. Tal como se ha indicado en esta Figura, CR-1 estuvo presente en las muestras a concentraciones
 variables.

50 Diversas modificaciones y variaciones del procedimiento descrito y sistema de la invención serán aparentes a
 aquellas personas expertas en la técnica. Aunque se ha descrito la invención en conexión con las forma de realización
 específicas preferidas, deberá entenderse que tal como se reivindica la invención, no deberá limitarse indebidamente a
 dichas formas de realización específicas. Por tanto, se pretende que las diversas modificaciones de los modos descritos
 para llevar a cabo la invención que son obvias para aquellas personas expertas en la técnica de los inmunoensayos,
 55 biología molecular, endocrinología y campos relacionados estén dentro del alcance de la presente invención.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección de Cripto-1 en una muestra, que comprende:

5 a) proporcionar:

i) un fluido biológico sospechoso de contener Cripto-1,

10 ii) un anticuerpo dirigido contra dicho Cripto-1;

b) exponer dicho fluido biológico a dicho anticuerpo bajo condiciones tales que dicho Cripto-1 y el anticuerpo se unen para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y

15 c) detectar dicho complejo de antígeno-anticuerpo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además una etapa de cuantificación de dicho Cripto-1 en dicho fluido biológico midiendo la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo.

20 3. Un procedimiento para cuantificar Cripto-1 en una muestra, que comprende:

a) proporcionar:

i) un fluido biológico que contiene Cripto-1

25 ii) un anticuerpo dirigido contra dicho Cripto-1;

b) exponer dicho fluido biológico a dicho anticuerpo bajo condiciones tales que dicho Cripto-1 y el anticuerpo se unen para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y

30 c) medir la cantidad de dicho complejo antígeno-anticuerpo

4. El procedimiento de cualquiera de la reivindicaciones 1-3, en el que dicho fluido biológico es leche.

35 5. El procedimiento de cualquiera de la reivindicaciones 1-3, en el que dicho fluido biológico es suero.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho fluido biológico es plasma.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho fluido biológico es de un ser humano.

40 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es monoclonal

9. El procedimiento de cualquiera de la reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

45 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho procedimiento es un ensayo inmunosorbente de enzimas ligadas.

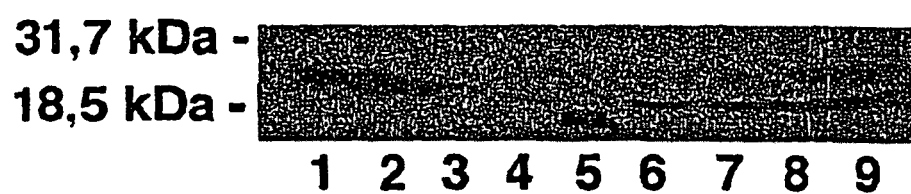
50

55

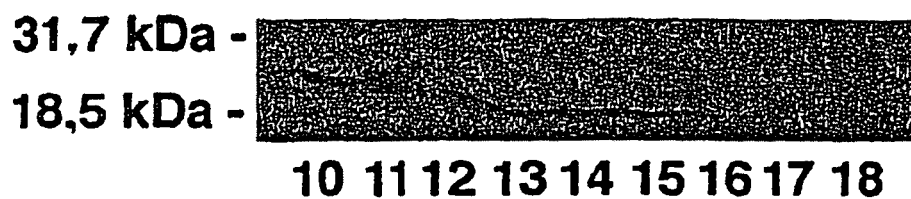
60

65

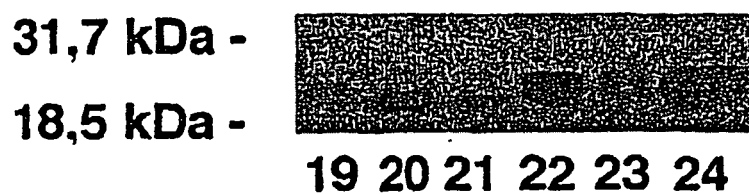
A

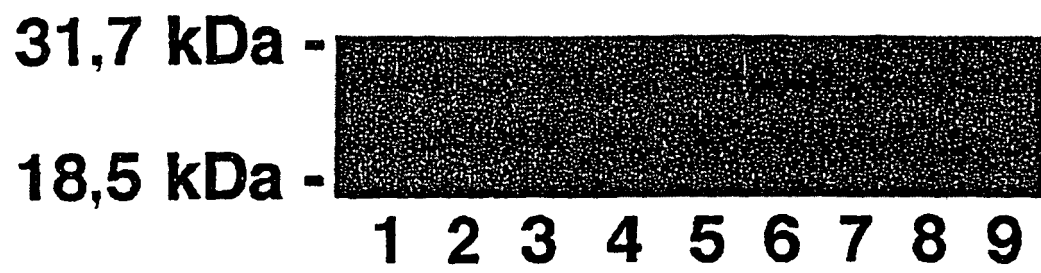


B

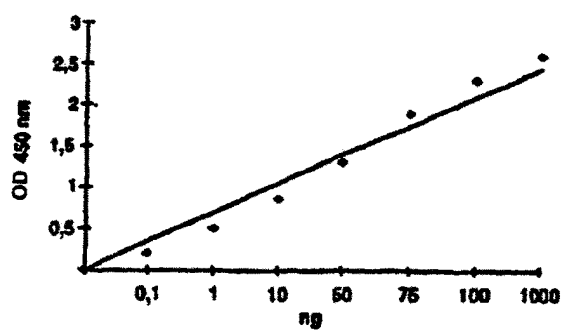


C





A



B

