

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6938372号
(P6938372)

(45) 発行日 令和3年9月22日(2021.9.22)

(24) 登録日 令和3年9月3日(2021.9.3)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 A
請求項の数 10 (全 9 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-516964 (P2017-516964)	(73) 特許権者	517103588
(86) (22) 出願日	平成27年9月25日 (2015.9.25)		ディアデム エス. アール. エル.
(65) 公表番号	特表2017-534595 (P2017-534595A)		イタリア国 ブレッシャ州 アイー 2 5 1
(43) 公表日	平成29年11月24日 (2017.11.24)		2 4 ブレッシャ, 2 0 セッテンブレ通り
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/072094		1 4 /エー
(87) 国際公開番号	W02016/050630	(74) 代理人	110001416
(87) 国際公開日	平成28年4月7日 (2016.4.7)		特許業務法人 信栄特許事務所
審査請求日	平成30年9月25日 (2018.9.25)	(72) 発明者	メモ, マウリッチオ
審判番号	不服2020-11218 (P2020-11218/J1)		イタリア国 ブレッシャ州 2 5 0 4 0
審判請求日	令和2年8月12日 (2020.8.12)		モンティチェッリ ブルサーティ, サレト
(31) 優先権主張番号	T02014A000776		通り 2 5
(32) 優先日	平成26年9月30日 (2014.9.30)	(72) 発明者	ウベルティ, ダニエラ レティチア
(33) 優先権主張国・地域又は機関	イタリア (IT)		イタリア国 ブレッシャ州 2 5 1 2 1
早期審査対象出願			ロンキ エス. エフ. ディ パオラ通り
			2 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト p 5 3 の直線状エピトープに結合する抗体及びその診断的応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列が R R T E E E N L R K K G E P H H (配列番号 1) であり、且つ、アルツハイマー病患者、アルツハイマー病を発症する疾病素質を有する軽度認知障害患者、又は加齢に伴い認知障害を発症する疾病素質を有する患者に特徴的な p 5 3 タンパク質の立体構造変化アイソフォームで露出するヒト p 5 3 の直線状エピトープに、特異的に結合することを特徴とする抗ヒト p 5 3 抗体であって、

(i) ウシ血清アルブミンと結合させた、配列が C R T E E E N L R K K G E P H H (配列番号 2) である前記ヒト p 5 3 タンパク質のペプチドを含む免疫原を用い、非ヒト動物に免疫処置する工程；と

(i i) 免疫処置で得られた前記抗体を単離する工程と、
により調製される、抗ヒト p 5 3 抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

配列が R R T E E E N L R K K G E P H H (配列番号 1) であり、且つ、アルツハイマー病患者、アルツハイマー病を発症する疾病素質を有する軽度認知障害患者、又は加齢に伴い認知障害を発症する疾病素質を有する患者に特徴的な p 5 3 タンパク質の立体構造変化アイソフォームで露出するヒト p 5 3 の直線状エピトープに、特異的に結合することを特徴とする抗ヒト p 5 3 抗体を調製する方法であって、

(i) ウシ血清アルブミンと結合させた、配列がC R T E E N L R K K G E P H H (配列番号2)である前記ヒトp53タンパク質のペプチドを含む免疫原を用い、非ヒト動物に免疫処置する工程；と

(ii) 免疫処置で得られた前記抗体を単離する工程と、
により特徴付けられる方法。

【請求項4】

少なくとも請求項1又は2に記載の抗体、及び前記抗体のヒトp53タンパク質への結合を検出する手段を含む、イムノアッセイキット。

【請求項5】

前記野生型ヒトp53タンパク質に対する翻訳後修飾により、立体構造的に変化した試料中の前記ヒトp53タンパク質のアイソフォームを検出する*in vitro*の方法であって、前記試料が請求項1又は2に記載の少なくとも1つの抗体と接触すること、前記ヒトp53タンパク質及び前記抗体の免疫複合体の形成が、前記試料において検出されることを特徴とする方法。

10

【請求項6】

被験者におけるアルツハイマー病を診断するための*in vitro*キットであって、
少なくとも請求項1又は2に記載の抗体、及び前記抗体のヒトp53タンパク質への結合を検出する手段を含み、

前記診断は、

(i) 前記被験者の生体試料を、請求項1又は2に記載の少なくとも1つの抗ヒトp53抗体と、前記ヒトp53タンパク質及び前記少なくとも1つの抗体の免疫複合体の形成に
適当な条件下で接触させる工程；と

20

(ii) 前記ヒトp53タンパク質及び前記少なくとも1つの抗体の免疫複合体の形成を検出する工程と、により特徴付けられ、

前記免疫複合体の形成はアルツハイマー病を示す、キット。

【請求項7】

軽度認知障害である被験者のアルツハイマー病を発症する疾病素質を決定するための*in vitro*キットであって、少なくとも請求項1又は2に記載の抗体、及び前記抗体のヒトp53タンパク質への結合を検出する手段を含み、

前記決定は、

30

(i) 前記被験者の生体試料を、請求項1又は2に記載の少なくとも1つの抗ヒトp53抗体と、前記ヒトp53タンパク質及び前記少なくとも1つの抗体の免疫複合体の形成に
適当な条件下で接触させる工程；と

(ii) 前記ヒトp53タンパク質及び前記少なくとも1つの抗体の免疫複合体の形成を検出する工程と、により特徴付けられ

前記免疫複合体の形成はアルツハイマー病を発症する疾病素質を示す、キット。

【請求項8】

加齢に伴い認知機能不良となる被験者の疾病素質を決定するための*in vitro*キットであって、少なくとも請求項1又は2に記載の抗体、及び前記抗体のヒトp53タンパク質への結合を検出する手段を含み、

40

前記決定は、

(i) 前記被験者の生体試料を、請求項1又は2に記載の少なくとも1つの抗ヒトp53抗体と、前記ヒトp53タンパク質及び前記少なくとも1つの抗体の免疫複合体の形成に
適当な条件下で接触させる工程；と

(ii) 前記ヒトp53タンパク質及び前記少なくとも1つの抗体の免疫複合体の形成を検出する工程と、により特徴付けられ、

前記免疫複合体の形成は加齢に伴い認知機能不良となる疾病素質を示す、キット。

【請求項9】

前記生体試料が、血液、血漿、血清、唾液、尿、神経細胞又は血液細胞である、請求項5に記載の*in vitro*の方法。

50

【請求項10】

前記検出が、免疫沈降反応技術、イムノアッセイ、ウェスタンブロット、FACS分析、又は免疫細胞化学／免疫組織化学技術により実施される、請求項5に記載の *in vitro* の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫診断の分野である。

【0002】

さらに詳細には、本発明は、アルツハイマー病、及び／又は加齢に伴いアルツハイマー病もしくは認知障害を発症する被験者の疾病素質を診断する抗体、キット、並びに *in vitro* の方法に関する。

10

【背景技術】

【0003】

ヒト p53 タンパク質の DNA 結合ドメイン (DBD) (アミノ酸 101～306) は、高度な構造的柔軟性により特徴付けられ、3つのシステイン (176、238 及び 242 残基)、並びに 1つのヒスチジン (179 残基) と配位結合した 1つの Zn^{2+} イオンを含む。ヒト p53 タンパク質の野生型アイソフォームにおいて、アミノ酸 282～297 の直線状エピトープはマスクされるため、エピトープ特異的抗体による認識に利用できない。

20

【0004】

しかしながら、その DBD ドメインの高度な柔軟性のため、p53 タンパク質は複数の立体構造を呈することができ、また、これらの立体構造がその生物学的活性を特徴付ける。

【0005】

その野生型構造では、p53 は DNA コンセンサス配列に結合することができ、標的遺伝子の発現を転写／抑制することができる。この立体構造において、該タンパク質は、市販の立体構造特異的抗体である PAb1620 により認識されるエピトープを露出する。

【0006】

p53 の立体構造の変化状態は複数存在し、異なる立体構造変化アイソフォームに相当する。p53 遺伝子における一部の変異は、タンパク質の立体構造変化を引き起こし、これは市販の立体構造特異的抗体が認識することができる立体構造変化アイソフォームに相当する。

30

【0007】

さらなる立体構造変化アイソフォームは、酸化及び／又はニトロ化反応など、翻訳後修飾に由来してもよく、タンパク質の野生型 3 次構造を変化させる。

【0008】

Buizza L. ら (「Conformational altered p53 as an early marker of oxidative stress in Alzheimer's disease」、PlosOne7 (1):e29789) 及び Uberti D ら (「Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients」、Neurobiology of Aging 27 (2006) 1193～1201) は共にアルツハイマー病患者における変異 p53 タンパク質の発現を同定している。抗 p53 抗体の PAb240 を用いて同定しており、これは野生型 p53 タンパク質では検出することができない p53 タンパク質におけるアミノ酸残基 213～217 の潜在性エピトープに結合する。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【0009】

【非特許文献1】Buizza L. ら、「Conformational altered p53 as an early marker of oxidative stress in Alzheimer's disease」、PlosOne7(1):e29789

【非特許文献2】Uberti D ら、「Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients」、Neurobiology of Aging 27(2006)1193~1201

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は意外にも、アミノ酸282~297の直線状エピトープが露出される翻訳後修飾に起因する該タンパク質の立体構造変化アイソフォームを、特異的及び選択的に認識することができることが判明している抗ヒトp53を見出している。

【0011】

また、本発明者は意外にも、本発明の抗体により認識されるp53タンパク質のアイソフォームが、アルツハイマー病の被験者に特徴的に発現することを観察した。特に、本発明の抗体により認識される立体構造変化アイソフォームは、アルツハイマー病患者の生体試料、特に血液細胞、神経細胞又は他の細胞型の試料、並びに例えば血液、血漿、血清、唾液、尿などの生体液の試料に多量に発現する。

20

【0012】

本発明者はさらに、本発明の抗体により認識されるこの立体構造変化アイソフォームは、軽度認知障害(MCI)被験者の生体試料にも発現することを観察した。

【0013】

従って、本発明の抗体は、アルツハイマー病を診断するため、及びアルツハイマー病を発症する軽度認知障害(MCI)被験者の疾病素質を決定するための有用な診断及び予後診断用ツールである。

【0014】

最後に、本発明者は本発明の抗体に陽性のp53タンパク質アイソフォームの発現が、上記研究対象被験者の年齢及び認知障害に統計的に有意に相関することを観察した。

30

【0015】

従って、本発明の抗体は、加齢に伴い認知障害を発症する被験者の疾病素質を決定するのに有用である。

【0016】

従って、本発明の第1の目的は抗ヒトp53抗体であり、ヒトp53のDNA結合ドメイン(DBD)に存在する配列RRTEENLRKKGEPPH(配列番号1)である、ヒトp53のアミノ酸配列のアミノ酸位282~297にわたる直線状エピトープを認識することの特徴とする。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、p53タンパク質配列(配列番号3)を示す。

【図2】図2は、SAD及びFAD試料における2D3A8抗体陽性バンド及びPAb1620陽性バンドの強度比を示す。

【図3】図3は、アルツハイマー患者の血液細胞(PBMC)及び血清における2D3A8陽性p53アイソフォームの濃度を示す。

【図4】図4は、年齢と血液細胞(PBMC)における2D3A8陽性p53アイソフォームの濃度の相関を示す。

【図5】図5は、MMSE検査で得られた得点と2D3A8陽性p53アイソフォームの

50

濃度の相関を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の抗体の調製を以下の実験部分に記載する。

【0019】

好ましい実施形態において、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

【0020】

本発明の抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体を調製する任意の周知の方法により得ることができる。以下の実験部分において、配列がC R T E E E N L R K K G E P H H（配列番号2）であり、キャリアとしてウシ血清アルブミンに結合したペプチドからなる抗原を用いた動物（マウス）の免疫処置、及びハイブリドーマ技術による抗体の調製を、実施例に基づき説明する。

10

【0021】

上記のように、本発明の抗体物は、アルツハイマー病、及び加齢に伴う認知障害の発症に相関することが示されているヒトp53タンパク質のアイソフォームを特異的に認識する。従って、該抗体は有用な診断及び予後診断用ツールとなる。

【0022】

アルツハイマー病に特有のp53タンパク質に対する翻訳後修飾により、立体構造が変化したアイソフォームを決定する*in vitro*の方法、並びに添付の特許請求の範囲に定義され、本明細書の不可欠な部分を形成する診断及び予後診断方法もまた、本発明の一部である。

20

【0023】

添付の特許請求の範囲に定義される免疫診断キットもまた、本発明の一部である。

【0024】

本発明の方法及びキットを実行するため、周知の各種イムノアッセイを用いることができ、例えば、免疫沈降反応アッセイ、ELISAもしくはRIA、免疫蛍光法、ウェスタンブロット、FACS分析、免疫細胞化学／免疫組織化学などである。

【0025】

以下の非限定的な実施例を提供し、添付の特許請求の範囲に定義された本発明の範囲を説明する。

30

【実施例1】

【0026】

1a、免疫処置

健常で異常のない6／8週齢のマウスを免疫処置に用いた。抗体産生用抗原として用いたペプチドは、以下の特徴を有した。

配列：「N-末端」C R T E E E N L R K K G E P H H「C末端」（配列番号2）

長さ：16アミノ酸

分子量：1960.94

純度：96.4%

形状：凍結乾燥粉末

40

結合：グルタルアルデヒド法によりBSAと結合

【0027】

p53タンパク質配列（配列番号3）を図1に示す。DNA結合ドメイン（DBD）を灰色でハイライトし、下線は2D3A8抗体により認識される直線状エピトープである。

【0028】

最初の注射は、フロイント完全アジュバント（FCA）に抗原（50μg）を乳化することにより実施した。動物に、2～3箇所皮下注射した。フロイント不完全アジュバント（FIA）に乳化した抗原50μgを用い、3週間間隔で追加の注射を実施した。抗体価をELISAにより評価する。

【0029】

50

E L I S A アッセイにおいて、マウス 5 匹の血清における抗体力価を、上述のペプチドを用いた 3 回目の注射後に評価した。免疫マウスの血液を尾静脈から採取した。分光光度測定値により得られた吸光度値によって、各マウスに存在する抗体力価に関する重要な情報が与えられた。抗体力価が十分に高くなるように、動物にさらに追加の注射を行った。最初の融合のため、抗体力価が最も高いマウスを選択した。

【0030】

1 b、ハイブリドーマの成長

動物の脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞 (S P 2 / O 細胞株) と融合した。融合生成物を、抗原に対してスクリーニングし、抗体産生クローンを選択した。これらのクロンの増殖を継続した。この最初のスクリーニングは、E L I S A 法により行った。陽性クローンを親クローンとし、3 回継代培養後凍結した。E L I S A プレート上に抗原コーティングを行い、続いて融合生成物の上清を添加した。免疫動物の血清を E L I S A における陽性対照として用いた (実施例 2)。

【実施例 2】

【0031】

抗体力価が最も高いマウスの脾臓細胞、及びマウスの骨髓腫細胞を融合後、E L I S A アッセイを行い、融合生成物を評価した。96 ウェル E L I S A プレートに抗原のコーティングを行い、各クローン上清の段階希釈を各ウェルに添加して、分光光度測定値によりこれらの抗体産生を評価した。450 nm の光学密度 (O D 450 nm) が最も高いクローンを 24 ウェルプレートに移し、増殖後、E L I S A アッセイを繰り返し、抗体産生が最も高いクローンを 6 ウェルプレートに移し、増殖し、再度 E L I S A により試験した。培養フラスコに移したクローンにもこの手順を繰り返した。これらの連続するアッセイにより最も優れたクローンを同定し、最後に E L I S A、限界希釈法により試験し、陽性クローンが実際の抗体反応を示したことを確認した。

【0032】

有効な抗体を、O D 450 nm 値が最も高い、従って抗体力価が最も高いクローンの上清から精製した。この抗体を略して「クローン 2 D 3 A 8」とする。

【実施例 3】

【0033】

散発性及び家族性アルツハイマー病並びに M C I 患者における、2 D 3 A 8 抗体により認識される p 5 3 タンパク質の立体構造変化アイソフォームの発現に関する研究

散発性アルツハイマー (S A D) 及び家族性アルツハイマー (F A D) と診断された患者の不死化 B リンパ球において、タンパク質の野生型アイソフォーム (P A b 1 6 2 0) 及び立体構造変化アイソフォーム (2 D 3 A 8) を認識する 2 つの立体構造特異的抗体を用い、p 5 3 の立体構造状態を免疫沈降法により評価した。その後、ポリクローナル抗 p 5 3 抗体 (C M 1) を用いたウェスタンブロットにより、免疫沈降物を可視化した。実験データを、同じ試料の 2 D 3 A 8 抗体陽性バンド及び P A b 1 6 2 0 陽性バンドの強度比として表した。

【0034】

S A D 及び F A D 試料において、2 D 3 A 8 / 1 6 2 0 比は、痴呆のない対照患者のリンパ球と比較して、有意に高かった (図 2)。

【0035】

従って、2 D 3 A 8 抗体は、散発性 (S A D) 及び家族性 (F A D) アルツハイマー患者の不死化リンパ球に特徴的に発現する p 5 3 の立体構造変化アイソフォームを識別することができる。

【実施例 4】

【0036】

アルツハイマーと診断された患者、及び M C I と診断された軽度認知障害被験者の鮮血の試料において、2 D 3 A 8 抗体により認識される p 5 3 の立体構造変化アイソフォーム (2 D 3 A 8 陽性 p 5 3) を E L I S A により評価した。また、同齡の健常で痴呆のない

被験者も評価した。

【0037】

2D3A8陽性p53は、同じ患者又は被験者の血液細胞（PBMC）及び血清の両方で検出された。2D3A8抗体は、アルツハイマー患者を高い特異性で認識することができる。興味深いことに、軽度認知障害被験者においては、2D3A8陽性p53の血清濃度が、対照被験者に存在するタンパク質アイソフォーム濃度よりも統計的に高い。アルツハイマー患者のPBMC及び血清において、2D3A8陽性p53アイソフォームは、対照と比較して、統計的に増加した（図3）。

【実施例5】

【0038】

2D3A8陽性p53アイソフォームは、年齢に相関する。

【0039】

加齢に伴い、血液細胞（PBMC）における2D3A8陽性p53の発現は、統計的に有意に増加する（図4）。

【0040】

さらに、2D3A8陽性p53の発現は、周知の神経心理学的検査であるMMSEにより測定される認知状態に相関する。MMSE検査で得られた得点の減少に伴い、2D3A8陽性p53アイソフォームは増加する。すなわち、認知障害の進行に伴い増加する（図5）。

10

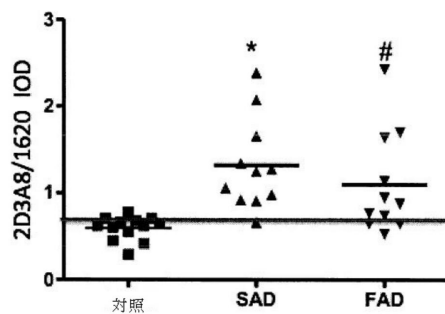
【図1】

```

MEEFQSDPSV  EPPLSQETFS  DLWKLLPENN  VLSPLPSQAM
DDLMLSPDDI  EQWFTEDEGP  DEAPRMPEAA  PPVAPAPAAP  TPAAPA-
PAPS  WPLSSSVPSQ  KTYQGSYGFR  LGFLHSGTAK  SVTCTYSPAL
NKMFCQLAKT  CPVQLWVDST  PPPGTRVRAA  IYKQSQHMTE
VVRRCPPHER  CSDSDGLAPP  QHLIRVEGNL  RVEYLDDRNT
ERHSVVVPYE  PPEVGSDCTT  IHNYMCNSS  CMGGMNRRPI  LTIIT-
LEDSS  GNLGRNSFE  VRVCACPGRD  RTEEENLRK  KGEPHELPP
GSTKRALPNN  TSSSPQPKKK  PLDGEYFTLQ  IRGRERFEMF  RELNEA-
LELK  DAQAGKEPGG  SRAHSSHLSK  KKGQSTSRHK  KLMFKTEGPD  SD

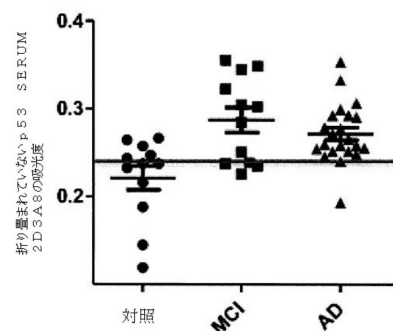
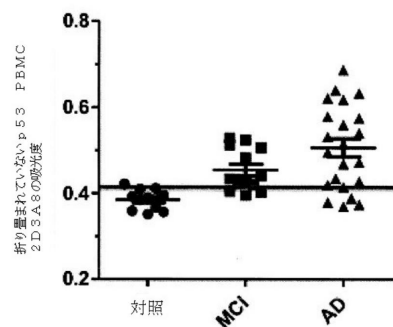
```

【図2】

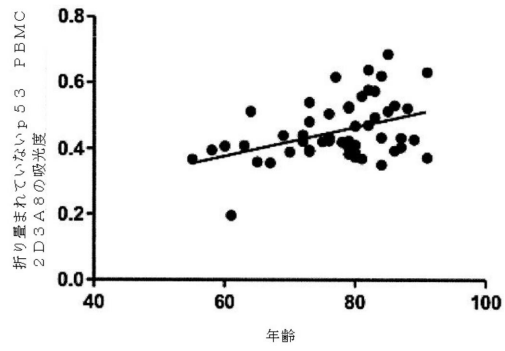


対照 vs SAD * $p < 0.01$
対照 vs FAD # $p < 0.05$

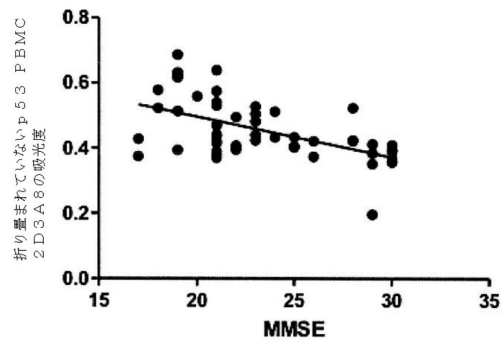
【図3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006938372000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

合議体

審判長 森井 隆信

審判官 中島 庸子

審判官 安居 拓哉

(56)参考文献 特表2005-520156号公報
Oncogene, 2001年, Vol. 20, pp. 1398-1401
Mpl. Psychiatry, 2008年, Vol. 13, pp. 641-647

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
IPC C07K 1/00-19/00
C12N15/00-15/90
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)