

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 556**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015 PCT/EP2015/072094**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015 E 15767529 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3201234**

54 Título: **Anticuerpo que se une a un epítipo lineal de p53 humana y sus aplicaciones para diagnóstico**

30 Prioridad:

30.09.2014 IT TO20140776

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.04.2019

73 Titular/es:

**DIADEM S.R.L. (100.0%)
Via XX Settembre, 14/A
25124 Brescia (BS) , IT**

72 Inventor/es:

**MEMO, MAURIZIO y
UBERTI, DANIELA LETIZIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 556 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

Anticuerpo que se une a un epítipo lineal de p53 humana y sus aplicaciones para diagnóstico

La presente invención se basa en el campo de los inmunodiagnósticos.

5 Más especialmente, la presente invención se refiere a un anticuerpo, a un equipo y a métodos *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer y/o la predisposición de un sujeto a desarrollar la enfermedad de Alzheimer o el deterioro cognitivo durante el envejecimiento.

10 El dominio de unión al ADN (DBD) de la proteína p53 humana (aa 101-306) se caracteriza por una flexibilidad de configuración en alto grado y contiene un ion Zn^{2+} coordinado por tres cisteínas (restos 176, 238 y 242) y una histidina (resto 179). En la isoforma natural de la proteína p53 humana, el epítipo lineal aa 282-297 está enmascarado y, por lo tanto, no está disponible para su reconocimiento por un anticuerpo específico de epítipo.

Sin embargo, debido a la flexibilidad en alto grado de su dominio DBD, la proteína p53 puede asumir varias configuraciones, que también caracterizan su actividad biológica.

15 En su configuración natural, p53 puede unirse a secuencias de consenso de ADN y transcribir/reprimir la expresión de genes diana. En esta configuración, la proteína expone un epítipo que es reconocido por el anticuerpo comercialmente disponible, específico por configuración llamado PAb1620.

Hay varios grados de estados de alteración de la configuración de p53, que corresponden a diferentes isoformas con la configuración alterada. Algunas mutaciones en el gen p53 causan un cambio de configuración de la proteína, que corresponde a una isoforma con configuración modificada capaz de ser reconocida por anticuerpos comercialmente disponibles, con configuración específica.

20 Otras isoformas con configuración modificada también pueden proceder de modificaciones tras la traducción, tales como las reacciones de oxidación y/o nitración, que alteran la estructura terciaria natural de la proteína.

25 Buizza L. *et al.* ("Conformational altered p53 as an early marker of oxidative stress in Alzheimer's disease", *PlosOne* 7(1):e29789) y Uberti D. *et al.* ("Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients", *Neurobiology of Aging* 27 (2006) 1193-1201) identifican ambos la expresión de la proteína p53 mutada en pacientes con enfermedad de Alzheimer, habiéndose hecho dicha identificación utilizando el anticuerpo anti-p53 PAb240 que se une a un epítipo críptico en los restos de aminoácidos 213-217 de la proteína p53, no detectable en la proteína p53 natural.

30 Los presentes inventores han encontrado inesperadamente una p53 antihumana que ha demostrado ser capaz de reconocer específica y selectivamente una isoforma de la proteína con la configuración alterada como resultado de sus modificaciones tras la traducción, en la que se expone el epítipo lineal aa 282-297.

35 Los inventores también han observado inesperadamente que la isoforma de una proteína p53 reconocida por el anticuerpo de la invención se expresa peculiarmente en sujetos con enfermedad de Alzheimer. En particular, la isoforma con configuración alterada reconocida por el anticuerpo de la invención se expresa en cantidades mayores en muestras biológicas, especialmente en muestras de células sanguíneas, células neuronales u otros tipos de células, así como en muestras de fluidos biológicos como, por ejemplo, sangre, plasma, suero, saliva, orina, de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Los inventores observaron además que dicha isoforma con configuración alterada reconocida por el anticuerpo de la invención también se expresa en muestras biológicas de sujetos con deterioro cognitivo leve (MCI).

40 Por lo tanto, el anticuerpo de la invención es una herramienta útil de diagnóstico y diagnóstico, para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer y para determinar la predisposición de un sujeto con deterioro cognitivo leve (MCI) para desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

Por último, los inventores observaron que la expresión de la isoforma de la proteína p53 positiva al anticuerpo de la invención de una manera estadísticamente significativa se correlaciona con la edad y el deterioro cognitivo de los sujetos estudiados.

45 Por lo tanto, el anticuerpo de la invención también es útil para determinar la predisposición de un sujeto a desarrollar deterioro cognitivo durante el envejecimiento.

50 Un primer objeto de la presente invención es, por lo tanto, un anticuerpo anti-p53 humano, caracterizado porque reconoce el epítipo lineal de secuencia RRTEENLRKKGEPHH (SEC ID n°: 1) presente en el dominio de unión al ADN (DBD) de p53 humana, abarcando dicho epítipo lineal las posiciones de aminoácidos 282-297 de la secuencia de aminoácidos de p53 humana.

La preparación del anticuerpo de la invención se describe en la siguiente parte experimental.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal.

55 El anticuerpo de la presente invención se puede obtener por cualquier metodología bien conocida para la preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales. En la siguiente parte experimental, se describe a modo de ejemplo la preparación del anticuerpo por inmunización animal (ratones) con un antígeno que consiste en un péptido

de secuencia CRTEENLRKKGEPHH (SEC ID n°: 2) conjugado con albúmina de suero bovino como vehículo y técnica de hibridoma.

Como se mencionó anteriormente, el objeto del anticuerpo de la presente invención reconoce específicamente una isoforma de la proteína p53 humana que se ha demostrado que se correlaciona con la enfermedad de Alzheimer y el desarrollo del deterioro cognitivo durante el envejecimiento. Dicho anticuerpo por lo tanto representa una herramienta útil de diagnóstico y pronóstico.

Un método *in vitro* para determinar una isoforma con configuración alterada por modificación tras la traducción de la proteína p53 peculiar de la enfermedad de Alzheimer, así como los métodos de diagnóstico y pronóstico definidos en las reivindicaciones adjuntas que forman parte integral de la presente descripción, también forman parte de la presente invención.

Un equipo de inmunodiagnóstico como se define en las reivindicaciones adjuntas también forma parte de la presente invención.

Para realizar los métodos y el kit de la invención, se puede usar cualquier tipo de inmunoanálisis bien conocido, como por ejemplo el análisis de inmunoprecipitación, ELISA o RIA, inmunofluorescencia, transferencia Western, análisis FACS, inmunocitoquímica/inmunohistoquímica.

Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan para ilustrar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

1a. Inmunización

Para la inmunización, se usaron ratones de 6/8 semanas de edad que estaban sanos y sin trastornos. El péptido utilizado como antígeno para la producción de anticuerpos tenía las siguientes características:

Secuencia: "N-terminal" CRTEENLRKKGEPHH "C terminal" (SEQ ID n°: 2)

Longitud: 16 aminoácidos

Peso molecular: 1960,94

Pureza: 96,4%

Forma: polvo liofilizado

Conjugación: conjugado con BSA por el método del glutaraldehído

La secuencia de la proteína p53 (SEC ID n°: 3) se representa en la figura 1, donde el dominio de unión al ADN (DBD) se resalta en gris, el epítipo lineal reconocido por el anticuerpo 2D3A8 está subrayado.

La primera inyección se ha realizado emulsionando el antígeno (50 µg) en adyuvante completo de Freund (FCA). Las inyecciones subcutáneas se han realizado en 2-3 sitios en el animal. Se han realizado inyecciones adicionales a intervalos de 3 semanas con 50 µg de antígeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (FIA). El valor de anticuerpos se evalúa por ELISA.

En el ensayo ELISA, el valor de anticuerpos presente en el suero de 5 ratones se evaluó después de la tercera inyección con el péptido descrito anteriormente. La sangre de ratones inmunizados se recogió de sus venas caudales. Los valores de absorbancia obtenidos después de la lectura espectrofotométrica proporcionaron información importante sobre el valor de anticuerpos presente en los diversos ratones. Los animales se sometieron a inyecciones adicionales de modo que el valor de anticuerpos alcanzó un nivel suficientemente alto. El ratón con el mejor valor de anticuerpos fue elegido para la primera fusión.

1b. Desarrollo de hibridomas

Se fusionaron esplenocitos de animales con células de mieloma de ratón (estirpe celular SP2/O). Los productos de fusión se sometieron a selección frente al antígeno para seleccionar los clones productores de anticuerpos. Se continuó con el crecimiento de estos clones. Este primer cribado se realizó por metodología ELISA. Los clones positivos se etiquetaron como "clones parentales" y se congelaron después de 3 pases. Se creó un revestimiento de antígeno en placas ELISA y, sucesivamente, se añadió el sobrenadante del producto de fusión. El suero de los animales inmunizados se usó como referencia positiva en ELISA (ejemplo 2).

Ejemplo 2

Después de la fusión entre los esplenocitos del ratón con el mejor valor de anticuerpos y las células de mieloma de ratón, se realizó un ensayo ELISA para evaluar los productos de fusión. Se creó un recubrimiento con el antígeno en una placa ELISA de 96 pocillos y se agregaron a cada pocillo diluciones en serie del sobrenadante de varios clones para evaluar su producción de anticuerpos mediante lectura espectrofotométrica. Los clones con la densidad óptica más alta a 450 nm (D.O._{450nm}) se transfirieron a placas de 24 pocillos y, después de su crecimiento, se repitió el ensayo ELISA, los clones con la mayor producción de anticuerpos se transfirieron a placas de 6 pocillos, se cultivaron y se probaron nuevamente por ELISA. El procedimiento se repitió también para los clones transferidos a

matraces de cultivo. Estos ensayos sucesivos permitieron la identificación de los mejores clones que se analizaron por última vez por ELISA, con el método de dilución límite para asegurar que los clones positivos mostraran una respuesta de anticuerpos real.

- 5 El anticuerpo validado se purificó del sobrenadante del clon con el valor más alto de D.O._{450 nm} y, por lo tanto, con el mejor valor de anticuerpos. Este anticuerpo se denomina "clon 2D3A8" por brevedad.

Ejemplo 3

Estudio de la expresión de la isoforma con configuración alterada de la proteína p53 reconocida por el anticuerpo 2D3A8 en pacientes con enfermedad de Alzheimer esporádica y familiar y MCI.

- 10 En los linfocitos B inmortalizados de pacientes diagnosticados con Alzheimer esporádico (SAD) y Alzheimer familiar (FAD), se evaluó el estado de la configuración de p53 por el método de inmunoprecipitación, utilizando dos anticuerpos con configuración específica que reconocen la isoforma natural de la proteína (PAb 1620) y una isoforma con configuración alterada (2D3A8). El inmunoprecipitado se visualizó luego por transferencia Western con un anticuerpo policlonal anti-p53 (CM1). Los datos experimentales se expresaron como una relación entre la intensidad de la banda positiva con el anticuerpo 2D3A8 y con PAb1620 de la misma muestra.

- 15 En las muestras de SAD y FAD, la relación 2D3A8/1620 fue significativamente más alta en comparación con los linfocitos de los pacientes de referencia sin demencia (figura 2).

Por lo tanto, el anticuerpo 2D3A8 puede discriminar una isoforma de p53 con configuración alterada expresada de forma peculiar en linfocitos inmortalizados de pacientes con Alzheimer esporádico (SAD) y familiar (FAD).

Ejemplo 4

- 20 En muestras de sangre fresca de pacientes diagnosticados de Alzheimer y de sujetos con deterioro cognitivo leve MCI, diagnosticado, se evaluó por ELISA la isoforma de p53 con configuración alterada reconocida por el anticuerpo 2D3A8 (p53 positiva a 2D3A8). También se evaluaron sujetos sanos sin demencia de la misma edad.

- 25 Se detectaron p53 positivas a 2D3A8 tanto en las células sanguíneas (PBMC) como en el suero de los mismos pacientes o sujetos. El anticuerpo 2D3A8 puede reconocerse con pacientes con Alzheimer de grado de alta especificidad. Curiosamente, los sujetos con deterioro cognitivo leve expresan niveles séricos de p53 positiva a 2D3A8 estadísticamente más altos que los niveles de isoforma de proteína presentes en los sujetos referencia. En las PBMC y en el suero de pacientes con Alzheimer, la isoforma p53 positiva a 2D3A8 se incrementó estadísticamente en comparación con las referencias (figura 3).

Ejemplo 5

- 30 La isoforma p53 positiva a 2D3A8 se correlaciona con la edad.

Durante el envejecimiento, la expresión de p53 positiva a 2D3A8 en células sanguíneas (PBMC) aumenta de manera estadísticamente significativa (figura 4).

- 35 Además, la expresión de p53 positiva a 2D3A8 se correlaciona con el estado cognitivo, medido por la prueba neuropsicológica MMSE bien conocida. La isoforma p53 positiva a 2D3A8 aumenta con la disminución de la puntuación obtenida en la prueba MMSE, es decir, aumenta con la evolución del deterioro cognitivo (figura 5).

Listado de secuencias

<110> Universidad de Brescia

5 <120> Anticuerpo que se une a un epítipo lineal de p53 humana y sus aplicaciones para diagnóstico

<130> p53

<150> ITTO20140776

10 <151> 2014-09-30

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	His
1				5					10					15	

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

Cys	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	His
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 392

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met	Glu	Glu	Pro	Gln	Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln
1				5					10					15	
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu
			20					25					30		
Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln	Ala	Met	Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp
		35					40					45			
Asp	Ile	Glu	Gln	Trp	Phe	Thr	Glu	Asp	Pro	Gly	Pro	Asp	Glu	Ala	Pro
	50					55					60				
Arg	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro
65					70					75					80

ES 2 708 556 T3

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Ala
145 150 155 160

Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro
165 170 175

His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His
180 185 190

Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg
195 200 205

Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val
210 215 220

Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser
225 230 235 240

Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu
245 250 255

Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg
260 265 270

Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu
275 280 285

Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys
290 295 300

Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys
305 310 315 320

Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg

ES 2 708 556 T3

325

330

335

Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala
340 345 350

Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu
355 360 365

Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe
370 375 380

Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

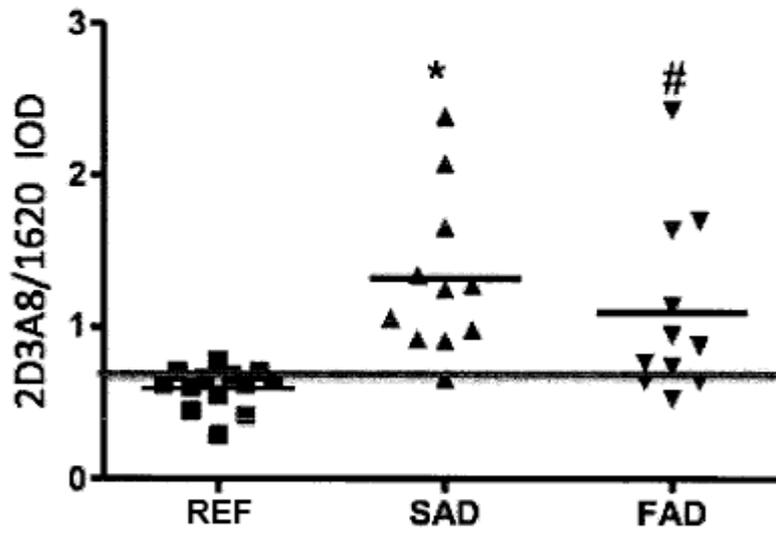
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-p53 humano, caracterizado porque se une al epítipo lineal de p53 humana de secuencia RRTEEEENLRKKGEPHH (SEC ID nº: 1).
- 5 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.
3. Un método para preparar un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por las etapas siguientes:
 - (i) inmunizar a un animal, no humano, con un inmunógeno que comprende un péptido de la proteína p53 humana de secuencia CRTEEEENLRKKGEPHH (SEC ID nº: 2) opcionalmente conjugado con un portador, en donde el portador es preferiblemente albúmina de suero bovino; y
 - (ii) aislar el anticuerpo obtenido tras la inmunización.
- 10 4. Un equipo de inmunoanálisis, que comprende al menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 medios para detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína p53 humana.
- 15 5. Un método *in vitro* para detectar una isoforma de la proteína p53 humana en una muestra, estando dicha isoforma alterada en su configuración por modificación tras la traducción con respecto a la proteína p53 humana natural, estando el método caracterizado porque la muestra se pone en contacto con al menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y el anticuerpo se detecta en la muestra.
- 20 6. Un método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende las etapas siguientes: (i) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos un anticuerpo anti-p53 humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en condiciones adecuadas para la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y al menos un anticuerpo; y (ii) detectar la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y al menos un anticuerpo, siendo la formación del inmunocomplejo indicativa de la enfermedad de Alzheimer.
- 25 7. Un método *in vitro* para determinar la predisposición de un sujeto afectado por un deterioro cognitivo leve para desarrollar la enfermedad de Alzheimer, caracterizado por las etapas siguientes:
 - (i) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos un anticuerpo anti-p53 humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en condiciones adecuadas para la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y al menos un anticuerpo; y
 - (ii) detectar la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y al menos un anticuerpo, siendo la formación del inmunocomplejo indicativa de predisposición a desarrollar la enfermedad de Alzheimer.
- 30 8. Un método *in vitro* para determinar la predisposición de un sujeto a desarrollar fragilidad cognitiva durante el envejecimiento, caracterizado por las etapas siguientes:
 - (i) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos un anticuerpo anti-p53 humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en condiciones adecuadas para la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y al menos un anticuerpo; y
 - (ii) detectar la formación de un inmunocomplejo entre la proteína p53 humana y al menos un anticuerpo, siendo la formación del inmunocomplejo indicativa de predisposición a desarrollar fragilidad cognitiva durante el envejecimiento.
- 40 9. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la muestra biológica es sangre, plasma, suero, saliva, orina, células neuronales, células sanguíneas u otros tipos de células.
- 45 10. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde la detección se lleva a cabo por la técnica de inmunoprecipitación, un inmunoanálisis, preferiblemente ELISA o RIA o un análisis de inmunofluorescencia, transferencia Western, análisis FACS o técnicas de inmunocitoquímica/inmunohistoquímica.
- 50

FIG.1

MEEPQSDPSV EPPLSQETFS DLWKLLPENN VLSPLPSQAM
DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP DEAPRMPEAA PPVAPAPAAP TPAAPA-
PAPS WPLSSSVPSQ **KTYQGSYGFR LGFLHSGTAK SVTCTYSPAL**
NKMFECOLAKT CPVQLWVDST PPPGTRVRAA LYKQSOHMTE
VVRRCPHHER CSDSDGLAPP QHLIRVEGNL RVEYLDDRNT
FRHSVVVPYE PPEVGSDCTT IHNYMCNSS CMGGMNRRI LTIIT-
LEDSS GNLGRNSFE VRVCACPGRD RRTEENLRK KGEPHHELP
GSTKRALPNN TSSSPQPKK PLDGEYFTLQ IRGRERFEMF RELNEA-
LELK DAQAGKEPGG SRAHSSHLKS KKGQSTSRHK KLMEKTEGPD SD

FIG.2



ref vs SAD * p<0,01
ref vs FAD # p<0,05

FIG.3

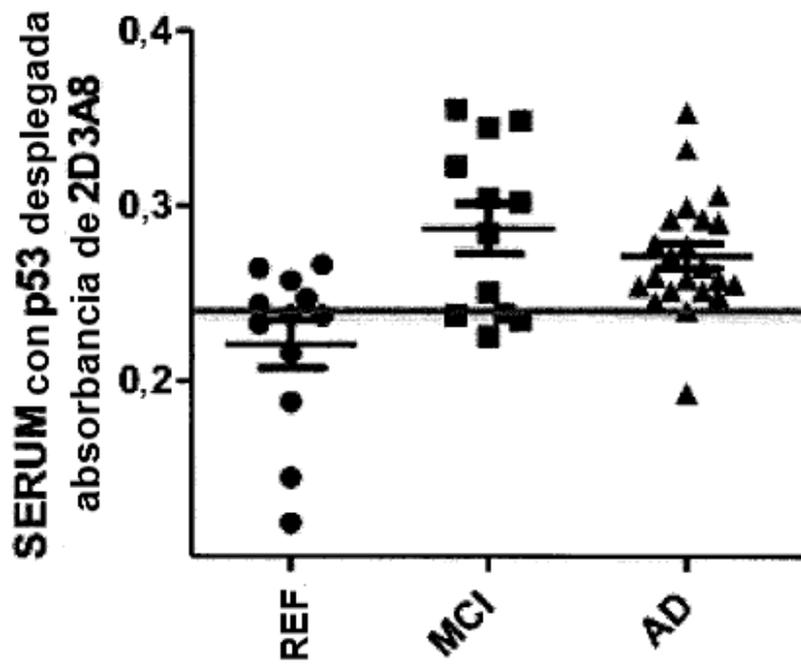
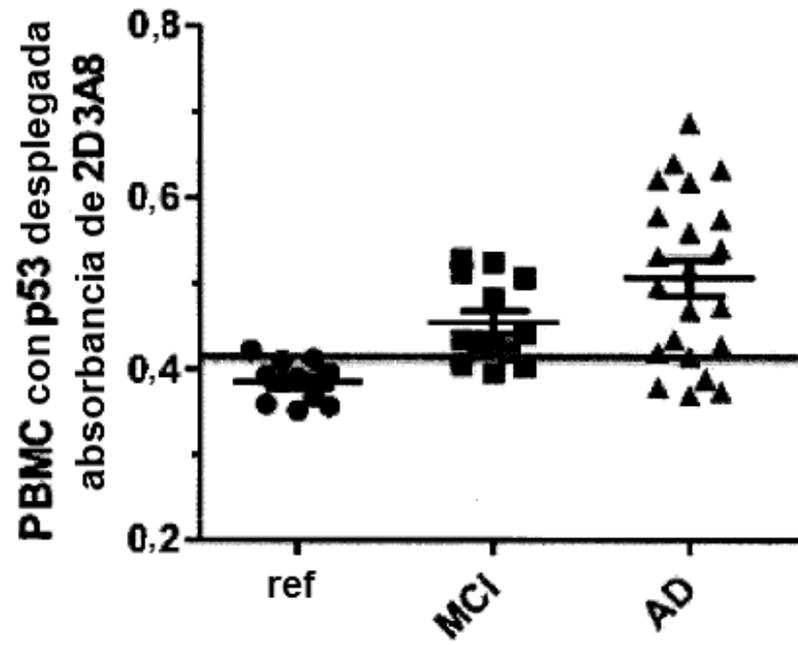


FIG. 5

