

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 10 月 12 日 (12.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/106957 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/02 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

1 丁目 15 番 1 号ー 1 0 2 号 株式会社ジーンネット
内 Fukuoka (JP). 堤 純一 (TSUTSUMI, Junichi) [JP/JP];
〒8120062 福岡県福岡市東区松島 1 丁目 15 番 1 号
ー 1 0 2 号 株式会社ジーンネット内 Fukuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/306921

(74) 代理人: 鈴木 崇生, 外(SUZUKI, Takao et al.); 〒
5320011 大阪府大阪市淀川区西中島 5 丁目 13-9
新大阪MTビル 1 号館 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2006 年 3 月 31 日 (31.03.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-106130 2005 年 4 月 1 日 (01.04.2005) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大
学法人 北海道大学 (National University Corporation
Hokkaido University) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市
北区北 8 条西 5 丁目 8 番地 Hokkaido (JP). 株式会社
ジーンネット (Genenet CO., LTD.) [JP/JP]; 〒8120062
福岡県福岡市東区松島 1 丁目 15 番 1 号ー 1 0 2 号
Fukuoka (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 坂口 和靖 (SAK-
AGUCHI, Kazuyasu). 中馬 吉郎 (CHUMAN, Yoshiro).
明日山 康生 (AKEBIYAMA, Yasuo) [JP/JP]; 〒8120062
福岡県福岡市東区松島 1 丁目 15 番 1 号ー 1 0 2 号
株式会社ジーンネット内 Fukuoka (JP). 松木 園 美穂
(MATSUKIZONO, Miho) [JP/JP]; 〒8120062 福岡県福
岡市東区松島 1 丁目 15 番 1 号ー 1 0 2 号 株式会
社ジーンネット内 Fukuoka (JP). 渡邊 麻希 (WATAN-
ABE, Maki) [JP/JP]; 〒8120062 福岡県福岡市東区松島

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFICALLY RECOGNIZING MODIFICATION SITE AFTER TRANSLATION
OF P53 AND KIT FOR ASSAYING MODIFICATION SITE CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: p 53 翻訳後修飾部位を特異的に認識するモノクローナル抗体、及びその抗体を含む修飾部位測
定キット

(57) Abstract: A monoclonal antibody recognizing modification after translation of p53 in a manner specific to a modification
site, an antibody microarray in which the antibody is immobilized on a substrate and the like are provided. The monoclonal an-
tibody specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing a
predetermined amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is
phosphorylated or acetylated or a peptide obtained by adding one to several arbitrary amino acids to the peptide and does not react
with the peptide which is not phosphorylated or acetylated.

(57) 要約: p 53 の翻訳後修飾を修飾部位特異的に認識するモノクローナル抗体、前記抗体を基板上に固定した
抗体マイクロアレイ等を提供する。配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の所定のアミノ酸残基を含む少なくとも
6 個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化またはアセチル化されたペ
プチドまたは前記ペプチドに 1 乃至数個の任意のアミノ酸が付加されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化また
はアセチル化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体。

WO 2006/106957 A1

明 細 書

p53翻訳後修飾部位を特異的に認識するモノクローナル抗体、及びその抗体を含む修飾部位測定キット

技術分野

[0001] 本発明は、癌抑制遺伝子産物p53(以下、「p53」または「p53タンパク質」ということがある)の翻訳後修飾を修飾部位特異的に認識するモノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、抗体マイクロアレイおよびp53タンパク質の翻訳後修飾の測定キット等に関し、特にp53の生理機能発現制御機構の研究、抗癌剤や免疫抑制剤の開発等に有用である。なお、2005年4月1日に日本国特許庁提出の日本特許出願JP2005-106130号に含まれる明細書、特許請求の範囲、図面及び要約は、その全ての内容を引用することによって本願に組み込まれる。

背景技術

[0002] p53は、様々な細胞ストレスにより活性化され、標的遺伝子の特異的DNA配列に結合してその転写活性を制御する転写因子である。p53は、複数の標的遺伝子の発現制御を通じて、DNA修復、細胞周期停止、アポトーシス誘導などの種々の生理機能を発揮する。

[0003] p53は、通常、細胞内において低いレベルで維持されているが、細胞が様々なストレス、例えば、放射線照射、紫外線照射、アドリマイシン等の抗がん剤等によるDNA損傷、熱ショック、浸透圧ショック、低酸素ショック等の細胞ストレスを受けると、安定化されて核内に蓄積し、転写因子として活性化される。活性化したp53はチェックポイント制御に関与するp21^{WAF1}、DNA修復に関与するDDB2、p53R2、アポトーシスに関与するBAX、p53AIP1等の遺伝子の発現を誘導する。

[0004] 近年、この生理機能の発現制御には、p53のリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾が深く関与していることが明らかにされている。

[0005] X線や紫外線照射により軽度のDNA損傷が生じた場合、ATM(Ataxia Telangiectasia Mutated)、ATR(Ataxia Telangiectasia Related)が活性化され、その下流のChk1、Chk2をリン酸化し、Chk1、Chk2はp53の20番目のセリン(以下、

「Ser20」ということがある)をリン酸化し、MDM2との会合を阻害することによって、p53がユビキチン化されプロテアソームにより分解されることを抑制し、p53が安定化される。また、p53の15番目のセリン(以下、「Ser15」ということがある)は、ATM、ATRにより直接リン酸化されて、MDM2タンパク質とp53との結合を阻害し、p53が安定化および活性化される。安定・活性化したp53は、G1停止期関連遺伝子p21^{WAF1}、あるいはDNA修復関連遺伝子p53R2のプロモーターに結合し、これらの発現を誘導する。

[0006] 重度のDNA損傷が生じた場合には、Ser46キナーゼが活性化されて、活性化されたp53はさらに、46番目のセリン(以下、「Ser46」ということがある)がリン酸化される。Ser46リン酸化p53は、p53AIP1遺伝子のプロモーターに結合し、p53AIP1遺伝子が発現誘導され、p53依存性アポトーシス経路が活性化し、細胞はアポトーシスで死滅する。また、紫外線照射や抗癌剤により活性化されたp38MAPKがp53の33番目のセリン(以下、「Ser33」ということがある)をリン酸化し、p53依存性アポトーシスに関与するという報告もある。さらに、p53のC末端領域に存在する376番目のセリン(以下、「Ser376」ということがある)と378番目のセリン(以下、「Ser378」ということがある)は、通常の状態の細胞内ではともにリン酸化されているが、放射線照射により細胞がDNA損傷を受けると、Ser376のリン酸化状態は維持されるが、Ser378は脱リン酸化されることが報告されている。

[0007] また、p53の生理機能発現は、p53のアセチル化によっても制御されている。p53は、転写共役因子(コファクター)との相互作用を介して標的遺伝子の転写を制御しているが、前記転写共役因子のうち、p300/CBP、PCAF等はヒストンアセチル化酵素(HAT)活性を有する。p53は、これらHATと相互作用して、標的遺伝子のヒストンアセチル化を促進するほか、p53自身もアセチル化される。アセチル化されるのはp53のC末端の320番目、373番目および382番目のリジン(以下、それぞれ「Lys320」、「Lys373」および「Lys382」ということがある)である。PCAF/GCN5はLys320、p300/CBPはLys373およびLys382を特異的にアセチル化する。p53はアセチル化されるとDNAへの特異的結合能が強化される。これは、C末端の正電荷がアセチル化により中和され、p53の構造変化を引き起こし、p53のDNAドメインが

露出するためと考えられている。また、DNA損傷などにより活性化された場合、まずN末端がリン酸化され、そのN末端にp300/CBP等のHATが結合し、C末端をアセチル化するというモデルも考えられている。

[0008] ヒトp53タンパク質は393アミノ酸残基からなり、大きく3つの領域、(i) 1-100アミノ酸残基: 転写活性化ドメインおよびプロリンリッチドメイン、(ii) 100-300アミノ酸残基: 配列特異的DNA結合ドメイン、および(iii) 300-393アミノ酸残基: 四量体形成ドメインおよび塩基性調節ドメイン、に大別され、転写活性化ドメインおよびプロリンリッチドメインを含むN端領域に7個のリン酸化部位(Ser15、Ser20、Ser33、37番目のセリン(以下、「Ser37」ということがある)、Ser46、81番目のスレオニン(以下、「Thr81」ということがある)、90番目のセリン(以下、「Ser90」ということがある))、C端領域に5個のリン酸化部位(315番目のセリン(以下、「Ser315」ということがある)、371番目のセリン(以下、「Ser371」ということがある)、Ser376、Ser378、392番目のセリン(以下、「Ser392」ということがある))、および3個のアセチル化部位(Lys320、Lys373、Lys382)の存在が既に明らかにされている。

[0009] ヒト癌で最も高頻度に変異が検出されるp53遺伝子において、その変異のほとんどはDNA結合領域に集中している。このことは、p53変異による癌化が、その発現制御系の異常に起因するものであることを示唆している。したがって、p53変異を介した発癌機構の解明には、上述したp53の翻訳後修飾による生理機能の発現制御機構の解明が不可欠であり、p53の特定の部位におけるリン酸化および／またはアセチル化を検出または定量できるツール(例えば抗体)や測定方法の開発等が強く求められている。

[0010] これらの要求に鑑み、従来から、Chk1、Chk2、ATM、ATR、DNP-PKの酵素活性を測定する方法が提案されており、これらの方法において使用されるp53の翻訳後修飾部位特異的ポリクローナル抗体が知られている(特許文献1～5、非特許文献1～18)。

特許文献1: 国際公開第99/36532号パンフレット

特許文献2: 特開2000-325086号公報

特許文献3: 特開2001-161398号公報

特許文献4:特表2002-524092号公報

特許文献5:特開2003-93056号公報

非特許文献1:Tanaka, H他: Nature, 404:42-49, 2000

非特許文献2:Oda, K 他: Cell, 102: 849-862, 2000

非特許文献3:Chehab, N. H他: Gene Dev., 14: 278-288, 2000

非特許文献4:Shieh, S. Y他: Gene Dev., 14: 289-300, 2000

非特許文献5:Banin, S他: Science, 281: 1674-1677, 1998

非特許文献6:Tibbetts, R. S他:Gene Dev., 13:152-157, 1999

非特許文献7:Dumaz, NおよびMeek, D. W: EMBO J., 18:7002-7010, 1999

非特許文献8:Bulavin, D. V他, EMBO J., 18: 6845-6854, 1999

非特許文献9:Sanchez-Prieto, R: Cancer Res., 60: 2464-2472, 2000

非特許文献10:Waterman, M. J. F他: Nature Genet., 19:175-179, 1998

非特許文献11:Gu, WおよびRoeder, R. G.: Cell, 90:595-606, 1997

非特許文献12:Sakaguchi, K他: Gene Dev., 12: 2831-2841, 1998

非特許文献13:Lambert, P. F他: J. Biol. Chem., 273:33048-33053, 1998

非特許文献14:田矢洋一編、実験医学、19(No. 9):1050-1084、2001

非特許文献15:田矢洋一、細胞工学Vol. 22, No.1, p29-33、2003

非特許文献16:J Biol Chem. 2000 July 28 ; 275 (30) : 23199-23203

非特許文献17:J Biol Chem. 2002 April 12 ; 277 (15) : 12491-12494

非特許文献18:J Biol Chem. 2003 July 11 ; 278 (28) : 25568-25576

発明の開示

- [0011] しかしながら、上記従来の方法およびポリクローナル抗体では、翻訳後修飾部位に対する特異性が十分とはいえず、p53の翻訳後修飾部位の修飾状態を並列かつ独立に検出することができるツールの開発が求められている。また、ヒトp53には、前述の翻訳後修飾部位のほかに、4個のリン酸化部位(6番目のセリン残基(以下「Ser6」ということがある)、9番目のセリン残基(以下「Ser9」ということがある)、18番目のスレオニン残基(以下、「Thr18」ということがある)、55番目のスレオニン残基(以下、「Thr55」という))、4個のアセチル化部位(305番目のリジン(以下、「Lys305」ということ

がある)、370番目のリジン(以下、「Lys370」ということがある)、372番目のリジン(以下、「Lys372」ということがある)、381番目のリジン(以下、「Lys381」ということがある))がさらに存在し、前記従来技術では、p53のリン酸化／脱リン酸化およびアセチル化／脱アセチル化による生理機能発現制御を十分に解析することができない。さらに、p53は、複数の翻訳後修飾シグナルを介して分子内構造変化を引き起こし、分子内のみならずp53分子間でも相互作用していることが予想され、p53上の複数の翻訳後修飾部位の修飾状態を同時かつ網羅的に検出、定量することができるツールの開発が強く求められている。

[0012] そこで、本発明の目的は、p53の翻訳後修飾を修飾部位特異的に認識するモノクローナル抗体、前記抗体を基板上に固定した抗体マイクロアレイ等を提供することにある。

[0013] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究したところ、以下のモノクローナル抗体、抗体マイクロアレイ等により本発明の目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0014] 即ち、本発明は、

(1) 以下(a)、(b)または(c)いずれかのペプチドと特異的に反応し、リン酸化またはアセチル化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体、

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第6番目、第9番目、第15番目、第18番目、第20番目、第33番目、第37番目、第46番目、第55番目、第81番目、第90番目、第315番目、第371番目、第376番目、第378番目または第392番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチド

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第305番目、第320番目、第370番目、第372番目、第373番目、第381番目または第382番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がアセチル化されたペプチド、または

(c) 上記(a)または(b)のペプチドに、1乃至数個の任意のアミノ酸が付加されたペプチド。

(2)前記(a)のペプチドが、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16または配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、

前記(b)のペプチドが、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、または配列番号24で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである上記(1)記載のモノクローナル抗体、

(3)P53No. 18 4B(FERM ABP-10561)、P53No. 17 16B(FERM AP-20478)、P53No. 23 1C(FERM AP-20479)、P53No. 5 16A(FERM ABP-10562)、P53No. 10 6A(FERM ABP-10563)またはP53No. 2 20G(FERM AP-20480)で標示されるハイブリドーマにより産生される上記(2)に記載のモノクローナル抗体、

さらに好ましくは、P53No. 18 4B(FERM ABP-10561)、P53No. 5 16A(FERM ABP-10562)またはP53No. 10 6A(FERM ABP-10563)で標示されるハイブリドーマにより産生される上記(2)に記載のモノクローナル抗体、

(4)P53No. 3 3Bc(FERM ABP-10576)、
P53No. 4 13C(FERM ABP-10577)、
P53No. 11 7C(FERM ABP-10578)、
P53No. 12 1A(FERM ABP-10579)、
P53No. 22 11B(FERM ABP-10580)または
P53No. 23 1A(FERM ABP-10581)で標示されるハイブリドーマにより産生される上記(2)に記載のモノクローナル抗体である。

(5)上記(1)～(4)いずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、

(6)P53No. 18 4B(FERM ABP-10561)、P53No. 17 16B(FERM AP-20478)、P53No. 23 1C(FERM AP-20479)、P53No. 5 16A(FERM ABP-10562)、P53No. 10 6A(FERM ABP-10563)またはP53No. 2 20G(FERM AP-20480)で標示される上記(5)記載のハイブリドーマ、

- (7) P53No. 3 3Bc (FERM ABP-10576)、
P53No. 4 13C (FERM ABP-10577)、
P53No. 11 7C (FERM ABP-10578)、
P53No. 12 1A (FERM ABP-10579)、
P53No. 22 11B (FERM ABP-10580) または
P53No. 23 1A (FERM ABP-10581) で標示される上記(5)記載のハイブリド
ーマ、
(8) 上記(1)～(4)いずれかに記載のモノクローナル抗体を基板上に固定化したこと
を特徴とする抗体マイクロアレイ、
(9) 上記(1)～(4)いずれかに記載のモノクローナル抗体または上記(8)に記載の
抗体マイクロアレイを含むp53タンパク質の翻訳後修飾状態の測定キット、
(10) 上記(1)～(4)いずれかに記載のモノクローナル抗体または上記(8)に記載の
抗体マイクロアレイを用いることを特徴とするp53タンパク質の翻訳後修飾状態の測
定方法等に関する。

[0015] 本発明のモノクローナル抗体は、p53の翻訳後修飾部位の修飾アミノ酸残基およ
びその近傍のアミノ酸残基を特異的に認識して結合し、翻訳後修飾部位のアミノ酸
残基が修飾を受けていない場合には結合しない。このため、p53上の複数の翻訳後
修飾部位の修飾状態の独立かつ並列な検出、定量に使用することができ、p53研究
並びに癌の診断に極めて有用である。特に、p53のリン酸化は、p53の不活性化の
抑制及びシグナルの増強を行い、相互依存的な修飾酵素とp53分子内修飾の2次
的な活性化と、種々のストレスからのシグナルの統合を含む2つのカスケードによって
調整されている。これらの修飾部位の相互依存的なカスケードが成立されていること
が予想される中で、p53の複数の翻訳後修飾部位のリン酸化状態を網羅的に検出
できる本発明の抗体マイクロアレイ、キットは有用である。本発明の抗体マイクロアレ
イは、p53上の複数の翻訳後修飾部位の修飾状態の同時かつ網羅的な検出、定量
に使用することができ、p53の癌化抑制メカニズムの解明ばかりでなく癌の診断や治
療に関しても極めて有用なツールとなる。さらに、本発明の測定キットおよび測定方
法は、p53の翻訳後修飾状態の簡便かつ迅速な検出・定量に使用することができ、p

53研究並びに癌の診断・治療にきわめて有用である。

図面の簡単な説明

- [0016] [図1]種々のコーティングスライドガラスにDO-1抗体をスポットしたときの、シグナル強度を示すグラフである。
- [図2]種々の保存条件における、DO-1抗体のスポット状態を示すものである。
- [図3]抗体の固定化量とシグナル強度との関係を示すグラフである。
- [図4]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図5]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図6]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図7]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図8]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図9]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図10]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図11]モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す図である。
- [図12]アセチル化認識抗体交叉反応性におけるモノクローナル抗体の濃度依存性を示す図である。
- [図13]アセチル化認識抗体交叉反応性におけるモノクローナル抗体の濃度依存性を示す図である。
- [図14]382Ac-1A抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0017] 以下、本発明において、アミノ酸、(ポリ)ペプチドの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定[IUPAC-ICB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)に従う。
- [0018] 本発明において、「(ポリ)ペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合により結合した化合物を指し、その鎖長は問わない。したがって、タンパク質も本発明における「(ポリ)ペプチド」に含まれる。また、本発明において、「タンパク質」や「(ポリ)ペプチド」には、特定のアミノ酸配列で示される「タンパク質」や「(ポリ)ペプチド」だけで

なく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体(ホモログやスプライスバリエント)、変異体、誘導体、成熟体およびアミノ酸修飾体などが包含される。ここでホモログとしては、ヒトのタンパク質に対応する他の生物種のタンパク質が例示でき、これらは遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また、変異体には、天然に存在する変異体、存在しない変異体、および人為的に欠失、置換、付加および挿入されることにより改変されたアミノ酸配列を有する変異体が含まれる。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質または(ポリ)ペプチドと、少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%相同なものを挙げることができる。

[0019] 本発明において、「翻訳」とは、ゲノムDNA(時にはRNA)から転写により生じたmRNAの情報を読み取って、リボソーム上でアミノ酸配列に変換し、タンパク質が生成されることをいう。また、「翻訳後修飾」とは、翻訳により生成したタンパク質が、その役割、活動に応じて、さらに種々の修飾を受けることをいい、具体的には、特異的プロテアーゼによるペプチド鎖の切断(プロセッシング)、リン酸化、アセチル化、メチル化、アデニル化、ADPリボシル化、糖鎖付加などのアミノ酸残基の修飾等が挙げられる。本発明においては、特に言及しない限り、「翻訳後修飾されたp53」とは翻訳後にリン酸化および／またはアセチル化されたp53を、「修飾(ポリ)ペプチド」および「修飾された(ポリ)ペプチド」とは、特に言及しない限り、リン酸化および／またはアセチル化された(ポリ)ペプチドを、「修飾されていない(ポリ)ペプチド」および「非修飾の(ポリ)ペプチド」とは、リン酸化およびアセチル化されていない(ポリ)ペプチド、を指す。

[0020] ヒトp53は、393個のアミノ酸からなり、そのアミノ酸配列は配列番号1に示されている。本発明において、p53の翻訳後修飾部位とは、特に限定しない限り、インビボまたはインビトロにおいて、Chk1、Chk2、ATM、ATR、Ser46キナーゼ、p38MAPK、PKC、CKII等のリン酸化酵素やp300/CBP、PCAF、GCN5等のHATにより翻訳後修飾(リン酸化またはアセチル化)され得るアミノ酸残基を指し、具体的なp53のリン酸化部位としては、ヒトp53の第6番目のセリン、第9番目のセリン、第15番目のセリン、第18番目のスレオニン、第20番目のセリン、第33番目のセリン、第37番目のセリン、第46番目のセリン、第55番目のスレオニン、第81番目のスレオニン、第90

番目のセリン、第315番目のセリン、第371番目のセリン、第376番目のセリン、第378番目のセリンまたは第392番目のセリン等を挙げることができ、アセチル化部位としては、ヒトp53の第305番目のリジン、第320番目のリジン、第370番目のリジン、第372番目のリジン、第373番目のリジン、第381番目のリジンまたは第382番目のリジン等を挙げることができる。

[0021] 本発明のモノクローナル抗体は、以下(a)、(b)または(c)いずれかのペプチドと特異的に反応し、リン酸化またはアセチル化されていない前記ペプチドとは反応しないことを特徴とする。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第6番目、第9番目、第15番目、第18番目、第20番目、第33番目、第37番目、第46番目、第55番目、第81番目、第90番目、第315番目、第371番目、第376番目、第378番目または第392番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチド

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第305番目、第320番目、第370番目、第372番目、第373番目、第381番目または第382番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がアセチル化されたポリペプチド

(c) 上記(a)または(b)のペプチドにおいて、1乃至数個の任意のアミノ酸が付加、置換若しくは挿入されたペプチド(但し、リン酸化アミノ酸残基またはアセチル化アミノ酸残基が置換される場合を除く)

本発明のモノクローナル抗体は、上記(a)～(c)いずれかの修飾ペプチドと特異的に反応し、非修飾の上記ペプチドとは反応しない。すなわち、p53の翻訳後修飾されたアミノ酸残基およびその周辺のアミノ酸残基を認識して結合し、翻訳後修飾部位のアミノ酸残基が修飾を受けていない場合には結合しない。この特異性により、p53タンパク質上の複数の翻訳後修飾部位の修飾(リン酸化またはアセチル化)を並列かつ独立に検出、定量することが可能となる。

[0022] 上記(a)のペプチドは、ヒトp53における、リン酸化Ser6、リン酸化Ser9、リン酸化Ser15、リン酸化Thr18、リン酸化Ser20、リン酸化Ser33、リン酸化Ser37、リン酸化

Ser46、リン酸化Thr55、リン酸化Thr81、リン酸化Ser90、リン酸化Ser315、リン酸化Ser371、リン酸化Ser376、リン酸化Ser378またはリン酸化Ser392を含む連続したアミノ酸配列からなるペプチドであり、リン酸化Ser6、リン酸化Ser9、リン酸化Ser20、リン酸化Thr55、リン酸化Thr81、リン酸化Ser90、リン酸化Ser315、リン酸化Ser371、リン酸化Ser376、またはリン酸化Ser378を含むリン酸化ペプチドが好ましく、リン酸化Ser9、リン酸化Ser20、またはリン酸化Thr81を含むリン酸化ペプチドがさらに好ましい。また、そのアミノ酸長は6個～全長であり、より好ましくは6～20個、さらに好ましくは6～14個である。

[0023] 上記(a)のペプチドとしてさらに好ましくは、MEEPQS^(P)DPSVEP(配列番号2)、PQS DPS^(P)VEPPLS(配列番号3)、EPPLS^(P)QETFSDL(配列番号4)、PLSQET^(P)FSDLWK(配列番号5)、SQETFS^(P)DLWKLL(配列番号6)、PENNVLS^(P)PLPSQA(配列番号7)、LSPLPS^(P)QAMDDL(配列番号8)、DDLMLS^(P)PDDIEQ(配列番号9)、IEQWFT^(P)EDPGPD(配列番号10)、APAAPT^(P)PAAPAP(配列番号11)、PAPAPS^(P)WPLSSS(配列番号12)、NNTSSS^(P)PQPKKK(配列番号13)、SSHLKS^(P)KKGQST(配列番号14)、SKKGQS^(P)TSRHKK(配列番号15)、KKGQSTS^(P)RHKKLMF(配列番号16)、またはFKTEGPDS^(P)D(配列番号17)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのうちさらに好ましくは、MEEPQS^(P)DPSVEP(配列番号2)、PQSDPS^(P)VEPPLS(配列番号3)、SQETFS^(P)DLWKLL(配列番号6)、IEQWFT^(P)EDPGPD(配列番号10)、APAAPT^(P)PAAPAP(配列番号11)、PAPAPS^(P)WPLSSS(配列番号12)、NNTSSS^(P)PQPKKK(配列番号13)、SSHLKS^(P)KKGQST(配列番号14)、SKKGQS^(P)TSRHKK(配列番号15)、またはKKGQSTS^(P)RHKKLMF(配列番号16)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのうち特に好ましくは、PQSDPS^(P)VEPPLS(配列番号3)、SQETFS^(P)DLWKLL(配列番号6)、またはAPAAPT^(P)PAAPAP(配列番号11)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである。ここで、上記アミノ酸配列において、S^(P)はリン酸化セリン、T^(P)はリン酸化スレオニンを表す。

[0024] 上記(b)のペプチドは、ヒトp53における、アセチル化Lys305、アセチル化Lys320、アセチル化Lys370、アセチル化Lys372、アセチル化Lys373、アセチル化Lys381またはアセチル化Lys382を含む、連続したアミノ酸配列からなるペプチドであり

、アセチル化Lys305、アセチル化Lys320、アセチル化Lys370、アセチル化Lys372、またはアセチル化Lys381を含むアセチル化ペプチドが好ましく、アセチル化Lys305またはアセチル化Lys320を含むアセチル化ペプチドがさらに好ましい。また、そのアミノ酸長は6個～全長、より好ましくは6～20個、さらに好ましくは6～14個である。

[0025] 上記(b)のペプチドとしてさらに好ましくは、PPGSTK^(Ac)RALPNN(配列番号18)、SPQPKK^(Ac)KPLDG(配列番号19)、HSSHLK^(Ac)SKKGQ(配列番号20)、SHLKSK^(Ac)KGQST(配列番号21)、HLKSKK^(Ac)GQSTS(配列番号22)、STSRHK^(Ac)KLMFK(配列番号23)、またはTSRHKK^(Ac)LMFKT(配列番号24)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのうちさらに好ましくは、PPGSTK^(Ac)RALPNN(配列番号18)、SPQPKK^(Ac)KPLDG(配列番号19)、HSSHLK^(Ac)SKKGQ(配列番号20)、SHLKSK^(Ac)KGQST(配列番号21)、またはSTSRHK^(Ac)KLMFK(配列番号23)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのうちで特に好ましくは、PPGSTK^(Ac)RALPNN(配列番号18)またはSPQPKK^(Ac)KPLDG(配列番号19)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである。ここで、上記アミノ酸配列中、K^(Ac)はアセチル化リジンを表す。

[0026] 上記(c)のペプチドとしては、例えば、上記(a)または(b)のペプチドにおいて、1～5個の任意のアミノ酸が付加されたペプチド、1～5個のアミノ酸が置換されたペプチド(但し、上記(a)または(b)のペプチドにおいて、リン酸化セリン残基、リン酸化スレオニン残基またはアセチル化リジン残基が置換される場合を除く)、若しくは1～5個の任意のアミノ酸が挿入されたペプチドを挙げることができるが、1または2個のアミノ酸が付加、置換若しくは挿入されたペプチドが好ましい。

[0027] 本発明のモノクローナル抗体には、Fv、FabおよびF(ab')₂、scFv、dsFv等の抗体断片が含まれ、生物種や製造方法は特に限定されない。また、ハイブリッド抗体、改変抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体等のハイブリドーマを用いずに製造されたもの(例えば、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体から産生される遺伝子組換え抗体)も含まれる。前記抗体断片は、例えば、本発明のモノクローナル抗体をパパイインやペプシンなどのタンパク質分解酵素で処理することにより得ることができる。

[0028] 本発明のモノクローナル抗体は、使用目的に応じて、適宜適当な標識物質により標識することができる。標識物質としては、使用目的に応じて適宜選択されるが、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、アセチルコリンエステラーゼなどの酵素、Cy3、Cy5、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)等の蛍光物質、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S などの放射性同位元素、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリンなどの発光物質、ビオチン、ランタニド元素などを用いることができる。

また、本発明の抗体を標識することなく、本発明の抗体と特異的に結合する二次抗体、プロテインAなどを上記標識物質により標識してもよい。また、酵素を標識物質として用いた場合には、その活性を測定するため、基質、発色剤などが用いることができる。例えば、酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼを用いる場合には、基質に H_2O_2 を用い、発色剤に2, 2'-アジノージ- [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン(OPD)等、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合には、基質として、オルトニトロフェニルフォスフェート等、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、基質としてフルオレセイン-ジ- (β -D-ガラクトピラノシド) 等を用いることができる。

[0029] 本発明のモノクローナル抗体は、上記(a)、(b)または(c)いずれかのペプチドを抗原として得ることができる。上記ペプチドのうち、修飾アミノ酸を含まない部分に対する抗体が産生されることを極力避けるため、上記修飾アミノ酸残基が上記ペプチドの中央部に位置するペプチドを抗原として使用することが好ましい。また、後述するキャリアタンパク質との結合のため、上記ペプチドのN末端またはC末端にシステインを付加したものやN末端の α アミノ基を保護するためN末端の α アミノ基にアセチル基を導入したものを用いてもよい。

[0030] 前記抗原の調製方法は、従来公知の方法がいずれも使用可能であるが、例えば、ペプチド自動合成装置を用いた公知のペプチド合成方法によって、あるいは前記抗原をコードするDNAを含む形質転換体を培養することにより調製することができる。

[0031] 前記ペプチド自動合成装置を用いた公知のペプチド合成方法としては、固相合成

法、液相合成法のいずれを用いてもよく、例えば、固相合成法により合成する場合には、ペプチドが結合した固相担体をフッ化水素で処理して、ペプチドを固相担体より遊離させ、同時にアミノ酸側鎖の保護基を除去することにより目的のペプチドを得ることができる。得られたペプチド粗生成物は、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶等により精製単離することができる。

[0032] 上記抗原をコードするDNAを含む形質転換体を用いて前記抗原を調製する場合には、例えば、前記抗原のアミノ酸配列に基づいてデザインされたDNAプローブまたはプライマーを用いて、上記抗原をコードするDNAを含有する形質転換体を得る。この形質転換体を常法に従って培養すると、細胞内または細胞外に目的のポリペプチドが産生される。産生されたペプチドは、通常の精製方法、例えば、限外ろ過、分子ふるいクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより精製することができる。

[0033] 上記のようにして得られるペプチド抗原を用いた、本発明のモノクローナル抗体の作製方法を以下に説明する。

[0034] まず、上記抗原で動物を免疫する。上記抗原は、不溶化したものを直接免疫してもよく、上記抗原とキャリアタンパク質との複合体を免疫してもよい。キャリアタンパク質としては、特に限定されず、例えば、オボアルブミン、 γ グロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン(KHL)、BSA等の従来公知の各種タンパク質を挙げることができる。上記抗原をキャリアタンパク質に結合する方法としては、システイン残基のSH基を利用する方法(MBS法)、アミノ基を利用する方法(ビスイミドエステル法、グルタルアルデヒド法)、フェノールを利用する方法(ビスージアゾベンチジン法)、カルボキシル基を利用する方法(カルボジイミド法)などを挙げることができる。これらの方法に

は、種々の架橋剤を用いることができ、例えば、グルタルアルデヒド、 m -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、ビスービアゾ化ベンチジン等を用いることができる。前記動物としてはウサギ、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ハムスター、ニワトリ等を挙げることができる。上記免疫は、動物の腹腔内、静脈内、皮下等に前記抗原または前記複合体を投与することにより行い、投与に際して、前

記抗原とともに、適当なアジュバント、例えば、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント等を投与してもよい。抗原の投与は、例えば、通常、1～6週おきに1回ずつ計2～10回程度行う。血清中の抗体価の測

定は、放射線免疫検定法(RIA)、酵素免疫検定法(EIA)、固相酵素免疫検定法(ELISA)、蛍光免疫検定法(FIA)等の従来公知の方法が何れも使用できるが、検出感度、迅速性等の観点から、ELISA法が好適である。免疫に用いた上記抗原に対して、十分な抗体価を示した動物から本発明のモノクローナル抗体を調製する。

[0035] 上記十分な抗体価を示した動物の脾臓またはリンパ節を摘出し、これらに含まれる抗体産生細胞(脾臓細胞またはリンパ球)と骨髓腫細胞とを融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製する。

[0036] 前記抗体産生細胞の採取は、従来公知の方法に従い行うことができ、例えば、脾臓細胞の場合、動物より摘出した脾臓を両端で切除し、押し出し、ガーゼでこすことによって、融合用の脾臓細胞を得ることができる。

[0037] 細胞融合に用いられる骨髓腫細胞には特に制限はなく、公知の細胞株から適宜選択できるが、前記骨髓腫細胞としては、P3-X63Ag8-U1(P3U1)、NS-1、SP2/0、X63.653、P3-X63Ag8(P3)、FO等を挙げることができ、P3U1が特に好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば、8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8-アザグアニンを加えた培地]で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日に 2×10^7 個以上の細胞数を確保しておくことが好ましい。

[0038] 上記のように免疫した抗体産生細胞と骨髓腫細胞との融合およびハイブリドーマの選択は、従来公知の方法により行うことができる。細胞融合の方法としては、例えば、センダイウイルスを使用する方法、ポリエチレングリコール等の高分子ポリマーを使用する化学的方法や高電圧パルスによる電気穿孔法等を挙げることができ、BR>驕B例えば、ポリエチレングリコールを用いる方法の場合、抗体産生細胞数と骨髓腫細胞数の好ましい比率としては、1:1～10:1程度であり、分子量1000～6000のポリエチレ

ングリコールを10～50%の濃度で添加し、通常、室温、好ましくは37℃で、通常5分間インキュベートすることにより細胞融合を実施することができる。ハイブリドーマの選択は、通常、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン、アミノプリテン、チミジンを加えた培地)で未融合細胞とハイブリドーマを培養して、アミノプリテン耐性を備えたハイブリドーマのみを選択的に増殖させることにより行うことができる。

[0039] 上記のようにして得られたハイブリドーマのクローニングは、従来公知の方法を使用することができ、例えば、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等を挙げることができるが、限界希釈法が特に好適である。この方法では、例えば、通常培地で1～2週間程度培養し、免疫原に対して抗対価の認められるものについて、限界希釈法により、さらにクローニングを2回程度繰り返し、安定して高い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。抗体価の測定は、上記抗血清の抗体価測定法に準じて行うことができる。

[0040] このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株としては、ハイブリドーマP53No. 18 4B(受領番号FERM ABP-10561、2005年2月18日付国際寄託)、ハイブリドーマP53No. 17 16B(受領番号FERM AP-20478、2005年3月25日付寄託)、ハイブリドーマP53No. 23 1C(受領番号FERM AP-20479、2005年3月25日付寄託)、ハイブリドーマP53No. 5 16A(受領番号FERM ABP-10562、2005年3月25日付国際寄託)、ハイブリドーマP53No. 10 6A(受領番号FERM ABP-10563、2005年3月25日付国際寄託)、ハイブリドーマP53No. 2 20G(受領番号FERM AP-20480、2005年3月29日付寄託)等があり、これらは独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0041] 上記のハイブリドーマ株としては、ハイブリドーマP53No. 18 4B(受領番号FERM ABP-10561)、ハイブリドーマP53No. 5 16A(受領番号FERM ABP-10562)、ハイブリドーマP53No. 10 6A(受領番号FERM ABP-10563)が好ましい。

[0042] また、上記のようにクローニングされた他のハイブリドーマ株としては、P53No. 3 3Bc(受領番号FERM ABP-10576)、P53No. 4 13C(受領番号FERM ABP-10577)、P53No. 11 7C(受領番号FERM ABP-10578)、P53No. 12

1A(受領番号FERM ABP-10579)、P53No. 22 11B(受領番号FERM ABP-10580)またはP53No. 23 1A(受領番号FERM ABP-10581)等があり、これらは独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2006年3月27日付で国際寄託されている。

[0043] 上記のようにして得られたハイブリドーマを適当な培地中で培養し、その培養上清を従来公知の方法により精製することによって本発明のモノクローナル抗体を製造することができる。この方法は、高純度のモノクローナル抗体を得る場合に好適に用いることができる。また、上記ハイブリドーマをマウスの腹腔内に注射すると腹水癌化し、本発明のモノクローナル抗体を含む腹水が得られる。これを従来公知の方法により精製することによっても本発明のモノクローナル抗体を製造することができる。この方法は、モノクローナル抗体を大量生産する場合に好適に用いることができる。上記モノクローナル抗体の既知の精製方法としては、例えば、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等を挙げることができる。

[0044] 上記のようにして得られた本発明のモノクローナル抗体を使用して、p53タンパク質の翻訳後修飾の状態を修飾部位特異的に検出、定量することが可能である。具体的な検出、測定には、放射線免疫検定法(RIA)、酵素免疫検定法(EIA)、固相酵素免疫検定法(ELISA)、蛍光免疫検定法(FIA)、発光免疫検定法等、従来公知の方法が何れも使用することができる。これらの測定方法は、一般的な競合法やサンドイッチ法等の手法に従って実施することができる。

[0045] また、本発明によれば、上記本発明のモノクローナル抗体を基板上に固定化したことを特徴とする抗体マイクロアレイが提供される。ここで、抗体マイクロアレイ(抗体チップ、プロテインチップともいう)とは、基板上に抗体を整列(アレイ)して固定化させたデバイスを意味する。

[0046] 本発明の抗体マイクロアレイは、1種または2種以上の上記モノクローナル抗体を含んでいればよく、基板に固定化されるモノクローナル抗体の数は特に限定されない。また、前記基板上に固定化されるモノクローナル抗体には、Fv、FabおよびF(ab')₂、scFv、dsFv等の抗体断片も含まれ、生物種や製造方法には限定されない。また、

ハイブリッド抗体、改変抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体等ハイブリドーマを用いずに製造されたものも含まれる。複数種の上記モノクローナル抗体を固定化した抗体マイクロアレイは、一つの試料に対して、同時かつ網羅的にp53の翻訳後修飾の有無および量を修飾部位特異的に検出することが可能であり、翻訳後修飾されたp53のプロファイリング、翻訳後修飾シグナル経路の検出等に好適に用いることができる。

[0047] 前記基板上に固定化されるモノクローナル抗体は、使用目的に応じて、適宜適当な標識物質により標識することができる。標識物質としては、使用目的に応じて適宜選択されるが、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、アセチルコリンエステラーゼなどの標識酵素、Cy3、Cy5、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)等の蛍光物質、放射性同位元素、ビオチンなどを用いることができる。また、本発明の抗原を標識することなく、本発明の抗体と特異的に結合する二次抗体、プロテインAなどを標識して使用してもよい。

[0048] 上記抗体マイクロアレイは、上記モノクローナル抗体を基板上に固定化することにより作製することができる。基板の材質、大きさ、形状は特に限定されない。抗体マイクロアレイの基板としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ニトロセルロース、フッ化ビニリデン等、従来公知の何れの基板も使用することができ、これらを化学表面処理(シラン化、アミノ化、アルデヒド化、チオール化、エポキシ化、活性エステル化)、金被覆、アルミニウム被覆、ポリリジンなどのカチオン性ポリマー被覆、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲルなどの親水性ポリマー被覆したものなどを用いることができる。具体的には、高密度アミノ基導入タイプ、アミノシランコートタイプ、poly-L-Lysineタイプ、アルデヒド基導入タイプ、Takara-HubbleSlide Glass等市販のコーティング済スライドガラスを例示することができるが、安定にシグナルを得ることができるという点で、X基-アミノ修飾オリゴDNA固定用マイクロアレイ用コートが好ましい。

[0049] また、前記基板に抗体を固定化する方法としては、光リソグラフィー法、マイクロスタンプ法、メカニカルマイクロスポット(接触型)法、マイクロピペッティング法、マイクロディスペンシング(非接触型)法、ジェットプリント法、エレクトロスプレーデポジション(ESD)法、ナノリソグラフィー法、その他従来公知の方法が何れも使用することができ

る。マイクロアレイした後の固定化は、基材の種類にもよるが、物理吸着、イオン結合、共有結合（アミド結合、シッフ塩基、エーテル結合、ジスルフィド結合、化学架橋、光固定等）、アフィニティ結合（GSTタグ、Hisタグ、ビオチン-アビジン）を挙げることができる。安定化、高感度化のためには、共有結合が好ましい。コーティングスライドガラスを基材として用いる場合には、必要に応じてコーティングスライドガラスを前処理してもよい。抗体のスポットティングに使用するスポットティング溶液には、従来公知のスポットティング溶液を使用することができるが、等張液が好ましく、PBSが特に好ましい。スポットティングは従来公知のアレイ機等を用いて行うことができる。スポットティングの後には、必要に応じて非特異的反応が起こらないようブロッキング処理を行うことが好ましい。ブロッキング溶液としては、従来公知のブロッキング溶液を適宜選択して使用することができるが、エタノールアミン、グリシン、BSAが好ましく、エタノールアミンが特に好ましい。

[0050] 本発明の抗体マイクロアレイを用いた検出、測定方法としては、蛍光色素のシグナル強度を検出する方法、酵素化学発光を利用した検出方法、表面プラズモン共鳴現象を利用する方法、マススペクトルを利用する方法や電気化学的に測定する方法がある。蛍光色素のシグナル強度を検出する方法としては、例えば、試料中のタンパク質をCy5、コントロールをCy3で標識し、これを混合して、本発明の抗体マイクロアレイに接触させ、各タンパク質の蛍光色の相違を利用する方法を挙げることができる。また、試料中のタンパク質をビオチンでラベルして、本発明の抗体マイクロアレイにより検出してもよい。酵素化学発光を利用する方法としては、例えば、サンドイッチ法の場合、本発明の抗体マイクロアレイと抗原を結合させた後、ビオチン標識された2次抗体を結合させ、ストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼを用いて化学発光を検出することができる。電気化学的方法の場合、上記モノクローナル抗体をプローブとして固定化する基材に伝導性物質を用い、これを電極として使用することができる。

[0051] 本発明の抗体マイクロアレイによれば、p53上の複数の翻訳後修飾部位の修飾状態を同時かつ網羅的に検出することができる。例えば、本発明の抗体マイクロアレイにストレスを受けた細胞由来のp53タンパク質を反応させる。その結果、例えば、373

番目のリジン残基がアセチル化され、392番目のセリン残基がリン酸化されていることがわかれば、このストレスを受けた場合のp53修飾部位の修飾状況を明らかにすることができる。

[0052] また、他の態様としては、本発明の抗体マイクロアレイを疾患(特に癌)の診断に使用することができる。例えば、ある癌患者由来のp53タンパク質をCy5で標識し、健常者由来のp53タンパク質をCy3で標識して、これらを混合し、本発明の抗体マイクロアレイと接触させ、市販のレーザーを用いたマイクロアレイ・リーダーにより、蛍光色素の蛍光強度を測定すれば、癌患者由来のp53の翻訳後修飾の状態を検出・定量することができる。さらに、他の態様としては、本発明の抗体マイクロアレイを用いて、抗癌剤や免疫抑制剤に有用な化合物をスクリーニングすることができる。

[0053] また、本発明によれば、本発明のモノクローナル抗体または本発明の抗体マイクロアレイ若しくはその両方を含むp53タンパク質の翻訳後修飾の測定キットが提供される。本発明の測定キットによれば、p53タンパク質の翻訳後修飾の状態を簡便かつ迅速に測定することができる。本発明の測定キットに含まれるモノクローナル抗体および抗体マイクロアレイに固定化された抗体プローブは、検出を容易にするため適当な標識物資で標識することが好ましく、特にFITC、ビオチンにより標識することが好ましい。

[0054] また、本発明の測定キットには、本発明のモノクローナル抗体または抗体マイクロアレイのほか、測定、検出を実施するに際して必要な任意の他の試薬を更に包含することができる。具体的には、例えば、前述の修飾ペプチド抗原または蛍光標識した修飾ペプチド抗原、アッセイ緩衝液、検出用抗体、蛍光標識2次抗体、ブロッキング液等を例示することができ、酵素標識を用いる場合には、基質、発色剤等も例示することができる。

[0055] さらに、本発明によれば、本発明のモノクローナル抗体または抗体マイクロアレイを用いることを特徴とする、p53タンパク質の翻訳後修飾状態の測定方法が提供される。かかる方法によれば、p53タンパク質の翻訳後修飾の状態を簡便かつ迅速に測定することができる。

[0056] 上記測定方法は、例えば、次のように行うことができる。種々の細胞ストレスを負荷

した条件下で細胞を培養し、これからp53を調製する。次いで、調整されたp53と本発明のモノクローナル抗体とを接触(反応)させ、ストレス負荷条件下におけるp53の翻訳後修飾の状態を部位特異的に検出する。検出に本発明の抗体マイクロアレイを用いれば、p53上の複数の翻訳後修飾部位の修飾状態を同時かつ網羅的に測定することができ好ましい。

- [0057] その他の実施態様としては、本発明のモノクローナル抗体または抗体マイクロアレイを用いることを特徴とする、癌の診断方法も本発明により提供される。具体的には、例えば、ある癌患者由来のp53タンパク質をCy5で標識し、健常者由来のp53タンパク質をCy3で標識して、これらを混合し、本発明のモノクローナル抗体、抗体マイクロアレイと接触させ、色素蛍光強度の相対変化量を測定すれば、癌患者由来のp53の翻訳後修飾の状態を検出・定量でき、これを前記癌の診断に利用することができる。また、本発明のモノクローナル抗体または抗体マイクロアレイを用いることを特徴とする抗癌剤として有用な化合物をスクリーニングする方法も提供される。さらには、本発明のモノクローナル抗体を有効成分として含有する医薬組成物、抗癌剤も本発明により提供される。

実施例

- [0058] 以下、本発明の構成と効果を具体的に示す実施例等について説明する。なお、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

<実施例1>

(1) 抗原ペプチドの選択および合成

393アミノ酸残基からなるp53タンパク質のうち、目的とするp53翻訳後修飾部位を含むペプチド配列をデザインし、それらのペプチドを合成した。該ペプチドはN末端あるいはC末端にシステインを付加し、かつN末端 α アミノ基をアセチル基で保護した。表1(表中、Acはアセチル基、S(P)はリン酸化セリン、T(P)はリン酸化スレオニン、K(Ac)はアセチル化リジンを表す)に示すように、配列番号25~47で表されるアミノ酸配列からなる修飾ペプチド、配列番号48~70で表されるアミノ酸配列からなる非修飾ペプチド(配列番号25~47で表されるアミノ酸配列と同配列のペプチドであって、リン酸化またはアセチル化されていないペプチド)および配列番号71~93で

表されるアミノ酸配列からなる修飾ペプチド(配列番号25～47で表されるアミノ酸配列からなる修飾ペプチドのN末端に1乃至2残基のアミノ酸を付加した修飾ペプチド)を合成した。合成方法を以下に説明する。

[0059] [表1:合成された抗原ペプチドを示す]

配列番号	配列名	アミノ酸配列
25	Ac-1-12(6P)-C	Ac-MEEPQ-S(P)-DPSVEP-C
26	Ac-4-15(9P)-C	Ac-PQSDP-S(P)-VEPPLS-C
27	Ac-11-22(15P)-C	Ac-EPPL-S(P)-QETFSDL-C
28	Ac-13-24(18P)-C	Ac-PLSQE-T(P)-FSDLWK-C
29	Ac-15-26(20P)-C	Ac-SQETF-S(P)-DLWKLL-C
30	Ac-27-39(33P)-C	Ac-PENNVL-S(P)-PLPSQA-C
31	Ac-32-43(37P)-C	Ac-LSPLP-S(P)-QAMDDL-C
32	Ac-41-52(46P)-C	Ac-DDLML-S(P)-PDDIEQ-C
33	Ac-50-61(55P)-C	Ac-IEQWF-T(P)-EDPGPD-C
34	Ac-76-87(81P)-C	Ac-APAAP-T(P)-PAAPAP-C
35	Ac-85-96(90P)-C	Ac-PAPAP-S(P)-WPLSSS-C
36	Ac-310-321(315P)-C	Ac-NTSS-S(P)-PQPKKK-C
37	Ac-366-377(371P)-C	Ac-SSHLK-S(P)-KKGQST-C
38	Ac-371-382(376P)-C	Ac-SKKGQ-S(P)-TSRHKK-C
39	Ac-C-372-385(378P)	Ac-C-KKGQST-S(P)-RHKKLMF
40	Ac-C-385-393(392P)	Ac-C-FKTEGPD-S(P)-D
41	Ac-300-311(305Ac)-C	Ac-PPGST-K(Ac)-RALPNN-C
42	Ac-315-325(320Ac)-C	Ac-SPQPK-K(Ac)-KPLDG-C
43	Ac-365-375(370Ac)-C	Ac-HSSLK-K(Ac)-SKKGQ-C
44	Ac-367-377(372Ac)-C	Ac-SHLKS-K(Ac)-KGQST-C
45	Ac-368-378(373Ac)-C	Ac-HLKS-K(Ac)-GQSTS-C
46	Ac-376-386(381Ac)-C	Ac-STRH-K(Ac)-KLMFK-C
47	Ac-377-387(382Ac)-C	Ac-TSRHK-K(Ac)-LMFKT-C
48	Ac-1-12-C	Ac-MEEPQSDPSVEP-C
49	Ac-4-15-C	Ac-PQSDPSVEPPLS-C
50	Ac-11-22-C	Ac-EPPLSQETFSDL-C
51	Ac-13-24-C	Ac-PLSQETFSDLWK-C
52	Ac-15-26-C	Ac-SQETFSDLWKLL-C
53	Ac-27-39-C	Ac-PENNVLSPLPSQA-C
54	Ac-32-43-C	Ac-LSPLPSQAMDDL-C
55	Ac-41-52-C	Ac-DDLMLSPDDIEQ-C
56	Ac-50-61-C	Ac-IEQWFTEDPGPD-C
57	Ac-76-87-C	Ac-APAAPTPAAPAP-C
58	Ac-85-96-C	Ac-PAPAPSWPLSSS-C
59	Ac-310-321-C	Ac-NTSSSPQPKKK-C
60	Ac-366-377-C	Ac-SSHLKSKKGQST-C
61	Ac-371-382-C	Ac-SKKGQSTSRHKK-C
62	Ac-C-372-385	Ac-C-KKGQSTSRHKKLMF
63	Ac-C-385-393	Ac-C-FKTEGPDSD
64	Ac-300-311-C	Ac-PPGSTKRALPNN-C
65	Ac-315-325-C	Ac-SPQPKKKPLDG-C
66	Ac-365-375-C	Ac-HSSLKSKKGQ-C
67	Ac-367-377-C	Ac-SHLKSKKGQST-C
68	Ac-368-378-C	Ac-HLKS-K(Ac)-GQSTS-C
69	Ac-376-386-C	Ac-STRHKKLMFK-C
70	Ac-377-387-C	Ac-TSRHKKLMFKT-C
71	1-12(6P)-C	MEEPQ-S(P)-DPSVEP-C
72	3-15(9P)-C	EPQSDP-S(P)-VEPPLS-C
73	10-22(15P)-C	VEPPL-S(P)-QETFSDL-C
74	12-24(18P)-C	PPLSQE-T(P)-FSDLWK-C
75	14-26(20P)-C	LSQETF-S(P)-DLWKLL-C
76	26-39(33P)-C	LPENNVL-S(P)-PLPSQA-C
77	31-43(37P)-C	VLSPLP-S(P)-QAMDDL-C
78	40-52(46P)-C	MDDLML-S(P)-PDDIEQ-C
79	49-61(55P)-C	DIEQWF-T(P)-EDPGPD-C
80	75-87(81P)-C	PAPAAP-T(P)-PAAPAP-C
81	84-96(90P)-C	APAPAP-S(P)-WPLSSS-C
82	309-321(315P)-C	PNNTSS-S(P)-PQPKKK-C
83	365-377(371P)-C	HSSLK-S(P)-KKGQST-C
84	370-382(376P)-C	KSKKGQ-S(P)-TSRHKK-C
85	371-385(378P)	SKKGQST-S(P)-RHKKLMF
86	384-393(392P)	MFKTEGPD-S(P)-D
87	299-311(305Ac)-C	LPPGST-K(Ac)-RALPNN-C
88	314-325(320Ac)-C	SSPQPK-K(Ac)-KPLDG-C
89	364-375(370Ac)-C	AHSSLK-K(Ac)-SKKGQ-C
90	366-377(372Ac)-C	SSHLKS-K(Ac)-KGQST-C
91	367-378(373Ac)-C	SHLKS-K(Ac)-GQSTS-C
92	375-386(381Ac)-C	QSTRH-K(Ac)-KLMFK-C
93	376-387(382Ac)-C	STRHK-K(Ac)-LMFKT-C

ペプチド合成はFmoc chemistryを用いた手動固相合成法で行った。合成スケールは0.2mmol、リン酸化セリン(Ser^(P))、リン酸化スレオニン(Thr^(P))、アセチル化リジン(Lys^(Ac))は、それぞれFmoc-Ser(PO(Obzl)OH)-OH、Fmoc-Thr(PO(Obzl)-OH)-OH、Fmoc-Lys(Ac)-OHを用いて導入した(表2:Fmoc-アミノ酸残基)。N末端は、無水酢酸(1mmol)でアセチル化した。合成ペプチドは、ReagentK(82.5%トリフルオロ酢酸、5%水、5%チオアニソール、5%フェノール、2.5%1,2-エタンジチオール)、室温、3時間で脱樹脂・脱保護反応を行った。

[0060] [表2:Fmoc-アミノ酸残基を示す]

	Fmoc-AA-OH	MW	
A	Fmoc-Ala-OH	311.3	
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662.8	
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH	585.7	
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.7	
E	Fmoc-Glu(otBu)-OH	425.5	
G	Fmoc-Gly-OH	297.3	
H	Fmoc-His(Trt)-OH	619.7	
I	Fmoc-Ile-OH	353.4	
L	Fmoc-Leu-OH	353.4	
K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.5	
M	Fmoc-Met-OH	371.5	
F	Fmoc-Phe-OH	387.4	
P	Fmoc-Pro-OH	337.4	
Ser(P)	Fmoc-Ser(PO(Obzl)OH)-OH	497.44	
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.4	
Thr(P)	Fmoc-Thr(PO(Obzl)OH)-OH	511.5	
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	397.5	
W	Fmoc-Trp-OH	426.5	
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459.6	
V	Fmoc-Val-OH	339.4	
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	596.7	
D	Fmoc-Asp(otBu)-OH	411.5	
Lys(Ac)	Fmoc-Lys(Ac)-OH	410.5	

上記のようにして得られたペプチドは、PRE-PACKED COLUMN RT 250-20(MIGHTYSIS RP-18 GP 5 μ m)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。溶出は0.05%TFA-アセトニトリルの直線濃度勾配により行っ

た。精製されたペプチドを含む画分を回収後、凍結乾燥した。最終的に、精製されたペプチドの純度は、analytical PRE-PACKED COLUMN RT 250-4.6 (MYGHTYSIS RP-18 GP 5 μ m)を用いた高速液体クロマトグラフィーおよびMALDI-TOF質量分析装置(AppliedBiosystems社製、Voyager DE-PRO)によって確認した。得られた各合成ペプチドの質量分析の結果を表3に示す。

[0061] [表3:合成ペプチドの質量分析の結果を示す]

番号	配列名	MW	実測値
25	Ac-1-12(6P)-C		
26	Ac-4-15(9P)-C	1477.53	1503.76
27	Ac-11-22(15P)-C	1587.62	1586.97
28	Ac-13-24(18P)-C	11675.8	1677.75
29	Ac-15-26(20P)-C		
30	Ac-27-39(33P)-C		
31	Ac-32-43(37P)-C	1511.65	1511.63
32	Ac-41-52(46P)-C	1615.66	1615.11
33	Ac-50-61(55P)-C	1658.65	1658.93
34	Ac-76-87(81P)-C	1256.37	1256.54
35	Ac-85-96(90P)-C	1421.52	1421.61
36	Ac-310-321(315P)-C	1540.61	1543.92
37	Ac-366-377(371P)-C	1512.72	1513.49
38	Ac-371-382(376P)-C	1596.72	1597.89
39	Ac-C-372-385(378P)		
40	Ac-C-385-393(392P)	1220.17	1220.27
41	Ac-300-311(305Ac)-C	1438.58	1439.63
42	Ac-315-325(320Ac)-C		
43	Ac-365-375(370Ac)-C	1423.56	1424.7
44	Ac-367-377(372Ac)-C	1387.52	1388.03
45	Ac-368-378(373Ac)-C		
46	Ac-376-386(381Ac)-C	1549.81	1551.57
47	Ac-377-387(382Ac)-C		
48	Ac-1-12-C		
49	Ac-4-15-C		
50	Ac-11-22-C	1507.62	1530.11
51	Ac-13-24-C	1595.77	1597.03
52	Ac-15-26-C		
53	Ac-27-39-C		
54	Ac-32-43-C		
55	Ac-41-52-C	1535.66	1535.87
56	Ac-50-61-C	1578.65	1578.99
57	Ac-76-87-C	1176.37	1175.47
58	Ac-85-96-C	1341.52	1341.77
59	Ac-310-321-C		
60	Ac-366-377-C	1432.6	1433.08
61	Ac-371-382-C	1516.72	1517.46
62	Ac-C-372-385		
63	Ac-C-385-393		
64	Ac-300-311-C	1396.58	1396.97
65	Ac-315-325-C	1339.52	1340.79
66	Ac-365-375-C	1381.56	1382.73
67	Ac-367-377-C	1345.52	1346.43
68	Ac-368-378-C	1345.52	1346.64
69	Ac-376-386-C	1507.81	1508.39
70	Ac-377-387-C		
71	1-12(6P)-C	1527.53	1527.02
72	3-15(9P)-C	1564.59	1565.32
73	10-22(15P)-C	1643.7	1645.79
74	12-24(18P)-C	1730.84	1732.94
75	14-26(20P)-C	1761.92	1763.83
76	26-39(33P)-C	1661.79	1663.75
77	31-43(37P)-C	1568.72	1604.54
78	40-52(46P)-C	1704.8	1704.75
79	49-61(55P)-C	1731.69	1732.09
80	75-87(81P)-C	1311.44	1311.51
81	84-96(90P)-C	1450.55	1450.83
82	309-321(315P)-C	1595.65	1594.87
83	365-377(371P)-C	1607.69	1609.12
84	370-382(376P)-C	1682.84	1683.89
85	371-385(378P)	1843.06	1841.26
86	384-393(392P)	1206.17	1205.15
87	299-311(305Ac)-C	1509.69	1510.29
88	314-325(320Ac)-C	1426.6	1427.77
89	364-375(370Ac)-C	1452.59	1453.82
90	366-377(372Ac)-C	1432.55	1433.5
91	367-378(373Ac)-C	1431.55	1433.79
92	375-386(381Ac)-C	1635.89	1636.59
93	376-387(382Ac)-C	1607.86	1609.89

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

KLH(PIERCE社製、No. 77600)に対して、N-(m-マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミド[N-(m-maleimidobenzoyloxy)succinimide:以下、MBSという](PIERCE社製、No. 22311)1mg/0.4mL N,N-ジメチルホルムアミド(

以下、DMFAという)を混合し、1時間、室温で反応させた後、0.05Mのリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化した脱塩カラム(Sephadex G-25、ファルマシア社製)に供し、遊離のMBSを除去して、KLH-マレイミド10mgを得た。上記(1)で合成した、配列番号25~47で表されるアミノ酸配列からなる修飾ペプチド5mgに対してKLH-マレイミドを10mg加えて室温で2時間反応させ、得られたペプチド-KLH複合体を抗原として用いた。

[0062] 予備飼育したBALB/cマウス(各ペプチド当たり5匹使用)に対して、KLH-複合体を50 μ g/匹となるよう、完全フロイントアジュバント(ICN/Cappel社製、No. 5582)とともに、マウス背部に10箇所程度皮下投与した。以後2週間おきに同量の免疫原を完全フロイントアジュバントとともに5回追加免疫した。マウス尾静脈より採血し、その血清抗体価を下記(3)のELISA測定法で調べた。

[0063] (3) 抗体価のELISA測定法

96ウェルの免疫プレート(NUNC社製)に上記(1)で合成した抗原ペプチド5 μ g/mlをそれぞれ100 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置して抗原をプレートにコートした。次いで、液除去後、洗浄液(0.2% Tween20を含むPBS溶液)にて2回洗浄した後、洗浄液で各ウェルを満たし、室温で2時間インキュベートした。溶液を除去後、希釈液(0.05% Tween20を含むPBS溶液)にて希釈した抗血清(1000倍より2段階希釈)を各ウェルに100 μ l加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)結合ヤギ抗マウスIgG(Biosource社製)を各ウェルに100 μ l加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で3回洗浄した後、基質液(オルトフェニレンジアミン10mgをクエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.0)25mlに溶解した溶液に、過酸化水素5 μ lを加えた溶液)を各ウェルに100 μ l加え、20分間発色させ、1M H_2SO_4 を100 μ l加えて発色を停止させ、Immuno Reader(BioRad社製)で492nmの吸光度を測定した。

[0064] (4) モノクローナル抗体の精製

十分な抗体価を示したマウスから最終免疫4日後に脾臓を摘出し、RPMI-1640培地(Invitrogen社製)に懸濁して脾臓細胞懸濁液を得た。細胞融合に用いるミエ

ローマ細胞としては、BALB/cマウス由来ミエローマ細胞P3-X63-Ag8-U1 (3 PU1)を用いた。12. 5mMHEPESを含む無血清RPMI-1640培地 (Invitrogen 社製) で、脾臓細胞およびミエローマ細胞を数回洗浄し、脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞比が10:1になるよう両細胞を混合した後、室温で遠心して培地を除去した。沈殿した細胞をよくほぐし、そこに37℃に加温したポリエチレングリコール (PEG、シグマ社製) を1ml加え、細胞とPEGをよく混和させ、37℃で5分程度静置して融合を行った後、37℃に加温した10%胎児牛血清 (FCS) を含むTILメディア (IBL社製) 15mlを約5分間かけて滴下し、さらに10%FCSを含むTILメディア20mlを加えて室温で遠心し、上清を吸引除去した。次いで、37℃に加温した10%FCSを含むTILメディアを加え、静かにピペットで混和後、96ウェルのマイクロプレートに脾臓細胞が 2×10^5 個/ウェルとなるように100 μ lずつ分注した。1日後、10%FCSを含むHAT培地 (コスモバイオ社製) を加えて、37℃、5%炭酸ガス下で培養した。1日後、2日後、さらに2～3日後ごとに培地の半量を吸引除去し、10%FCSを含むHAT培地を添加した。10日～2週間後に培地の半量を吸引除去し、10%FCSを含むHT培地 (ギブコ社製) に交換し、適当な時期に、以下 (5) のELISA測定法により、抗体産生ハイブリドーマを検索した。

[0065] (5) ハイブリドーマ培養上清のELISA測定法

96ウェルの免疫プレート (NUNC社製) に前記 (1) で合成した抗原ペプチド1 μ g/mlをそれぞれ50 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置して抗原ペプチドをプレートにコートした。次いで、溶液除去後、洗浄液 (0. 2% Tween20を含むPBS溶液) にて2回洗浄した後、1%BSAを含むPBS溶液を各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートした。液除去後、培養上清を各ウェルに50 μ l加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で3回洗浄した後、希釈液 (0. 05% Tween20を含むPBS溶液) にてHRPO結合ヤギ抗マウスIgG (Biosource社製) を10, 000倍希釈したものを各ウェルに50 μ l加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で3回洗浄した後、基質液 (オルトフェニレンジアミン10mgをクエン酸-リン酸緩衝液 (pH5. 0) 25mlに溶解した溶液に、過酸化水素5 μ lを加えた溶液) を各ウェルに50 μ l加え、20分間発色させ、

1M H_2SO_4 を100 μl 加えて発色を停止させ、Immuno Reader (BioRad社製) で492nmの吸光度を測定した。

[0066] (6) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

上記のようにして得られたハイブリドーマのうち、以下3点の条件を満たすハイブリドーマをスクリーニングした。

1. 免疫した抗原修飾ペプチドに対して、ポジティブである。
2. 抗原ペプチドのN末端に1残基付加したペプチドに対してポジティブである。
3. 抗原ペプチドと同じ配列であるが修飾(リン酸化またはアセチル化)されていないペプチドに対してネガティブである。

スクリーニングには、上記(5)のELISA測定法を用いた。特に、精度よくかつ効率よく抗体を作製するため、選択した20ウェルを培養後凍結保存するとともに、5+1ウェルのクローニングを開始し、1次スクリーニングあるいはクローニングの際に適当なものがない場合には、1段階戻ったストックから再度実施した。また、ELISA測定の精度を高めるため、同一プレート内で3種のペプチドに対するスクリーニングを実施した。

クローニングは、限界希釈法および上記(5)のELISA測定を数回繰り返すことにより行い、本発明のハイブリドーマを得た。得られたハイブリドーマは視覚的判断によりモノクローンであった。

[0067] このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株としては、ハイブリドーマP53No. 18 4B(受領番号FERM ABP-10561、2005年2月18日付国際寄託)、ハイブリドーマP53No. 17 16B(受領番号FERM AP-20478、2005年3月25日付寄託)、ハイブリドーマP53No. 23 1C(受領番号FERM AP-20479、2005年3月25日付寄託)、ハイブリドーマP53No. 5 16A(受領番号FERM ABP-10562、2005年3月25日付国際寄託)、ハイブリドーマP53No. 10 6A(受領番号FERM ABP-10563、2005年3月25日付国際寄託)、ハイブリドーマP53No. 2 20G(受領番号FERM AP-20480、2005年3月29日付寄託)等があり、これらは独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0068] 上記のハイブリドーマ株としては、ハイブリドーマP53No. 18 4B(受領番号FER

M ABP-10561)、ハイブリドーマP53No. 5 16A(受領番号FERM ABP-10562)、ハイブリドーマP53No. 10 6A(受領番号FERM ABP-10563)が好ましい。

- [0069] また、上記のようにクローニングされた他のハイブリドーマ株としては、P53No. 3 3Bc(受領番号FERM ABP-10576)、P53No. 4 13C(受領番号FERM ABP-10577)、P53No. 11 7C(受領番号FERM ABP-10578)、P53No. 12 1A(受領番号FERM ABP-10579)、P53No. 22 11B(受領番号FERM ABP-10580)またはP53No. 23 1A(受領番号FERM ABP-10581)等があり、これらは独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2006年3月27日付で国際寄託されている。
- [0070] クローニング後、得られたハイブリドーマを無血清培地に交換して、本発明のモノクローナル抗体を得た。
- [0071] 上記(5)のELISA測定法を用いて、得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の修飾抗原ペプチドおよび非修飾抗原ペプチドに対する反応性を確認した。その結果の一部を表4及び表5に示す(表中、「p53No. 17 16Ba」、「p53No. 18 4Ba」等は、各クローニング細胞から産生されるモノクローナル抗体を表し、各数値は492nmにおける吸光度を表す)。
- [0072] [表4:モノクローナル抗体の修飾抗原ペプチドおよび非修飾抗原ペプチドに対する反応性の結果を示す]

モノクローナル抗体	Ac-300-311(305Ac)-C	299-311(305Ac)-C	Ac-300-311-C
p53No. 17 16Aa	2.663	2.795	0.21
p53No. 17 16Ba	2.404	2.497	0.138
p53No. 17 16Da	2.569	2.791	0.157
p53No. 17 16Ea	2.315	2.508	0.125
モノクローナル抗体	Ac-315-325(320Ac)-C	314-325(320Ac)-C	Ac-315-325-C
p53No. 18 1Aa	2.175	1.818	0.059
p53No. 18 1Ba	2.294	1.981	0.059
p53No. 18 1Ca	2.151	1.847	0.073
p53No. 18 1Da	2.111	1.838	0.097
p53No. 18 4Aa	2.647	2.38	0.117
p53No. 18 4Ba	2.759	2.294	0.044
p53No. 18 4Ca	2.637	2.303	0.081
p53No. 18 4Da	2.655	2.262	0.092
p53No. 18 4Ea	2.609	2.208	0.113
p53No. 18 4Fa	2.312	2.209	0.126
モノクローナル抗体	Ac-377-387(382Ac)-C	376-387(382Ac)-C	Ac-377-387-C
p53No. 23 1Aa	3.298	2.963	0.279
p53No. 23 1Ba	2.093	2.149	0.061
p53No. 23 1Ca	2.04	2.288	0.079
p53No. 23 1Da	3.025	2.787	0.366
モノクローナル抗体	Ac-4-15(9P)-C	3-15(9P)-C	Ac-4-15-C
p53No.2 20Ca	0.95	0.866	0.09
p53No.2 20Ga	1.135	1.044	0.049
p53No.2 20Ea	1.179	1.08	0.055
モノクローナル抗体	Ac-15-26(20P)-C	14-26(20P)-C	Ac-15-26-C
p53No.5 2Aa	2.036	2.211	0.062
p53No.5 2Ba	2.054	2.177	0.057
p53No.5 2Ca	2.054	2.227	0.073
p53No.5 2Da	2.042	2.163	0.052
p53No.5 9Aa	2.753	2.65	0.167
p53No.5 9Ba	2.563	2.627	0.107
p53No.5 9Ca	2.738	2.672	0.095
p53No.5 13Aa	2.106	2.136	0.097
p53No.5 13Ba	2.17	2.205	0.087
p53No.5 13Ca	2.146	2.234	0.091
p53No.5 13Da	2.254	2.219	0.121
p53No.5 16Aa	2.245	2.286	0.053
p53No.5 16Ba	2.139	2.149	0.057
p53No.5 16Ca	2.657	2.693	0.053
p53No.5 19Aa	2.052	2.128	0.058
p53No.5 19Ba	2.011	2.164	0.058
p53No.5 19Ca	2.025	2.153	0.059
モノクローナル抗体	Ac-76-87(81P)-C	75-87(81P)-C	Ac-76-87-C
p53No.10 2Aa	3.076	2.772	0.042
p53No.10 2Ba	2.915	2.683	0.06
p53No.10 2Ca	2.573	2.379	0.042
p53No.10 2Da	2.728	2.114	0.053
p53No.10 2Ea	1.597	1.072	0.141
p53No.10 2Fa	2.445	2.226	0.04
p53No.10 3Aa	2.665	2.52	0.047
p53No.10 6Aa	3.5	3.487	0.075
p53No.10 6Ba	3.297	3.193	0.071
p53No.10 6Ca	3.26	3.214	0.88

表4が示すように、得られたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体は、修飾抗原ペプチドおよび修飾抗原ペプチドのN末端にアミノ酸を1残基付加したペプチドと特異的に反応し、非修飾抗原ペプチドとは反応しないことが確認された。

[0073] [表5:モノクローナル抗体の修飾抗原ペプチドおよび非修飾抗原ペプチドに対する反応性の結果を示す]

モノクローナル抗体	Ac-11-22(15P)-C	10-22(15P)-C	Ac-11-22-C
p53No.3 3Ba	1.134	1.755	0.190
p53No.3 3Bb	2.016	2.299	0.546
p53No.3 3Bc	2.228	2.206	0.900
モノクローナル抗体	Ac-13-24(18P)-C	12-24(18P)-C	Ac-13-24-C
p53No.4 13A	1.876	2.347	0.153
p53No.4 13B	1.479	1.988	0.116
p53No.4 13C	1.832	2.258	0.211
モノクローナル抗体	Ac-50-61(55P)-C	49-61(55P)-C	Ac-50-61-C
p53No.9 4A	1.264	1.019	0.385
モノクローナル抗体	Ac-310-321(315P)-C	309-321(315P)-C	Ac-310-321-C
p53No.12 1A	0.936	0.818	-0.003
p53No.12 1B	0.992	0.902	-0.012
p53No.12 1C	0.842	0.932	-0.003
p53No.12 1D	0.806	0.741	-0.002
p53No.12 2A	0.838	1.042	-0.016
p53No.12 2B	0.692	1.091	-0.009
p53No.12 2C	0.821	1.081	0.016
p53No.12 5B	2.239	1.783	0.471
p53No.12 5E	0.742	0.652	0.090
p53No.12 5G	1.559	1.444	0.240
モノクローナル抗体	Ac-85-96(90P)-C	84-96(90P)-C	Ac-85-96-C
p53No.11 7A	1.480	0.875	0.245
p53No.11 7B	1.799	1.131	0.292
p53No.11 7C	1.507	0.755	0.124
モノクローナル抗体	Ac-376-386(381Ac)-C	375-386(381Ac)-C	Ac-376-386-C
p53No.22 11A	0.452	0.333	0.078
p53No.22 11B	1.406	1.004	0.329
p53No.22 11C	0.516	0.313	0.104
p53No.22 11D	0.615	0.458	0.114

表5に示すように、得られたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体は、修飾抗原ペプチドおよび修飾抗原ペプチドのN末端にアミノ酸を1残基付加したペプチドと特異的に反応し、非修飾抗原ペプチドとは反応しないことが確認された。

[0074] [リン酸化認識抗体交叉(交差)反応性]

96ウェルの免疫プレート(NUNC社製)に表1の配列番号25~40(リン酸化修飾抗原ペプチド)の各ペプチドを1 μ g/mlをそれぞれ50 μ l/ウェルで分注し、室温で一晩放置して抗原ペプチドをプレートにコートした。次いで、溶液除去後、洗浄液(0.1% Tween20を含むTBS溶液)にて5回洗浄した後、4%BSAを含むTBS溶液を各ウェルに200 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液

を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、RPMI1640/10%FCS培養上清、及びCOSMEDIUM培養上清(グラフ中の(N)はCOSMEDIUM培養上清を示す。)を各ウェルに45 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、希釈液(4%BSA、0.1%Tween20を含むTBS溶液)にてHRP結合ヤギ抗マウスIgG (SantaCruz Biotechnology社製、製品No. SC-2031)を5000倍希釈したものを各ウェルに40 μ l加え室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、基質液(o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50set (Sigma社製:製品No.P9187)を各ウェルに100 μ l加え、20分間反応させた。10%H₂SO₄を50 μ l加えて発色を停止させ、(ImmunoMini NJ-2300) (Nalge Nunc International社製)で490nmの吸光度を測定した。Fig. 4~10は、モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す。縦軸は、490nmでの吸光度の数値である。

[0075] Fig. 4に示すように、p53No. 3 3Ba、p53No. 3 3Bb、p53No. 3 3Bcは、リン酸化修飾Ser15と特異的に反応することが確かめられた。また、COSMEDIUM培養上清と反応させたペプチドであっても、p53No. 3 3Ba(N)、p53No. 3 3Bb(N)は、リン酸化修飾Ser15と特異的に反応することが確かめられた。

[0076] Fig. 5に示すように、p53No. 4 13A、p53No. 4 13B、p53No. 4 13Cは、リン酸化修飾Thr18と特異的に反応することが確かめられた。また、COSMEDIUM培養上清と反応させたペプチドであっても、p53No. 4 13A(N)、p53No. 4 13C(N)は、リン酸化修飾Thr18と特異的に反応することが確かめられた。

[0077] Fig. 6に示すように、p53No. 5 2B等は、リン酸化修飾Ser20と特異的に反応することが確かめられた。

[0078] Fig. 7は、p53No. 5 2B(N)等のCOSMEDIUM培養上清と反応させたペプチドとの交叉反応性の結果を示す。Fig. 7に示すように、p53No. 5 2B(N)等は、リン酸化修飾Ser20と特異的に反応することが確かめられた。

[0079] Fig. 8に示すように、p53No. 10 6A、p53No. 10 6Cは、リン酸化修飾Thr81と特異的に反応することが確かめられた。また、COSMEDIUM培養上清と反応させたペプチドであっても、p53No. 10 6A(N)、p53No. 10 6B(N)は、リン酸化修

飾Thr81と特異的に反応することが確かめられた。

[0080] Fig. 9に示すように、p53No. 11 7A、p53No. 11 7Cは、リン酸化修飾Ser90と特異的に反応することが確かめられた。

[0081] Fig. 10に示すように、p53No. 12 1A等は、リン酸化修飾Ser315と特異的に反応することが確かめられた。

[0082] [アセチル化認識抗体交叉(交差)反応性]

96ウェルの免疫プレート(NUNC社製)に表1の配列番号41、42、43、90、45、46、47(アセチル化修飾抗原ペプチド)の各ペプチドを1 μ g/ml、コントロールとして牛血清アルブミン(Sigma 社製、製品No.A7906)をそれぞれ50 μ l/ウェルで分注し、室温で一晩放置して抗原ペプチドをプレートにコートした。次いで、溶液除去後、洗浄液(0.1%Tween20を含むTBS溶液)にて5回洗浄した後、4%BSAを含むTBS溶液を各ウェルに200 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、RPMI1640/10%FCS培養上清、及びCOSMEDIUM培養上清(グラフ中の(N)はCOSMEDIUM培養上清を示す。)を各ウェルに45 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、希釈液(4%BSA、0.1%Tween20を含むTBS溶液)にてHRP結合ヤギ抗マウスIgG(AmershamBiosciences社製、製品No. NA931V)を5000倍希釈したものを各ウェルに40 μ l加え室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、基質液(o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50set (Sigma社製:製品No.P9187)を各ウェルに100 μ l加え、20分間反応させた。10%H₂SO₄を50 μ l加えて発色を停止させ、(MicroplateReader Model 550) (BIO-RAD社製)で490nmの吸光度を測定した。Fig. 11は、モノクローナル抗体との交叉反応性の結果を示す。縦軸は、490nmでの吸光度の数値である。

[0083] Fig. 11に示すように、p53No. 18 4Bはアセチル化修飾Lys320と、p53No. 2 2 11Bはアセチル化修飾Lys381と、p53No. 23 1Dはアセチル化修飾Lys382と、各々特異的に反応することが確かめられた。また、また、COSMEDIUM培養上清と反応させたペプチドであっても、p53No. 23 1A(N)は、アセチル化修飾Lys3

82と特異的に反応することが確かめられた。

[0084] [アセチル化認識抗体交叉(交差)反応性におけるモノクローナル抗体の濃度依存性]

(p53No. 18 4B) 96ウェルの免疫プレート(NUNC社製)に表1の配列番号42、65の各ペプチドを1 μ g/ml、コントロールとして牛血清アルブミン(Sigma 社製、製品No.A7906)をそれぞれ50 μ l/ウェルで分注し、室温で一晩放置して抗原ペプチドをプレートにコートした。次いで、溶液除去後、洗浄液(0.1%Tween20を含むTBS溶液)にて5回洗浄した後、4%BSAを含むTBS溶液を各ウェルに200 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、RPMI1640/10%FCS培養上清を各ウェルに45 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、希釈液(4%BSA、0.1%Tween20を含むTBS溶液)にてHRP結合ヤギ抗マウスIgG(AmershamBiosciences社製、製品No. NA931V)を5000倍希釈したものを各ウェルに40 μ l加え室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、基質液(o-phenylenediaminedihydrochloride (Sigma FAST) 50set (Sigma社製:製品No.P9187)を各ウェルに100 μ l加え、20分間反応させた。10%H₂SO₄を50 μ l加えて発色を停止させ、(MicroplateReader Model 550) (BIO-RAD社製)で490nmの吸光度を測定した。その結果をFig. 12に示す。

[0085] Fig. 12に示すように、p53No. 18 4Bはアセチル化修飾Lys320を有する配列番号42のペプチドと特異的に反応する(非修飾のペプチド(配列番号65のペプチド)と比較して)ことが確かめられ、且つ、p53No. 18 4Bの濃度低下によっても特異的反応が維持されていることが確かめられた。また、抗体濃度が高い場合でも優位にアセチル化を認識していることが確かめられた。

[0086] (p53No. 23 1A)

96ウェルの免疫プレート(NUNC社製)に表1の配列番号47、70の各ペプチドを1 μ g/ml、コントロールとして牛血清アルブミン(Sigma 社製、製品No.A7906)をそれぞれ50 μ l/ウェルで分注し、室温で一晩放置して抗原ペプチドをプレートにコートした。次いで、溶液除去後、洗浄液(0.1%Tween20を含むTBS溶液)にて5回洗浄し

た後、4%BSAを含むTBS溶液を各ウェルに200 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、RPMI1640/10%FCS培養上清を各ウェルに45 μ lずつ加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、希釈液(4%BSA、0.1%Tween20を含むTBS溶液)にてHRP結合ヤギ抗マウスIgG (Amersham Biosciences社製、製品No.NA931V)を5000倍希釈したものを各ウェルに40 μ l加え室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、溶液を除去し、洗浄液で5回洗浄した後、基質液(o-phenylenediaminedihydrochloride (Sigma FAST) 50set (Sigma社製:製品No.P9187)を各ウェルに100 μ l加え、20分間反応させた。10%H₂SO₄を50 μ l加えて発色を停止させ、(Microplate Reader Model 550) (BIO-RAD社製)で490nmの吸光度を測定した。その結果をFig. 13に示す。

[0087] Fig. 13に示すように、p53No. 23 1Aはアセチル化修飾Lys382を有する配列番号47のペプチドと特異的に反応することが確かめられ、且つ、p53No. 23 1Aの濃度低下によっても特異的反応が維持されていることが確かめられた。また、抗体濃度が高い場合でも優位にアセチル化を認識していることが確かめられた。

[0088] [ウエスタンブロット]

本発明における382Ac-1A抗体(p53No. 23 1Aモノクローナル抗体)を用いたウエスタンブロットの結果をFig. 14に示す。実験方法は以下の通りである。EGFP-p53R273H in H1299 cell(ATCC社製、製品No. CRL5803)に25J/m²(ジュール/平方メートル)の紫外線(UV)を照射させた後、24時間後にp53を含む細胞抽出液を回収した。本細胞抽出液に対して、382Ac-1A抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、Fig. 14に示すように、UV依存的なp53の382位アセチル化を検出できた。コントロールとしてp53 DO-1IgG2a抗体を用いた。

[0089] <参考例1>

(1)抗体マイクロアレイ作製上の諸条件の検討

本発明の抗体マイクロアレイに適したコーティングスライドガラスの検討を行った。検討は、X基-アミノ修飾オリゴDNA固定用マイクロアレイ用コート(松浪硝子工業株式会社製)、Poly-L-Lysineコート(松浪硝子工業株式会社製)、高密度アミノ基導入コ

ート(松浪硝子工業株式会社製)、エポキシ基導入コート(松浪硝子工業株式会社製)、TYPE7スライド(アマシャム社製)、アルデヒド基導入コート(松浪硝子工業株式会社製)、TaKaRa-HubbleSlide Glass(タカラバイオ)、SMB SpotOn™ DNA Slides (Scandinavian Micro Biodevices A/S社製)、Slide A (SCHOTT社製)、Geneslide1(東洋鋼板株式会社製)、Geneslide2(東洋鋼板株式会社製)、Immobilizer™ MicroArray slides (EXIQON社製)、CMT-GAPS (Corning社製)、SuperchipC18 (Corning社製)、およびSuperchipC18-3D (Corning社製)コーティングスライドガラスについて行った。上記コーティングスライド上にp53 DO-1IgG2a抗体(以下、「DO-1抗体」という)を種々の濃度(50、100、500、1000 $\mu\text{g/ml}$)でスポットティングし、3時間のインキュベーション後、50mMエタノールアミン(pH9.0)でブロッキングを行った。検出は、Cy5標識IgG(42.5nM)で行った。反応条件は室温、1時間であった。Fig. 1 (Fig. 中、X:X基-アミノ修飾オリゴDNA固定用マイクロアレイ用コート、7-1:Poly-L-Lysineコート、7-3:エポキシ基導入コート、7-5:TaKaRa-HubbleSlide Glass、7-6:アルデヒド基導入コート、7-7:SMB SpotOn™ DNA Slides、7-9:geneslide1、7-10:geneslide2、7-14:Immobilizer™ MicroArray slidesを表す)に示すように、全てのスライドの中で、X基-アミノ修飾オリゴDNA固定用マイクロアレイ用コートが最も安定にシグナルを検出できた。

[0090] <参考例2>

(2) 抗体マイクロアレイの保存状態の検討

タンパク質は乾燥状態に放置しておくと失活する可能性がある。そこで、乾燥状態を避けるため、保存条件の検討を行った。検討は次の3つの保存条件について行った。

1) スポットティング・固定化反応後、PBS、40%グリセロール、0.1%NaN₃を含む溶液中で保存する。スライドをブロッキング後、スキャナーで検出する。

2) スポットティング・固定化反応後、ブロッキングを行い、PBS、40%グリセロール、0.1%NaN₃を含む溶液中で保存し、スキャナーで検出する。

3) スポットティング・固定化反応後、ブロッキングを行い、スキャナーで検出する。

Fig. 2に示すように、スポットティングを行った後、固定化反応を3時間行っただけでは

、スポッティング後に保存液に放置しておくことが確認された。しかし、上記2)の条件で保存すれば、スポットが流れることがなく、良好な状態でスライドを保存できることが示された。

[0091] <参考例3>

(3) スポッティング溶液の検討

コーティングスライドガラスに最も適したスポッティング溶液の検討を行った。DO-1抗体を種々のスポッティング溶液(A:PBS/40%グリセロール/0.1%NaN₃、B:PBS/50%DMSO/0.1%NaN₃、C:PBS/0.1%NaN₃、およびD:Sol. X/0.1%NaN₃)にてスポットし、固定化・ブロッキング後、Cy5標識IgGと反応させ、スキャナーで検出した。タンパク質の安定性、タンパク質を含むスポッティング溶液の揮発を防ぐためには、グリセロールやDMSOを添加すべきであるが、PBS/0.1%NaN₃が最適であった。

[0092] <参考例4>

(4) 抗体の固定化量の検討

50 μg/ml、100 μg/ml、500 μg/ml、1000 μg/mlのDO-1抗体、ならびに50 μg/ml、100 μg/ml、500 μg/mlのCy3標識DO-1抗体をコーティングスライドガラス(松浪硝子工業株式会社製、アミノ修飾オリゴDNA固定マイクロアレイ用コート)上にスポットし、シグナル強度および固定化量を測定した。Fig. 3に示すように、スポット量が増加するにつれて、固定化量は増加するが、シグナルを得るための固定化量は500 μg/mlの濃度で飽和していることから、スポット量は500 μg/mlが最適であることがわかる。

[0093] <参考例5>

(5) ブロッキング溶液の検討

スライドガラスコーティングに適したブロッキングの検討を行った。Cy3標識DO-1抗体を固定化した抗体マイクロアレイを以下のブロッキング溶液(エタノールアミン、グリシン)でブロッキングし、スキャナー(富士写真フイルム社製)で検出した。エタノールアミンでブロッキングを行った場合、グリシンでブロッキングを行った場合、ともに効率よくブロッキングが行われた。タンパク質同士の反応の阻害とならないことを考慮す

ると、エタノールアミンがブロッキング溶液として好ましい。

[0094] [配列表フリーテキスト]

配列番号2～17:合成ペプチド(リン酸化)

配列番号18～24:合成ペプチド(アセチル化)

配列番号25～40:合成ペプチド(リン酸化)

配列番号41～47:合成ペプチド(アセチル化)

配列番号48～70:合成ペプチド(非修飾)

配列番号71～86:合成ペプチド(リン酸化)

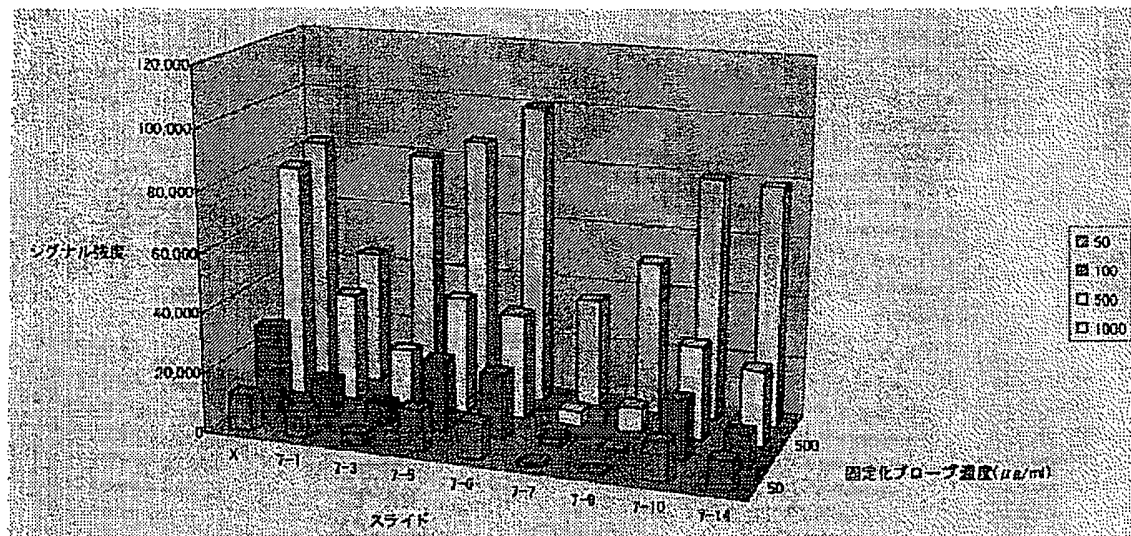
配列番号87～93:合成ペプチド(アセチル化)

請求の範囲

- [1] 以下(a)、(b)または(c)いずれかのペプチドと特異的に反応し、リン酸化またはアセチル化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体。
- (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第6番目、第9番目、第15番目、第18番目、第20番目、第33番目、第37番目、第46番目、第55番目、第81番目、第90番目、第315番目、第371番目、第376番目、第378番目または第392番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチド
- (b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第305番目、第320番目、第370番目、第372番目、第373番目、第381番目または第382番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がアセチル化されたペプチド、または
- (c) 上記(a)または(b)のペプチドに、1乃至数個の任意のアミノ酸が付加されたペプチド
- [2] 前記(a)のペプチドが、
- 配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16または配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、
- 前記(b)のペプチドが、
- 配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、または配列番号24で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである請求項1記載のモノクローナル抗体。
- [3] P53No. 18 4B(FERM ABP-10561)、
- P53No. 5 16A(FERM ABP-10562)または
- P53No. 10 6A(FERM ABP-10563)
- で標示されるハイブリドーマにより産生される請求項2に記載のモノクローナル抗体。
- [4] P53No. 3 3Bc(FERM ABP-10576)、

- P53No. 4 13C(FERM ABP-10577)、
P53No. 11 7C(FERM ABP-10578)、
P53No. 12 1A(FERM ABP-10579)、
P53No. 22 11B(FERM ABP-10580)または
P53No. 23 1A(FERM ABP-10581)
で標示されるハイブリドーマにより産生される請求項2に記載のモノクローナル抗体。
- [5] 請求項1～4いずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
- [6] P53No. 18 4B(FERM ABP-10561)、
P53No. 5 16A(FERM ABP-10562)または
P53No. 10 6A(FERM ABP-10563)
で標示される請求項5に記載のハイブリドーマ。
- [7] P53No. 3 3Bc(FERM ABP-10576)、
P53No. 4 13C(FERM ABP-10577)、
P53No. 11 7C(FERM ABP-10578)、
P53No. 12 1A(FERM ABP-10579)、
P53No. 22 11B(FERM ABP-10580)または
P53No. 23 1A(FERM ABP-10581)
で標示される請求項5に記載のハイブリドーマ。
- [8] 請求項1～4いずれかに記載のモノクローナル抗体を基板上に固定化したことを特徴とする抗体マイクロアレイ。
- [9] 請求項1～4いずれかに記載のモノクローナル抗体または請求項8に記載の抗体マイクロアレイを含むp53タンパク質の翻訳後修飾状態の測定キット。
- [10] 請求項1～4いずれかに記載のモノクローナル抗体または請求項8に記載の抗体マイクロアレイを用いることを特徴とするp53タンパク質の翻訳後修飾状態の測定方法。

[図1]



[図2]

保存の検討

固定化プローブ: Cy3-DO-1

固定化時間 : 3h

ブロッキング : 50mM, エタノールアミン, pH9.0

ラベル : 無し

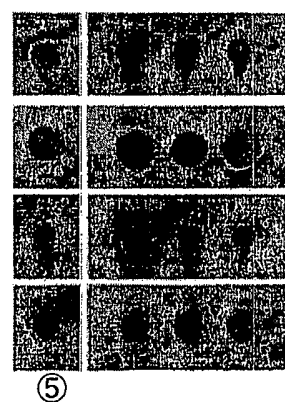
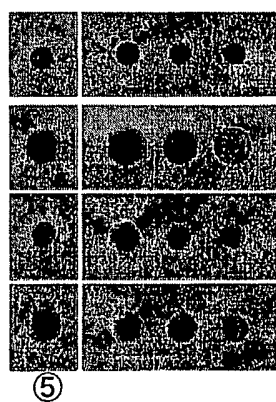
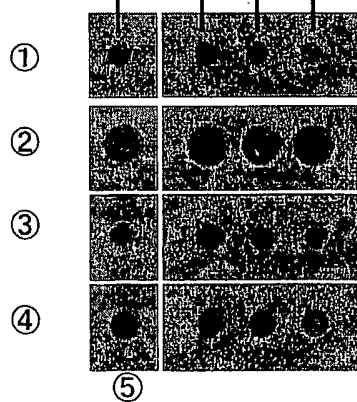
反応時間 : 無し

50mM, エタノールアミン
pH9.0

50mM, エタノールアミン
pH9.0⇒保存

保存⇒50mM, エタノール
アミン, pH9.0

100, 500, 100, 50 μg/ml



①: PBS/40%glycerol

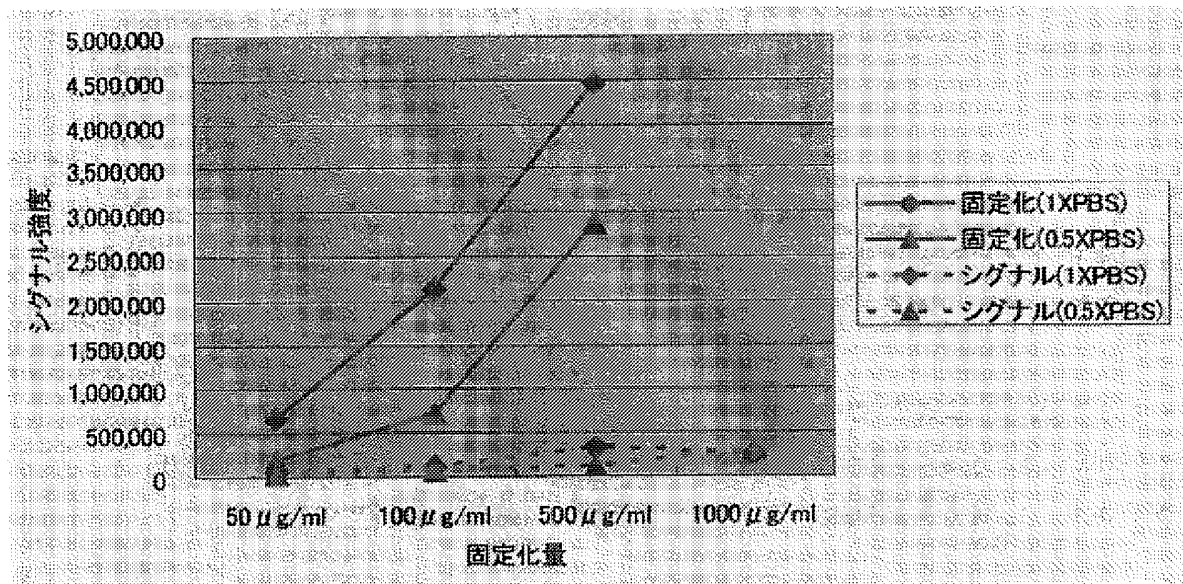
③: PBS

⑤: +NaN₃

②: PBS/50%DMSO

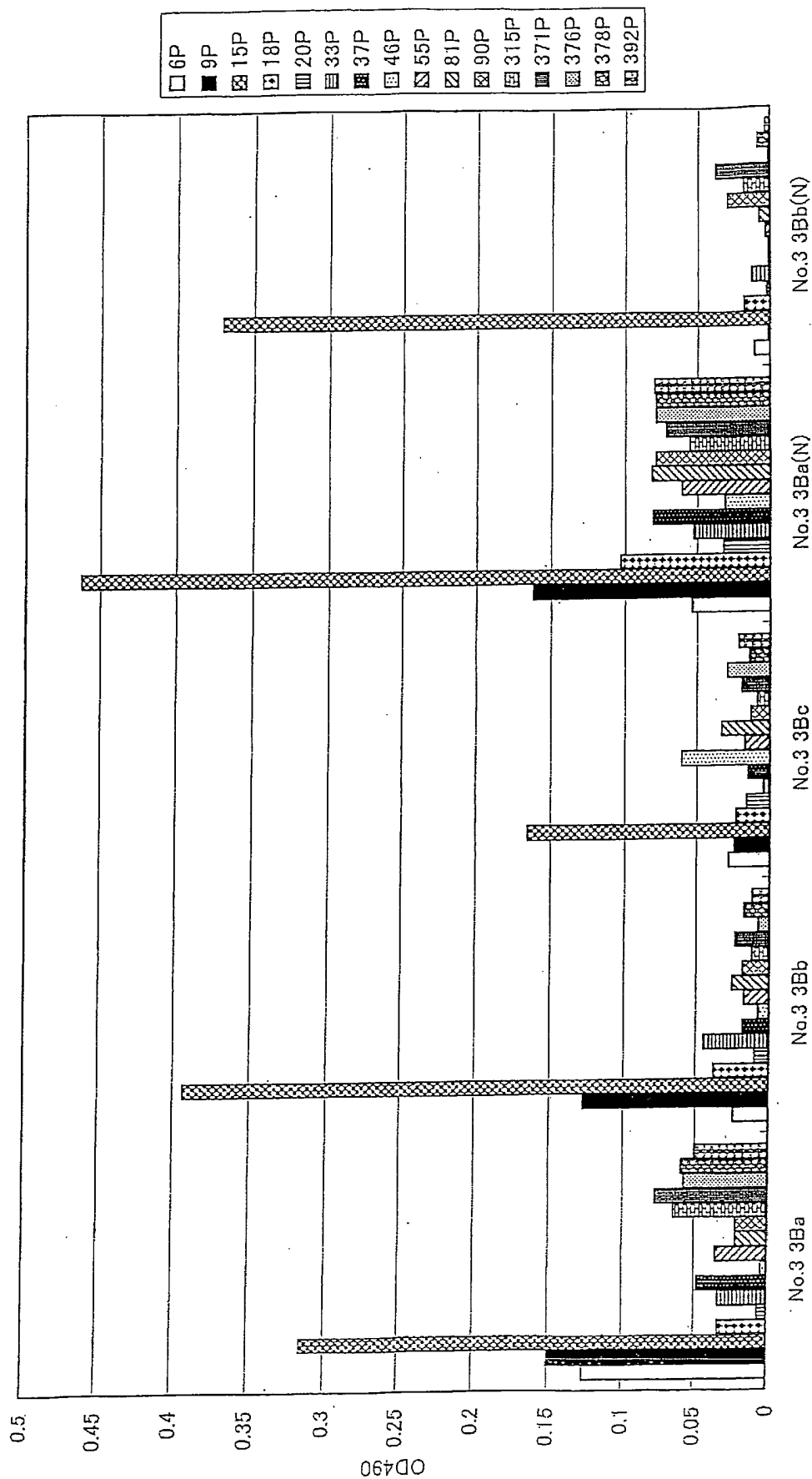
④: sol.X

[図3]



[図4]

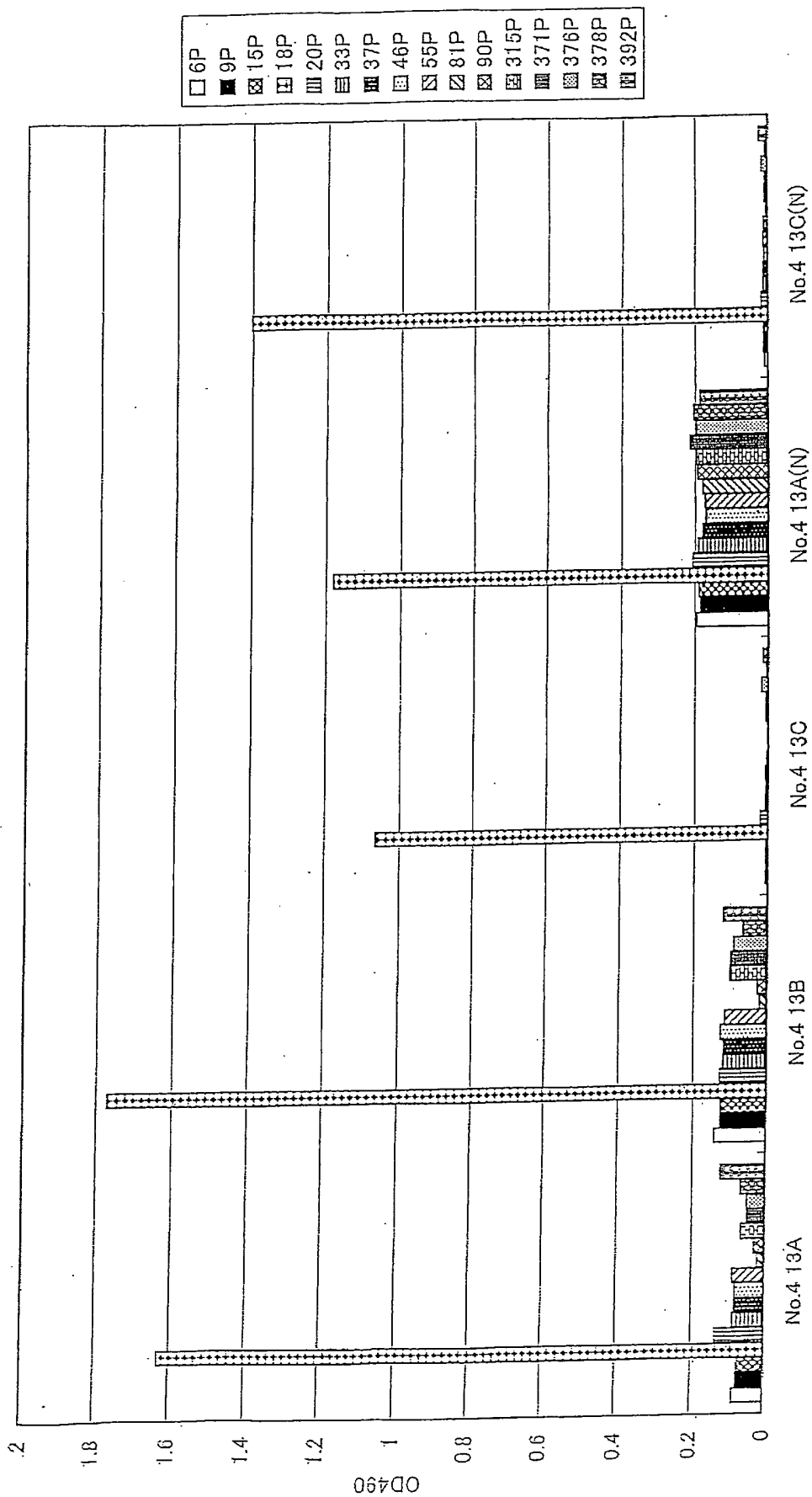
15P, 15P(N)



差替え用紙(規則26)

[図5]

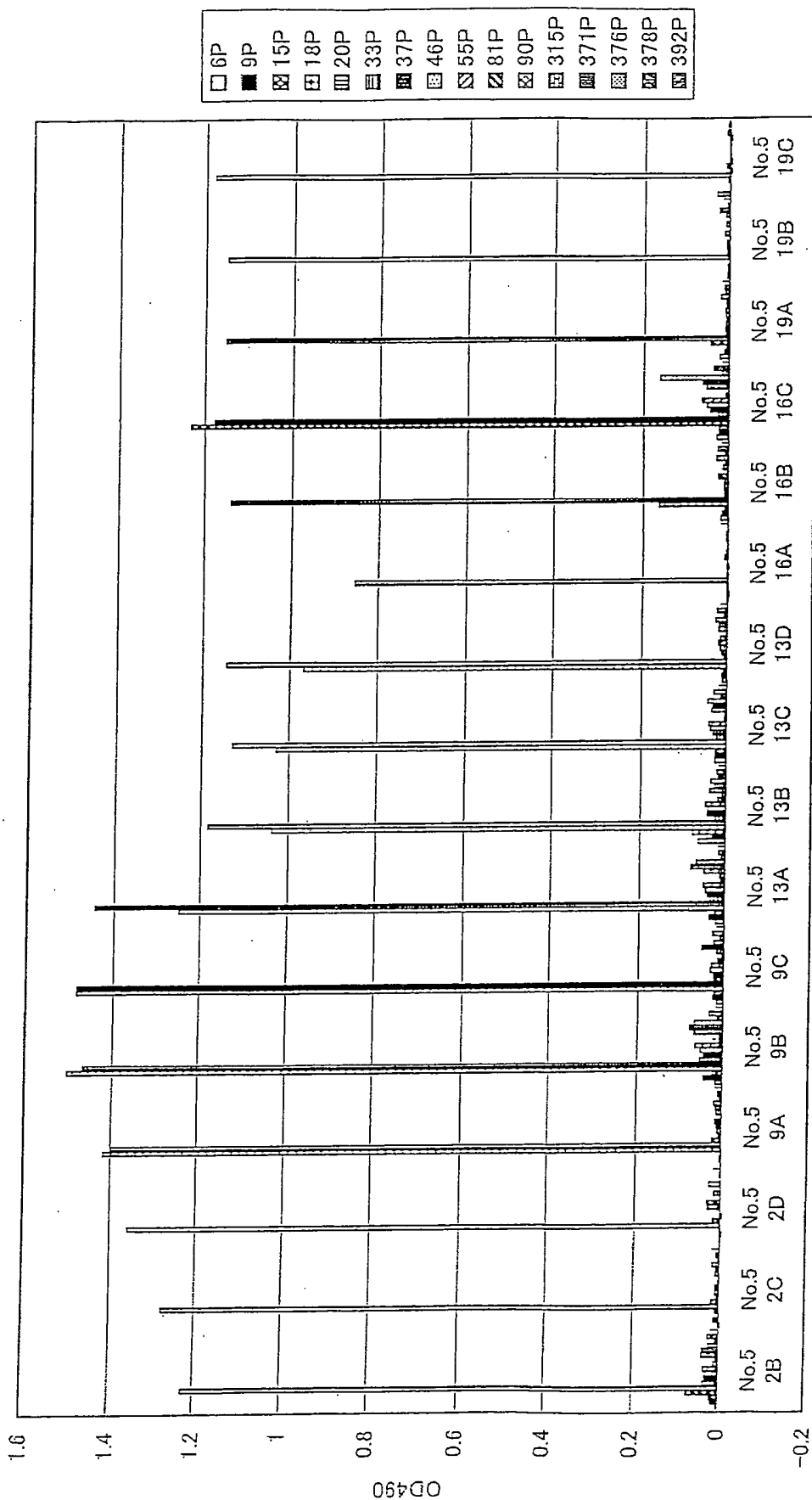
18P, 18P(N)



差替え用紙 (規則26)

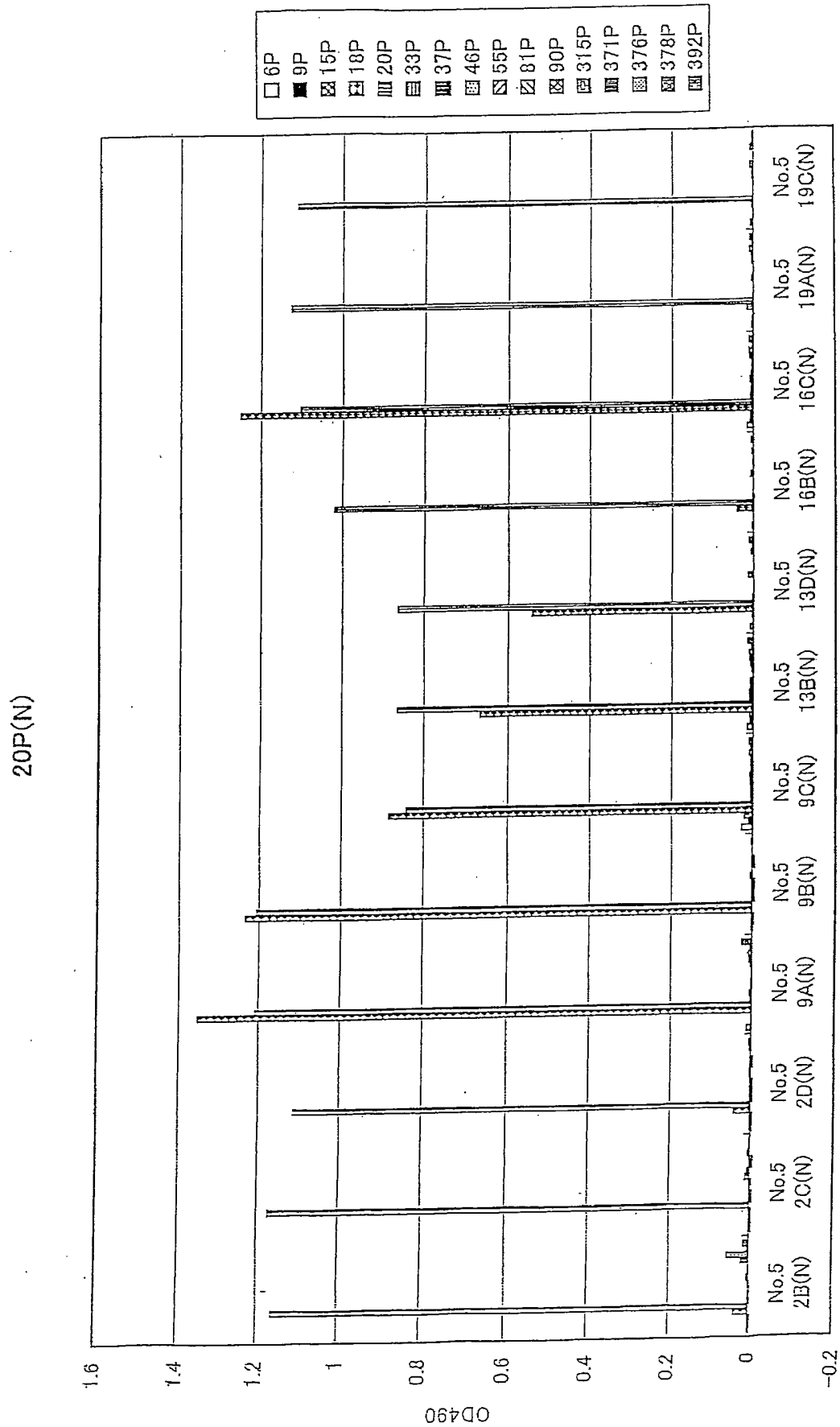
[図6]

20P



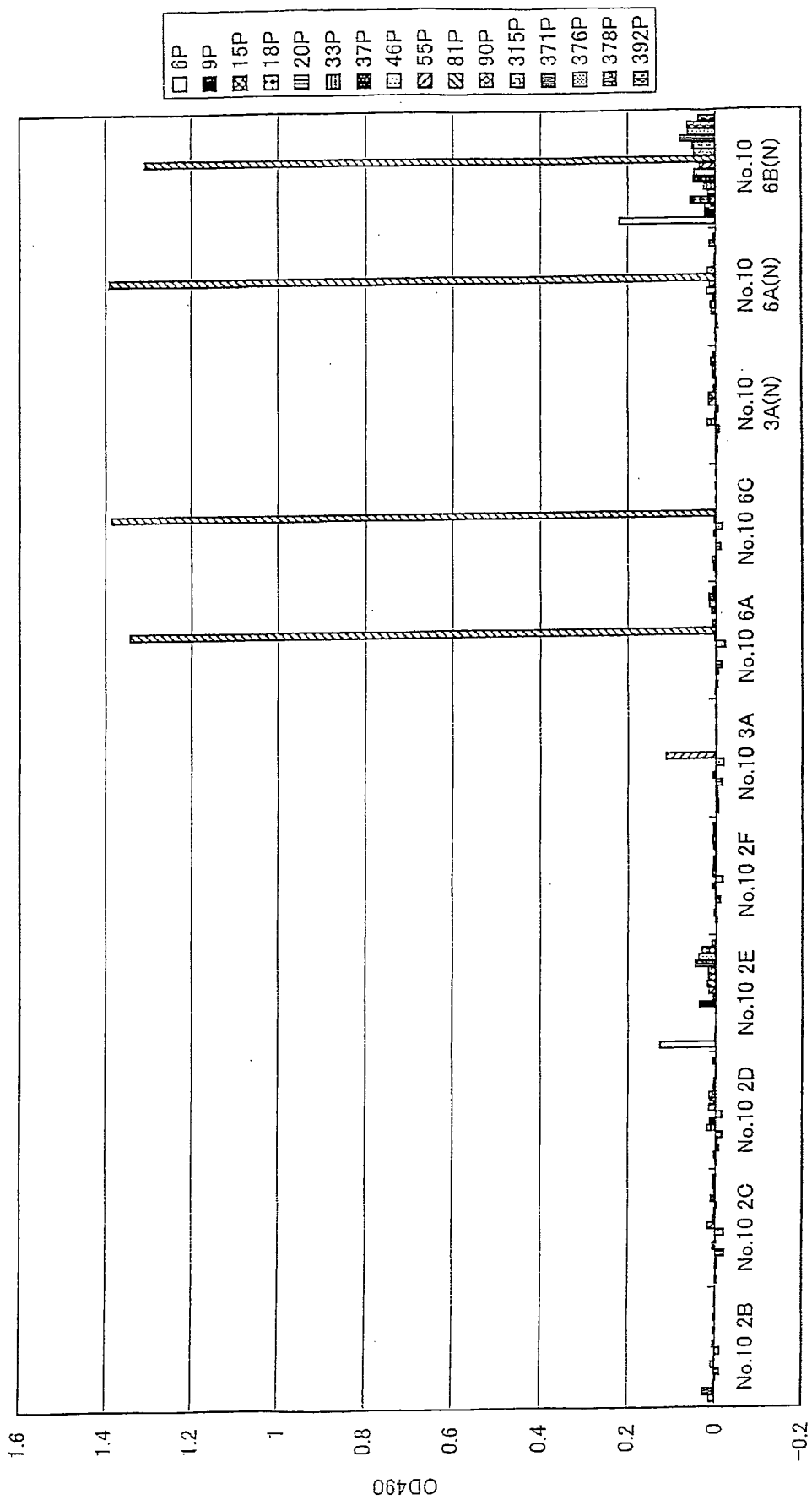
差替え用紙 (規則26)

[図7]



[図8]

81P, 81P(N)



差替え用紙 (規則26)

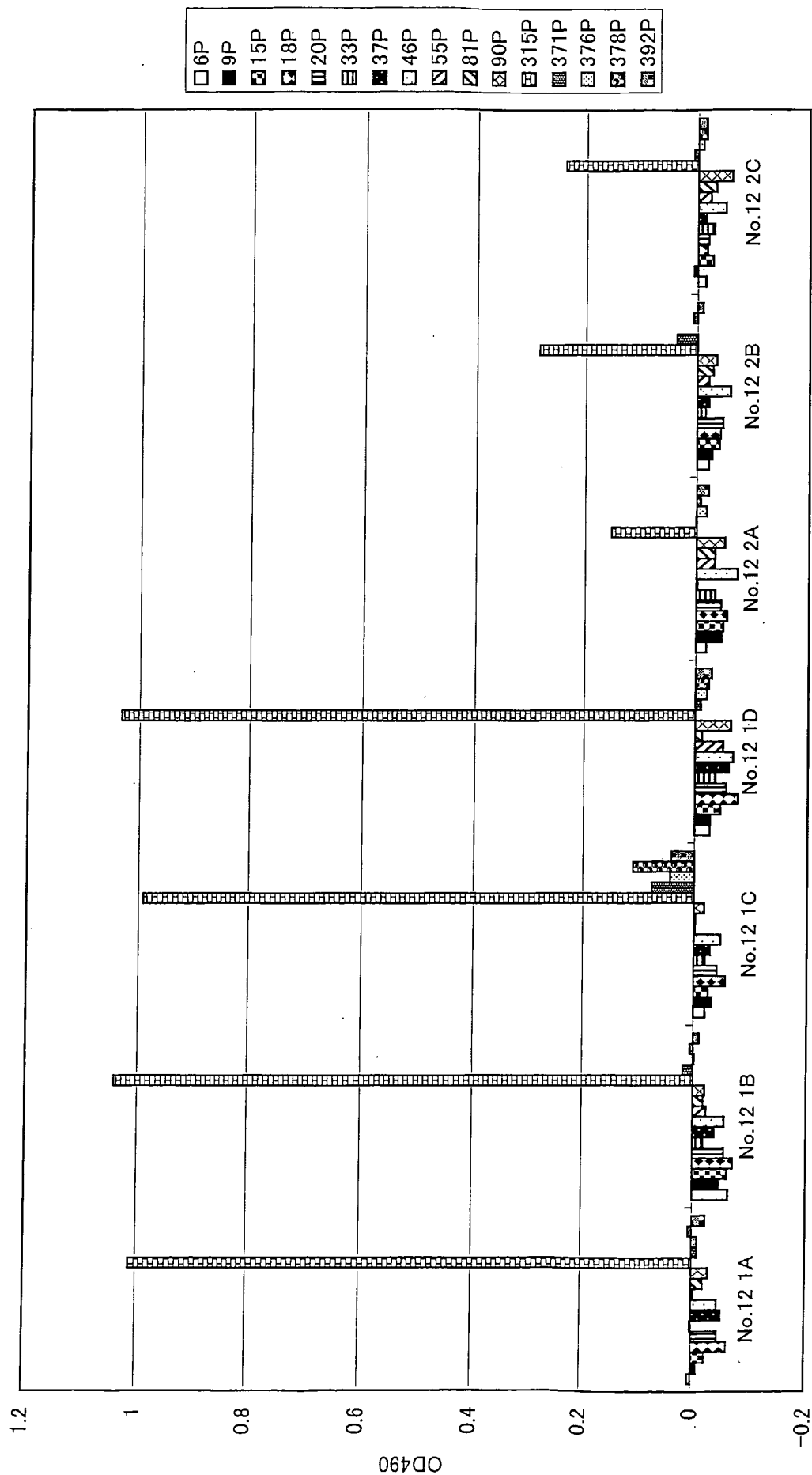
[図9]

90P



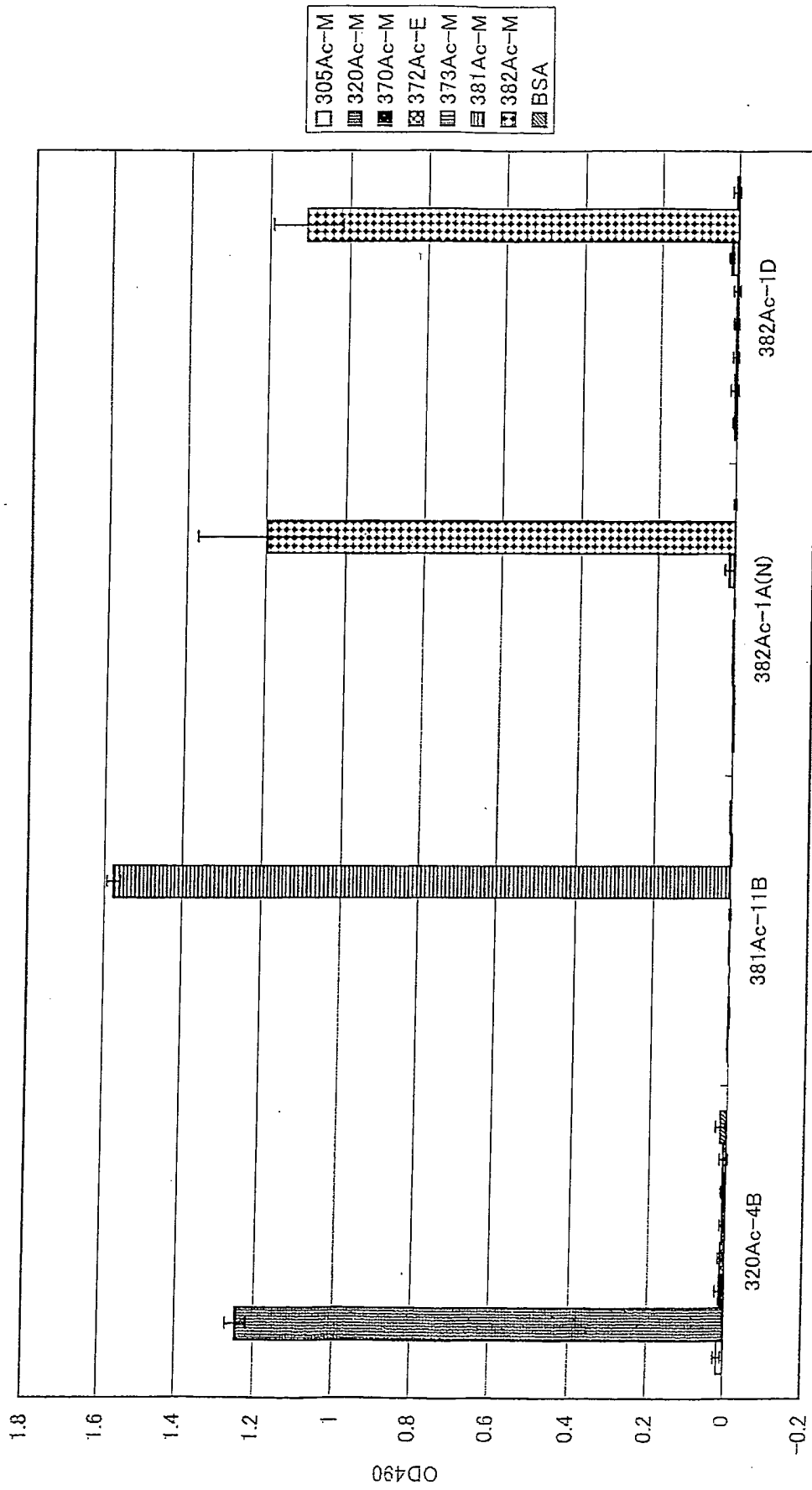
[図10]

315P

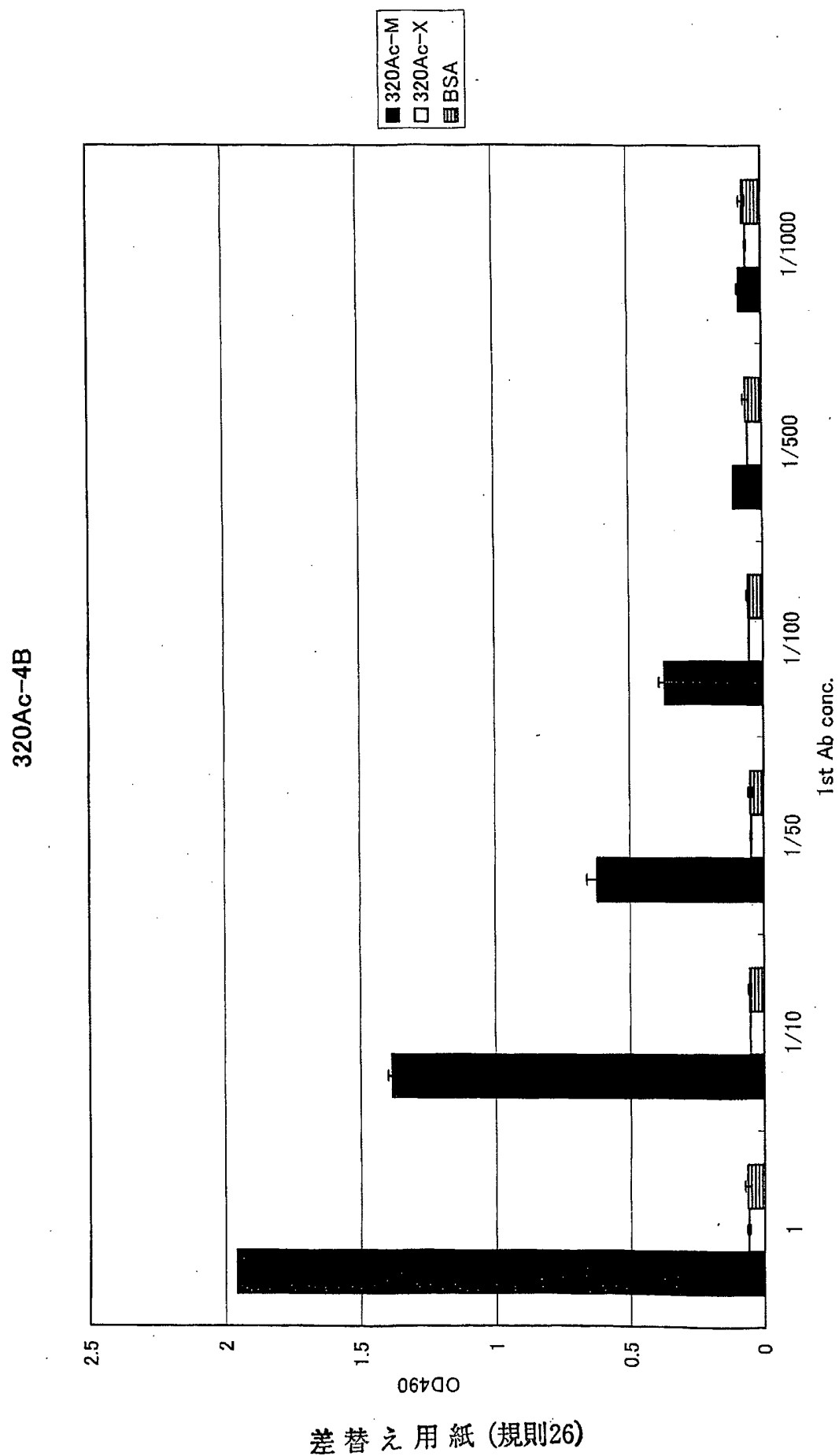


[図11]

p53 Ac部位認識抗体の交差性

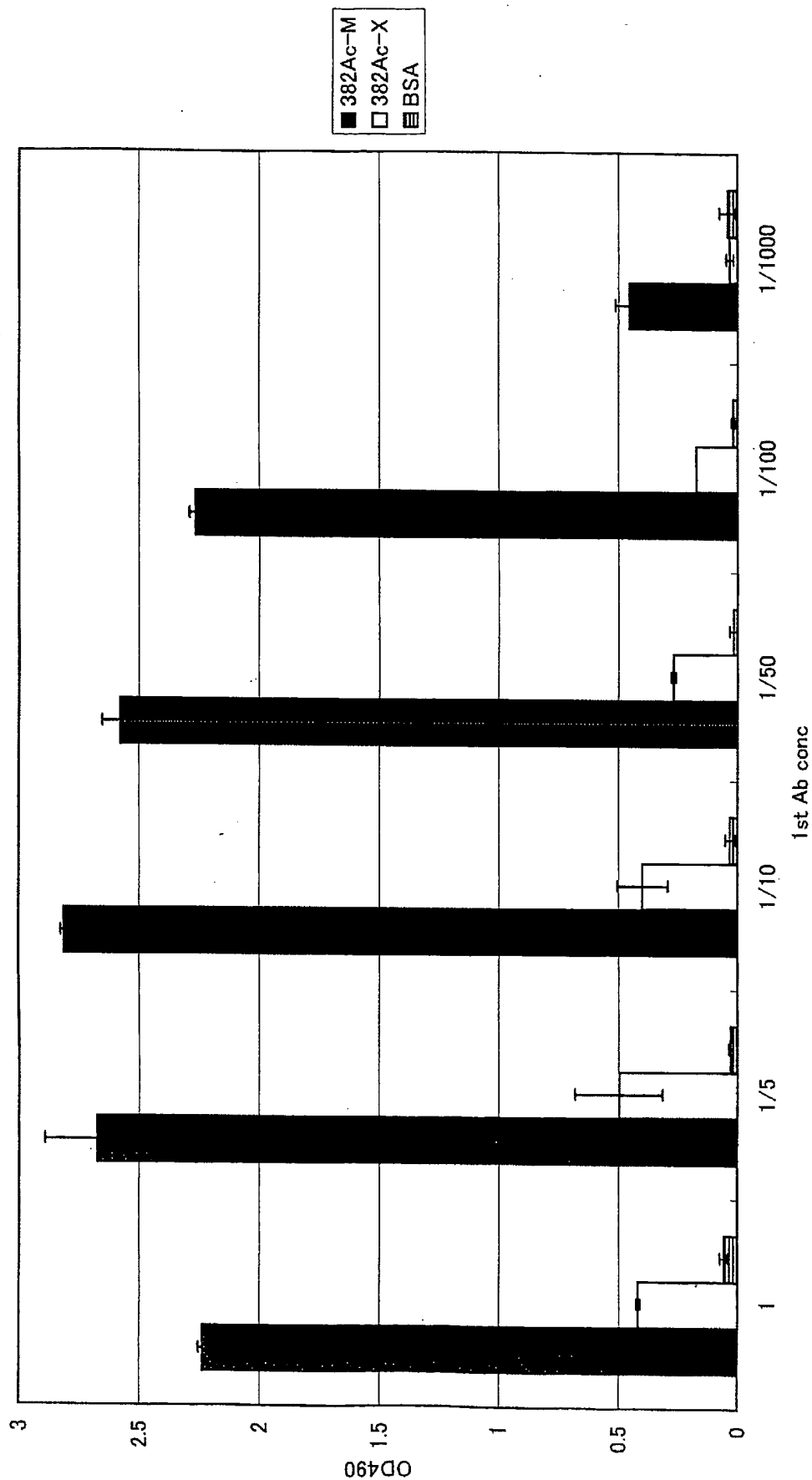


[図12]

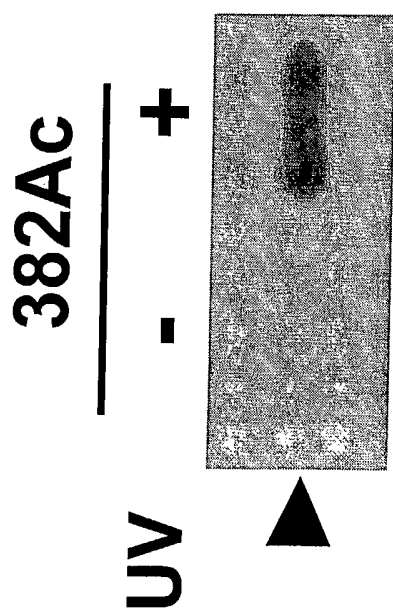
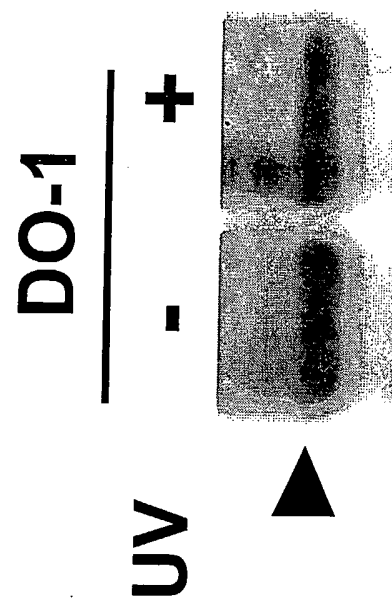


[図13]

382Ac-1A



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/02 (2006.01), **C07K16/18** (2006.01), **C12M1/00** (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01), **G01N33/577** (2006.01), **G01N37/00** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/02 (2006.01), **C07K16/18** (2006.01), **C12M1/00** (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01), **G01N33/577** (2006.01), **G01N37/00** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-325086 A (IGAKU SEIBUTSUGAKU KENKYUSHO KABUSHIKI KAISHA), 28 November, 2000 (28.11.00), & WO 2000/72011 A1 & EP 1184665 A1	1-10
X	WO 99/46574 A2 (WISTAR INST, US), 16 September, 1999 (16.09.99), & AU 9930670 A	1-10
X	OTVOS, L. et al., A monoclonal antibody to a multiphosphorylated, conformational epitope at the carboxy-terminus of p53, Biochim.Biophys. Acta., 1998, Vol.1404, pages 457 to 474	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2006 (06.06.06)

Date of mailing of the international search report
13 June, 2006 (13.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306921

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CRAIG, A.L. et al., Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers, Biochem.J., 1999, Vol.342, pages 133 to 141	1-10
X	SAKAGUCHI, K. et al., DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade, Genes Dev., 1998, Vol.12, pages 2831 to 2841	1-10
X	SAITO, S. et al., ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation, J.Biol.Chem., 2002, Vol.277, No.15, pages 12491 to 12494	1-10
X	Yoichi TAYA, "p53 no aphosphorylation to acetylation ni yoru Saibo Kino no Seigyo", Cell technology, 2003, Vol.22, No.1, pages 29 to 33	1-10
X	WANG, Y.H. et al., Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305, J.Biol.Chem., 2003, Vol.278, No.28, pages 25568 to 25576	1-10
X	WO 99/36532 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LAB CO., LTD., JP), 22 July, 1999 (22.07.99), & EP 1050581 A1 & JP 2000-540234 A & US 6884597 B1 & US 2006/035296 A1	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306921

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-10 have a common technical feature that they relates to a monoclonal antibody specifically recognizing p53 modified after translation. However, as described in "JP 2000-325086 A", "WO 99/46574 A2", "Biochem. J., 1999, vol. 342, pp. 133-141" and "Biochimica et Biophysica Acta, 1998, vol. 1404, pp. 457-474", a monoclonal antibody specifically recognizing phosphorylated p53 is publicly known, and as described in "Genes & Development, 1998, vol. 12, pp. 2831-2841", "J. Biol. Chem., 2002, vol. 277, No. 15, pp. 12491-12494", "J. Biol. Chem., 2003, vol. 278, No. 28, pp. 25568-25576" and "WO 99/36532 A1", an antibody against acetylated p53 is also publicly known. Therefore, the above-mentioned common technical (continued to the next sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306921

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

feature does not make a contribution over a prior art, thus it is not a special technical feature.

Accordingly, this application includes the following 18 inventions.

(1) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 6th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(2) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 9th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(3) In claims 1-2, 4-5, 7-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 15th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(4) In claims 1-2, 4-5, 7-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 18th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(5) In claims 1-3, 5, 6, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 20th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(6) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 33rd amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(7) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 37th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(8) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 46th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(9) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 55th amino acid residue of the amino (continued to the next sheet)

acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(10) In claims 1-3, 5, 6, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 81st amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(11) In claims 1-2, 4-5, 7-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 90th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(12) In claims 1-2, 4-5, 7-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 315th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(13) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 371st amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(14) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 376th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(15) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 378th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(16) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 378th amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(17) In claims 1-2, 5, 8-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 392nd amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is phosphorylated and does not react with the peptide which is not phosphorylated.

(18) In claims 1-10, part relating to a monoclonal antibody, which specifically reacts with a peptide comprising an amino acid sequence of at least six consecutive amino acids containing the 305th, 320th, 372nd, 373rd, 381st or 382nd amino acid residue of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid residue is acetylated and does not react with the peptide which is not acetylated.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/02(2006.01), C07K16/18(2006.01), C12M1/00(2006.01), C12N5/10(2006.01), G01N33/53(2006.01), G01N33/577(2006.01), G01N37/00(2006.01), C12P21/08(2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/02(2006.01), C07K16/18(2006.01), C12M1/00(2006.01), C12N5/10(2006.01), G01N33/53(2006.01), G01N33/577(2006.01), G01N37/00(2006.01), C12P21/08(2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-325086 A (IGAKU SEIBUTSUGAKU KENKYUSHO KK) 2000.11.28, & WO 2000/72011 A1 & EP 1184665 A1	1-10
X	WO 99/46574 A2 (WISTAR INST,US) 1999.09.16, & AU 9930670 A	1-10
X	OTVOS, L. et al., A monoclonal antibody to a multiphosphorylated, conformational epitope at the carboxy-terminus of p53, Biochim Biophys Acta, 1998, Vol,1404, p.457-474	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

2 9 3 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	CRAIG, A. L. et al., Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers, Biochem. J., 1999, Vol. 342, p. 133-141	1-10
X	SAKAGUCHI, K. et al., DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade, Genes Dev, 1998, Vol. 12, p. 2831-2841	1-10
X	SAITO, S. et al., ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation, J Biol Chem, 2002, Vol. 277, No. 15, p. 12491-12494	1-10
X	田矢洋一, p 5 3 のリン酸化とアセチル化による細胞機能の制御, 細胞工学, 2003, Vol. 22, No. 1, p. 29-33	1-10
X	WANG, Y. H. et al., Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305, J Biol Chem, 2003, Vol. 278, No. 28, p. 25568-25576	1-10
X	WO 99/36532 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LAB CO LTD, JP) 1999. 07. 22, & EP 1050581 A1 & JP 2000-540234 A & US 6884597 B1 & US 2006/035296 A1	1-10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲_____は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲_____は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1－10に係る発明は、翻訳後修飾されたp 53を特異的に認識するモノクローナル抗体に係るものであるという点で共通の技術的特徴を有している。しかしながら、「JP 2000-325086 A」、「WO 99/46574 A2」、「Biochem. J., 1999, Vol. 342, p. 133-141」、「Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1404, p. 457-474」に記載されるように、リン酸化されたp 53を特異的に認識するモノクローナル抗体は公知であるし、「Genes & Development, 1998, Vol. 12, p. 2831-2841」、「J Biol Chem, 2002, Vol. 277, No. 15, p. 12491-12494」、「J Biol Chem, 2003, Vol. 278, No. 28, p. 25568-25576」、「WO 99/36532 A1」に記載されるように、アセチル化されたp 53に対する抗体も公知であるから、上記共通の技術的特徴は、先行技術に対する貢献がもたらされるものではなく、特別な技術的特徴であるとは言えない。

したがって、本出願には、以下の18発明が包含されている。

（特別ページ）に続く

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

(1) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第6番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(2) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第9番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(3) 請求の範囲1-2、4-5、7-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第15番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(4) 請求の範囲1-2、4-5、7-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第18番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(5) 請求の範囲1-3、5、6、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第20番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(6) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第33番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(7) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第37番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(8) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第46番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(9) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第55番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(10) 請求の範囲1-3、5、6、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第81番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(11) 請求の範囲1-2、4-5、7-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第90番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(12) 請求の範囲1-2、4-5、7-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第315番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(13) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第371番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(14) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第376番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(15) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第378番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(16) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第378番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(17) 請求の範囲1-2、5、8-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第392番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がリン酸化されたペプチドと特異的に反応し、リン酸化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分

(18) 請求の範囲1-10のうち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第305番目、第320番目、第372番目、第373番目、第381番目または第382番目のアミノ酸残基を含む少なくとも6個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記アミノ酸残基がアセチル化されたペプチドと特異的に反応し、アセチル化されていない前記ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に係る部分