

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-510144

(P2004-510144A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 Q 1/70	
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2002-529553 (P2002-529553)	(71) 出願人	500471641 メディミュン, インコーポレイテッド アメリカ合衆国, 20878 メリーラ ンド, ゲイザーズバーグ, ウェスト ワト キンズ ミル ロード 35
(86) (22) 出願日	平成13年9月17日 (2001.9.17)	(74) 代理人	100066061 弁理士 丹羽 宏之
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月14日 (2003.3.14)	(72) 発明者	シェナーマン, マーク, エイ. アメリカ合衆国, 21136 メリーラン ド, ライスターズタウン, コーンフィール ド コート 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028877	(72) 発明者	ワン, ショーチアン アメリカ合衆国, 20878 メリーラン ド, ゲイザーズバーグ, サドル リバー ドライブ 14029
(87) 国際公開番号	W02002/024961		
(87) 国際公開日	平成14年3月28日 (2002.3.28)		
(31) 優先権主張番号	60/233, 439		
(32) 優先日	平成12年9月18日 (2000.9.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンの免疫原性を測定する試験管内検定

## (57) 【要約】

本発明は、ワクチンの免疫原性を測定するための検定法を提供し、ここでワクチンは、ワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座を持つエピトープと、ワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座を持つ断片を含有し、またここで方法は、ワクチンのサンプルを、ワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座にあるエピトープと結合できる第1リガンドと、ワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座にある断片と結合できる第2リガンドとに露出し、ワクチンサンプルと結合する第1リガンドの量とワクチンサンプルに結合する第2リガンドの量を測定することを含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ワクチンの免疫原性を測定する一つの検定であって、ここでワクチンが、ワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座を持つエピトープと、ワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座を持つ断片を含み、ここでの方法が、ワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座にあるエピトープと結合できる第 1 リガンド、およびワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座にある断片と結合できる第 2 リガンドに、ワクチンのサンプルを露出し、ワクチンサンプルと結合した第 1 リガンドの量とワクチンサンプルと結合した第 2 リガンドの量を測定することを含むことを特徴とする検定。

**【請求項 2】**

請求項 1 記載の検定であって、ここでワクチンの露出に先立ち、第 1 リガンドおよび第 2 リガンドがそれぞれ第 1 および第 2 検出可能物質で標識され、またここで、ワクチンの免疫原活性形態と結合する第 1 リガンドの量と、ワクチンの免疫原不活性形態と結合する第 2 リガンドの量が、第 1 および第 2 リガンドへの露出に際してワクチンサンプルと関連する第 1 および第 2 検出可能物質の量を測定することにより決定されることを特徴とする検定。

10

**【請求項 3】**

請求項 2 記載の検定であって、ここで第 1 および第 2 検出可能物質が、それぞれワクチンの免疫原活性形態およびワクチンの免疫原不活性形態と結合した時に、異なった波長の蛍光を放出し、またここでワクチンと結合する第 1 リガンドおよび第 2 リガンドの量の測定が、第 1 および第 2 検出可能物質により放出される蛍光を測定することで行われることを特徴とする検定。

20

**【請求項 4】**

請求項 3 記載の検定であって、ここでワクチンサンプルがワクチン物質とアジュバントを含むことを特徴とする検定。

**【請求項 5】**

請求項 4 記載の検定であって、ここでワクチンサンプルが、第 1 および第 2 リガンドへの露出に先立ち濾過平板に置かれることを特徴とする検定。

**【請求項 6】**

請求項 5 記載の検定であって、ここで濾過平板が 2 個またはそれ以上のウエルを含み、ここでワクチンサンプルが少なくとも 1 個のウエルに置かれ、またワクチン物質を欠いている対照アジュバントが、ワクチン物質を含まない少なくとも 1 個のウエルに置かれ、またここで第 1 および第 2 の標識リガンドが平板内のウエルに加えられることを特徴とする検定。

30

**【請求項 7】**

請求項 6 記載の検定であって、ここでワクチンサンプルを含むウエルが、蛍光物質による放出された光を測定する前に、ワクチン物質と結合しない過剰のリガンドをワクチンサンプルを含むウエルから除去するために、第 1 および第 2 リガンドの追加の際に洗浄されることを特徴とする検定。

**【請求項 8】**

請求項 1 記載の検定であって、ここでワクチンが乳頭腫ウイルスワクチンであることを特徴とする検定。

40

**【請求項 9】**

請求項 8 記載の検定であって、ここでワクチンがウイルス様粒子を含むことを特徴とする検定。

**【請求項 10】**

請求項 9 記載の検定であって、ここでウイルス様粒子が L 1 タンパク質を含むことを特徴とする検定。

**【請求項 11】**

請求項 9 記載の検定であって、ここでウイルス様粒子が、HPV - 16 を含むことを特徴

50

とする検定。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 記載の検定であって、ここでワクチンの活性形態と関連する立体配座を持つエピトープが、V 5 エピトープであることを特徴とする検定。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の検定であって、ここでワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座にあるエピトープと結合できるリガンドが、HPV 16 . V 5 モノクローナル抗体であることを特徴とする検定。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 記載の検定であって、ここで HPV 16 . V 5 が、蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。 10

【請求項 1 5】

請求項 1 1 記載の検定であって、ここでワクチンの不活性形態が、変性 L 1 タンパク質を含むことを特徴とする検定。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 記載の検定であって、ここで変性 L 1 タンパク質が、線状 L 1 タンパク質を含むことを特徴とする検定。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載の検定であって、ここでワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座にあるワクチンと結合できるリガンドが、18A1 モノクローナル抗体を含むことを特徴とする検定。 20

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の検定であって、ここで 18A1 が蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 記載の検定であって、ここで 18A1 が HPV 16 . V 5 と関係して使用され、ここで HPV 16 . V 5 が、18A1 に蛍光物質により放出される光の波長と異なる波長で光を放出する蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。

【請求項 2 0】

請求項 9 記載の検定であって、ここでウイルス様粒子が、HPV - 18 を含むことを特徴とする検定。 30

【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載の検定であって、ここでワクチンの活性形態と関連する立体配座を持つエピトープが、J 4 エピトープであることを特徴とする検定。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 記載の検定であって、ここでワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座にあるエピトープと結合できるリガンドが、HPV 18 . J 4 モノクローナル抗体であることを特徴とする検定。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載の検定であって、ここで HPV 18 . J 4 が、蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。 40

【請求項 2 4】

請求項 2 0 記載の検定であって、ここでワクチンの不活性形態が、変性 L 1 タンパク質を含むことを特徴とする検定。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 記載の記載の検定であって、ここで変性 L 1 タンパク質が線状 L 1 タンパク質を含むことを特徴とする検定。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の検定であって、ここでワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座にあるワクチンと結合できるリガンドが、18A1 モノクローナル抗体を含むことを特徴 50

とする検定。

【請求項 27】

請求項 26 記載の検定であって、ここで 18A1 が、蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。

【請求項 28】

請求項 27 記載の検定であって、ここで 18A1 が、HPV18・J4 と連係して使用され、ここで HPV18・J4 が、18A1 に蛍光物質により放出される光の波長と異なる波長で光を放出する蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【発明の背景】

この出願は、2000年9月18日に出願受理されたアメリカ合衆国暫定特許出願番号第 60/233,439号からの優先権を主張し、その全体は、ここで引用例として組み込まれている。

【0002】

本発明は、ワクチンの免疫原性の試験管内測定分野に関する。とりわけ本発明は、ウイルス様粒子に基づくワクチンの免疫原および非免疫原形態の結合性に基づくワクチン免疫原性の測定に関する。

【0003】

【関連技術の概要】

20

バルクおよびバイアル瓶保管ワクチン産物の安定性を決定する重要な因子の一つは、免疫原性の測定である。例えば、マウスの免疫化による HPV-16 ウイルス様粒子 (VLPs) の能力検査は、労働と時間の大きな努力を必要とする。典型的には、調合された VLP 物質を各種の用量水準でマウスに投与し免疫化した後に、動物が十分な免疫応答を備えることができたかどうかを決定できるまでには、約 6 週間が必要とされる。この問題がより難しくなるのは、利用されねばならない動物数の故で、各種のアジュバントと賦形剤を試験する時である。開発を能率的にする努力で、ウイルス様粒子 (VLP) ベースワクチンの免疫原性を評価できるようにする高速で信頼できる検定を見出すことは望ましいことであろう。

【0004】

30

【発明の概要と目的】

本発明の目的は、ワクチンの免疫原性を測定する検定を提供することであり、ここでワクチンは、ワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座を持つエピトープと、ワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座を持つ断片を含む。この方法は、ワクチンのサンプルを、ワクチンの免疫原活性形態と関連する立体配座にあるエピトープと結合できる第 1 リガンド、およびワクチンの免疫原不活性形態と関連する立体配座にある断片と結合できる第 2 リガンドに露出し、次いでワクチンサンプルに結合する第 1 リガンドの量と、ワクチンサンプルに結合する第 2 リガンドの量を測定することを含む。望ましくは、第 1 および第 2 リガンドは、ワクチンの露出に先立ち、それぞれ第 1 および第 2 検出可能物質で各標識され、ここでワクチンの免疫原活性形態と結合する第 1 リガンドの量と、ワクチンの免疫原不活性形態と結合する第 2 リガンドの量は、第 1 および第 2 リガンドの露出に際し、ワクチンサンプルと、関連する第 1 および第 2 検出可能物質の量を測定することにより決定される。もっとも望ましくは、それぞれワクチンの免疫原活性形態およびワクチンの免疫原不活性形態と結合する時に、第 1 および第 2 検出可能物質は、異なる波長の蛍光を放出し、またここでワクチンに結合する第 1 および第 2 リガンドの量の測定は、第 1 および第 2 検出可能物質により放出される蛍光を測定することにより行われる。典型的には、ワクチンサンプルはワクチン物質とアジュバントを含む。

40

【0005】

望ましい実施例において、ワクチンサンプルは、第 1 および第 2 リガンドへの露出に先立ち、濾過平板内に置かれる。濾過平板は、2 個またはそれ以上のウェルを含み、ここでワ

50

ワクチンサンプルは、少なくとも1個のウェルに置かれ、ワクチン物質を欠いている対照アジュバントは、ワクチン物質を含まない少なくとも一つのウェルに置かれ、またここで第1および第2リガンドが、プレート内のウェルに加えられる。ワクチンサンプルを含むウェルは、蛍光物質により放出される光の測定に先立ち、ワクチン物質に結合しない過剰のリガンドをワクチンサンプルを含むウェルから除去するために、第1および第2リガンドの追加の際に洗浄される。

【0006】

本発明は、乳頭腫ウイルスワクチン、とりわけL1タンパク質、より詳細にはHPV-16およびHPV-18を含むウイルス様粒子に基づく乳頭腫ウイルスワクチンに向けられた免疫原検定の実施にとりわけ適している。

10

【0007】

【望ましい実施例の詳細な説明】

本発明は、立体配座および線状エピトープMab(モノクローナル抗体)結合の組合せが、ワクチンサンプルの変性の相対状態を決定するのに役立つという発見に基礎を置く。本発明は、更に立体配座エピトープの免疫原性結合と中和との相関の発見に基礎を置くものである。これらの発見に基づき、本発明の発展と連係して得られた相関データは、ワクチン開発と品質管理について従来の方法と関連する免疫原性の動物検査の必要性を排除し、またはそれを大幅に少なくするワクチンの免疫原性への代替的ルートを可能にするであろうということが考えられる。

【0008】

本出願の発明概念は、ワクチン活性またはワクチン不活性に直接相関する各種の立体配座状態で、エピトープまたはワクチン物質の他の断片と特異的に結合するモノクローナル抗体を用いる実施にとりわけ適している。

20

【0009】

本発明は、活性または不活性状態と特異的に関連し、また追跡可能物質と結合できる立体配座を持つ1個またはそれ以上の断片を持ついずれかのワクチンの試験と開発を実行できる一方、本発明はウイルス様粒子ベース乳頭腫ウイルスワクチン、とりわけHPV-16とHPV-18を調べることにより、以下に詳細に記載されるであろう。しかしこれらのワクチンを通じて説明される概念は、前記の仕様にに基づく各種の他のワクチンに容易に一般化することができる。

30

【0010】

下記の資料は、ここでその全体を引用することでここに取り込まれている。

【0011】

ホワイト, W. I., ウイルソン, S. D., パーマー-ヒル, F. J., ウッズ, R. M., ギム, S. J., ヒューイット, L. A., ゴールドマン, D. M., パーク, S. J., ジェンセン, A. B., ケーニッグ, S., およびスージック, J. A. 「ヒト乳頭腫ウイルスタイプ16 L1抗体の中和は主として単一抗原ドメインを標的とする」ウイルス学ジャーナル, 1999年6月, 印刷中。

【0012】

ローデン, R. B. S., アームストロング, A., ヘーデラー, P., クリステンセン, N. D., ハバート, N. L., ローウィ, D. R., シラー, J. T., およびカーンバウアー, R. 「ヒト乳頭腫ウイルスタイプ16変異体依存型中和エピトープの特徴付け」ウイルス学ジャーナル, 71巻: 6247-52ページ, 1997年。

40

【0013】

ホワイト, W. I., ウイルソン, S. D., パーマー-ヒル, F. J., ウッズ, R. M., ギム, S. J., ヒューイット, L. A., ゴールドマン, D. M., パーク, S. J., ジェンセン, A. B., ケーニッグ, S., およびスージック, J. A. 「ヒト乳頭腫ウイルスタイプ16 L1抗体の中和は主として単一抗原ドメインを標的とする」ウイルス学ジャーナル, 1999年6月, 印刷中。

【0014】

50

実施例 A : H P V - 1 6 ベースワクチンの免疫原性を測定する B 免疫検定

この実施例は、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムアジュバント上で H P V - 1 6 V L P 物質をプローブするために、2 個の蛍光標識モノクローナル抗体の結合を測定する抗原性検定に関する。V 5 モノクローナル抗体は、免疫原性 ( 3 ) に必要とされることが示された H P V - 1 6 ( V L P ) 表面での V 5 構造的エピトープに指向され、一方 1 8 A 1 モノクローナル抗体は、分解または変性 H P V - 1 6 V L P s に主として存在する線状エピトープを認識する。この S O P は、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム粒子に吸着された H P V - 1 6 切形 V L P 物質の免疫原性総合評価に用いられる。

**【 0 0 1 5 】**

免疫原性のための V L P 表面での V 5 構造的エピトープの絶対必要性を提示したホワイト他により実行された実験からの情報を利用して、我々はマウスの生体内免疫原性と相関する検定を構築することができた。各種の発現システムで主要 H P V - 1 6 キャプシドタンパク質 ( L 1 ) を過発現することにより、正しい生化学条件の下で、これらのサブユニットがウイルス様粒子 ( V L P s ) に集合することができ、しばしば構造的にも免疫学的にも天然ウイルスに擬態することが示された。多数のモノクローナル抗体はローデン他により同定され、これらの抗体の内 2 個 ( H P V 1 6 . E 7 0 および H P V 1 6 . V 5 ) は真正 H P V - 1 6 ウイルスに対し、ウイルス中和活性を有している。ホワイト他により報告されたように、野生型 L 1 配列からの 3 個のアミノ酸の突然変異、それぞれ 5 0 , 2 6 6 および 3 8 0 の位置でのフェニルアラニンからタイシン、アラニンからトレオニン、リシンからアスパラギンの各変異は、E 7 0 または V 5 モノクローナル抗体のいずれかで認識できなかった V L P s で生じた。またこれらの突然変異より成る V L P s で免疫化されたマウスは、免疫原性に乏しいことが発見され、また中和抗体の有意な力価を生じなかった。フェニルアラニンの野生型残基に戻るロイシンからの位置 5 0 での単一 V 5 エピトープアミノ酸の突然変異は、V 5 抗体の V L P への結合の回復だけでなく、野生型生体内 L 1 配列への類似の抗体応答を誘出する V L P の能力で生じた。

**【 0 0 1 6 】**

この検定は、アルミニウム粒子にまたは調合されていないバルク V L P s のいずれかに調合 ( 吸着 ) された H P V - 1 6 V L P s で免疫原エピトープと結合する蛍光標識 V 5 抗体を利用する。各タイプの調製に対応するために、2 個の検定形態が存在する。V L P s がリン酸アルミニウム粒子で調合された場合には、V 5 濾過平板形態検定は、選択の問題であった。この形態は 9 6 ウェル濾過平板を使用し、これに少量の調合または対照アジュバント物質 ( V L P s なし ) が加えられる。濾過平板はマニホールド上に配設され、洗浄および分離ステップを達成するために、ウェル底部にリン酸アルミニウム粒子を蒸着するように、適度の真空が適用される。粒子を 1 時間胎仔ウシ血清アルブミン ( B S A ) で遮断した後に、粒子は洗浄され、蛍光標識 V 5 または 1 8 A 1 モノクローナル抗体が加えられた ( 1 8 A 1 抗体は、優先的に H P V - 1 6 V L P の非構造的エピトープを認識する ) 。平板は次いでシールされ、シェーカーに 2 時間 3 7 で配置される。振動ステップが、懸濁状態でアルミニウム粒子を保持するために含まれ、これにより保温保持の時間を最小にする。短い洗浄ステップの後、物質の最終ペレットが多チャンネルピペットを使用して食塩加リン酸緩衝液 ( P B S ) で再懸濁され、平板は 4 8 5 n m の励起と 5 3 0 n m の放出で蛍光マイクロプレートリーダーで読みとられた。生成された V 5 および 1 8 A 1 信号はバックグラウンド修正され、データは修正信号として、または対照条件信号のパーセントとして表現された。濾過平板検定の導入に先立ち、各相を洗浄し分離するために、微小遠心分離を用いる遠心管ベース検定が行われた。これは濾過平板ヴァージョンで置換され、そのためより大きなサンプル処理量が可能となった。

**【 0 0 1 7 】**

V 5 濾過平板検定 ( D V - 6 3 6 3 , 0 0 1 版 ) は、リン酸アルミニウム調合 H P V - 1 6 V L P s での V 5 構造エピトープの存在を決定するために、エピトープ特異的モノクローナル抗体 ( V 5 ) を使用する。更に物質は、線状エピトープ認識モノクローナル抗体 ( 1 8 A 1 ) でプローブされ、これは調合 V L P の構造状態についての更なる情報を提供

する。この検定は96ウエル濾過平板を使用し、これに調合または対照アジュバント物質（VLPsなし）50 $\mu$ lが加えられる。濾過平板はマニホールドに配設され、ウエル底部にリン酸アルミニウム粒子を蒸着するように、適度の真空が適用される。粒子を1時間非特異的タンパク質（ウシ胎仔血清アルブミン）で遮断した後に、粒子はPBSで洗浄され、蛍光標識されたV5には18A1モノクローナル抗体が加えられた。平板はシールされ、平板シェーカーで2時間37 $^{\circ}$ Cで配置された。振動ステップが懸濁状態でアルミニウム粒子を保持するために加えられ、これにより保温保持の時間が最小にされた。短い洗浄ステップの後、物質の最終ペレットが多チャンネルピペットを使用して食塩加リン酸緩衝液（PBS）で再懸濁され、平板は485 $_{EX}$  / 530 $_{EM}$ で蛍光マイクロプレートリーダーで読みとられた。生成されたV5および18A1信号はバックグラウンド修正され、データは修正信号として、または対照条件信号のパーセントとして表現された。濾過平板検出の導入に先立ち、初期V5検定データは、リン酸アルミニウム粒子を洗浄し分離するために、微小遠心分離を用いて微小遠心管ベース検定を使用して生成された。これは濾過平板バージョンで置換され、分析者によるより大きなサンプル数を効果的に試験することが可能となった。

10

#### 【0018】

##### 中空繊維リアクターでのモノクローナル抗体の調製

T-75フラスコ（V5）で保持された細胞が遠心分離で収穫され、その細胞型に特異的な新鮮培地に再懸濁された。凍結細胞株（18A1）は37 $^{\circ}$ C水で解凍され、20mlの暖かい培地で希釈され、細胞は1,000 $\times$ g, 10分の遠心分離で収穫された。上澄みは廃棄され、細胞ペレットは新鮮常温培地10mlに再懸濁され、25ml組織培養フラスコで37 $^{\circ}$ Cで一晩培養された。細胞フラスコは毎日検査され、栄養補給または継代培養された。

20

#### 【0019】

中空繊維製造業者の指示に従って、約3 - 5 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞が遠心分離で収穫され、16ml量の新鮮培地に再懸濁され、製造業者の指示に基づき、これまでに培地で馴化された中空繊維カートリッジに接種された。中空繊維システムは、もともと容器で125mlの培地と共に供給された。細胞成長は産出される乳酸塩の量を測定することによりモニターされ、125ml容器は、容器培地内の乳酸塩水準がリットル当たり1グラムを越えた時に、500mlおよび1L容器サイズの新鮮培地で置換された。一般にカートリッジは、1L培地容器が必要とされた時に、一度収穫することができ、それは典型的にはカートリッジの接種2週間後であった。乳酸塩水準は毎日モニターされ、収穫は各培地変更の際に行われた。収穫物質は、2,000 $\times$ gで10分の遠心分離により細胞と破片の清澄化が行われ、生成上澄みは除去され、精製が行われるまで-20 $^{\circ}$ Cで凍結された。各収穫物からのアリコートが、精製に先立ち、mAbの水準を決定するためにエリザにより分析された。典型的には、各中空繊維リアクターは、第2日目毎に収穫され、生産性をロスすることなく8週にわたり収穫することができた。

30

#### 【0020】

濾過平板検定についての我々の経験は、非常に短い時間期間のものが集められたが、それは検定が数ヶ月存在するだけであったためである。しかしその間に、数多くの性能特性と傾向が、方法の最適化とサンプル試験の間に決定された。検定最適化データは、検定がその発端から非常にうまく行われたために、限定されたものとなる。最適化の努力は3つの領域、すなわちサンプル量の減少、反応ウエル当たり必要とされる標識抗体量の減少、および異なる遮断試薬の評価である。

40

#### 【0021】

第1の組の実験は、調合VLP物質の量と、96ウエル濾過平板での反応ウエル当たり追加される標識抗体の量を変えることであった。SBAS4で調合されたHPV-16物質は、10、5、または2.5g/ウエルの濃度の標識V5または18A1で、5または2g/ml（それぞれ125または50l/ウエル）の濃度で試験された。検定はSOP DV-6363に記載されたように実行され、但し例外は検定希釈液が更に非特異的マウス

50

I g G の 0 . 1 % ( v / v ) を含んでいたことであった。この実験の結果は表 1 と表 2 に要約されている。表 1 からのデータは、1 8 A 1 または V 5 抗体濃度が 2 . 5  $\mu$  g / ウエルであることを示している。表 2 は、2  $\mu$  g / m l のアジュバント物質で同一抗体濃度で生成されたデータを示し、類似の結果を産出する。これらの実験に基づき、ウエル当り試験するアジュバント物質の量は 5 0  $\mu$  l ( 2  $\mu$  g / ウエル ) に設定され、標準 V 5 または 1 8 A 1 抗体水準は 2 . 5  $\mu$  g / ウエルに設定された。この実験で使用された V 5 および 1 8 A 1 抗体のアレクサ ( A l e x a ) - 4 8 8 標識水準は、それぞれ 4 . 3 と 1 . 1 であった。

#### 【 0 0 2 2 】

もとの V 5 管法は、B S A に加えて、非特異的マウス I g G <sub>2 a</sub> を遮断薬として使用した。この第 2 遮断薬の追加は、B S A 単独の場合よりも管検定フォーマットでより優れたバックグラウンドを産出することが発見された。この遮断手順は、検定サンプル当り使用される A l P O <sub>4</sub> と抗体物質の量の抜本的な減少の故で、検定フォーマットが 9 6 ウエル濾過平板に変更された時に再度調査された。表 3 と表 4 は、遮断研究についての結果を示し、B S A 単独、または B S A と濾過検定で遮断薬と希釈剤として使用される 1 0  $\mu$  g / m l の非特異的マウス I g G <sub>2 a</sub> を含む遮断薬の使用を比較する。この研究は H P V - 1 6 調合抗原と、5 0  $\mu$  l ( 2  $\mu$  g / ウエル ) サンプル量、および 2 . 5  $\mu$  g / ウエルの標識抗体量で、このシステムにとって最適であるとこれまでに決められた形で行われた。この研究で使用された V 5 および 1 8 A 1 抗体のアレクサ - 4 8 8 標識水準は、それぞれ 4 . 3 と 1 . 1 であった。表 3 と表 4 で見られるように、マウス I g G <sub>2 a</sub> の除去は、各グループからの複製物の % C V の減少により、また観察される信号 / 雑音比の増加により、検定性能を事実上改善した。従ってこれらの研究に基づき、非特異的マウス I g G <sub>2 a</sub> を濾過平板ベース V 5 検定から省略することが決定された。

#### 【 0 0 2 3 】

この検定システムで観察されたもっとも重要な性能特性は、アレクサ - 4 8 8 蛍光染料での V 5 と 1 8 A 1 の標識水準であった。もともと我々は、V 5 または 1 8 A 1 の 1 m g 量を標識し、変化する標識水準を得、それはしばしばキット指示書で言及された 4 モル最小量以下であった。この故で、またアレクサ - 4 8 8 が自己消滅性に比較的無反応であるとの製造業者の品質説明の故で、我々はアレクサ - 4 8 8 - S E ( スクシンイミジルエステル ) をバルク量で購入し、そのため我々は 1 個の大量バルク量の V 5 または 1 8 A 1 抗体を標識することができた。前記の通り我々のバルク標識への努力に続き、D V - 5 2 0 4 に記載されたのと基本的に同じ手順が行われ、但し、例外としては 1 2 . 5 m g の V 5 または 1 8 A 1 抗体が、販売者により注文包装された抗体とアレクサ - 4 8 8 - S E と同じ割合で 1 個のバルク量に標識されたことが異なっていた。このバルク標識アプローチは、1 8 A 1 および V 5 それぞれのモル当りとり込みの 6 . 7 および 9 . 4 モルの標識水準を生み出した。

#### 【 0 0 2 4 】

古いバッチ標識試薬に対する同一の濃度での検定にこれらバルク標識試薬を使用するに際して、A l P O <sub>4</sub> 吸着 H P V - 1 6 V L P s は、低い標識効率を持つ古い試薬が使用された時に観察されたものに比べて、非常に少ない信号を提示したことが発見された。追加の研究において、4 0  $\mu$  g / m l または 4  $\mu$  g / m l で吸着され ( また 2  $\mu$  g / ウエルおよび 0 . 2  $\mu$  g / ウエルで試験され ) た V L P s が、バルクまたはバッチ標識された V 5 および 1 8 A 1 調製物で染色された。我々の結果では、より低い標識水準での V 5 および 1 8 A 1 が 4 0  $\mu$  g / m l と 4  $\mu$  g / m l の物質の間で期待された信号の 1 0 倍の低下に近いものがあり、一方高度に標識されたバルク V 5 と 1 8 A 1 が僅か 2 - 3 . 5 倍の信号変調を有していたことを示した。更により低い標識水準バッチ V 5 は、4 0  $\mu$  g / m l A l P O <sub>4</sub> 吸着サンプルをプローブするために使用された時に、バルク標識 V 5 よりも約 7 倍高かった。

#### 【 0 0 2 5 】

類似の現象が、バルクおよびバッチ標識 1 8 A 1 抗体で観察された。このデータは表 5 で

10

20

30

40

50

示される。我々の限定された実験から、バルク標識物質で観察された信号減少が蛍光体消滅か、または抗体結合の低下によるものであるかどうかについては明確に決定することはできないが、我々が集めた限定されたデータは、蛍光体の消滅であることを示唆している。もしも結合の低下が信号低下によるものであるとすると、パッチ：バルク信号比で同じような低下を見ることが期待されよう。例えば、V5でプローブされた40 µg/mlの物質での6倍の信号の差が、同じように4 µg/ml物質で観察されるに違いない。しかしこの一定の比率は観察されなかったし、それは蛍光消滅が、より高い水準でのVLP物質がプローブされた時に発生することを示唆している。仮説は、より高いVLP吸着水準で、より高度に標識されたV5抗体が立体的により強制された状態にあり、これがアレクサ-488分子をお互いに密に隣接させることを可能にする、ということである。この立

10

20

30

40

#### 【0026】

アレクサ-488標識キット(IgGを標識するために特異的に設計されたもの)に関して提供された説明書は、IgGのモル当リアレクサ-488の4-9モルの許容カプリング範囲を述べていたけれども、我々の経験では、標識の5.4モル以上の過剰ないずれの水準でも、信号の著しい低下を生じることが示された。これは反応バイアル瓶当り2mgのIgGを標識したパッチ標識実験に基づくものであったが、それは標識キットの供給業者が推薦したタンパク質水準の2倍である。これは5.4モル標識比を生じ、また試験された2VLP用量に対し満足すべき信号比である(表5参照)。我々の発見に基づき、我々は、取り込みの範囲を、抗体のモル当り4-9モルの標識から、取り込みの1-5.4モルに変更した。従ってDV-5204は最新式に変更されるであろう。

#### 【0027】

V5濾過平板法を用いて生成された追加のデータが、表6で示される。図1と図2は、チメロサルありまたはなしでALPO<sub>4</sub>(SBAS4)に調合された2個のロットのHPV-16物質を比較した時に生じたV5および18A1信号を示す。このデータは、チメロサルを含有しない物質と比較した時に、チメロサルを持つ調合物質は4で保管されたにも拘らず、V5結合能力のほぼ完全な低下を受けたことを示している(図1)。更にV5結合における低下は、観察された18A1結合信号の大きな増加により確認されたが(図2)、これはVLPの分解を示唆している。この分解は18A1モノクローナル抗体が優先的に結合する追加の線状エピトープを露出する。

#### 【0028】

表6は、未標識抗体(V5)が濾過平板検定に使用することができるかどうか、従って、商業利用可能なアレクサ-488標識抗マウス接合体(モレキュラー・プローブス)で検出されるかどうかを決定する研究に関するデータを提供する。この研究では、調合物質(40 µg/mlでのMEDI-503.1/SBAS4を伴うもの)が、意図的にV5エピトープを分解するために、RTで30分、P-塩化水銀フェニルスルホン酸(PCMP S)1mMで処理された。濾過平板検定は、直接標識されたV5と18A1(標準方法)を用いて、また同様に抗マウスアレクサ-488接合体で続いて検出された異なる濃度の未標識V5を用いて行われた。表6で示されたように、2種の方法の間には明らかな相関が存在せず、それは未標識抗体の使用がV5濾過平板検定では実行できなかったことを示している。

#### 【0029】

要約すると、この実施例は詳細なV5濾過平板検定と、そのVLPベースワクチンの抗原性を評価する使用法を提供する。

#### 【0030】

#### 【表1】

[抗体] $\mu\text{g}/\text{well}$	サンプル同定	生値	平均修正値	信号/雑音
(V5)10	HPV-16	4994	5406	8.8
“	“	5818		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	627	616	
“	“	604		
(V5)5	HPV-16	4607	5899	27.8
“	“	7190		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	259	212	
“	“	165		
(V5)2.5	HPV-16	7430	5732	28.7
“	“	4033		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	261	200	
“	“	138		
(18A1)10	HPV-16	5656	7904	10.8
“	“	10151		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	531	733	
“	“	935		
(18A1)5	HPV-16	3173	5189	26.0
“	“	7204		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	187	200	
“	“	212		
(18A1)2.5	HPV-16	2427	4445	26.7
“	“	6462		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	181	167	
“	“	152		

10

20

表1. SBAS4調合HPV-16物質, ロットL98H072の5 $\mu\text{g}/\text{well}$ で使用する最適標識抗体濃度を決定するためのV5濾過平板検定データ。  
5 $\mu\text{g}/\text{well}$ 水準の調合物質で、最適標識抗体濃度は、V5(IRL#1820)および18A1(IRL#1822)両抗体で2.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ であった。

【 0 0 3 1 】

30

【 表 2 】

[抗体] μg/well	サンプル同定	生値	平均修正値	信号/雑音
(V5)10	HPV-16	2908	2647	7.6
“	“	2386		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	313	348	
“	“	382		
(V5)5	HPV-16	1934	1691	6.6
“	“	1448		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	186	258	
“	“	329		
(V5)2.5	HPV-16	2247	2361	12.0
“	“	2475		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	201	196	
“	“	191		
(18A1)10	HPV-16	3341	3466	8.5
“	“	3590		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	393	406	
“	“	419		
(18A1)5	HPV-16	2822	2808	12.2
“	“	2793		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	225	231	
“	“	237		
(18A1)2.5	HPV-16	1986	2260	13.5
“	“	2434		
“	AIPO <sub>4</sub> のみ(-)	134	168	
“	“	201		

10

20

表2. SBAS4調合HPV-16物質, ロットL98H072の2 μg/ウェルで使用する最適標識抗体濃度を決定するためのV5濾過平板検定データ。  
2 μg/ウェル水準の調合物質で、最適標識抗体濃度は、V5(IRL#1820)および18A1(IRL#1822)両抗体で2.5 μg/ウェルであった。

【 0 0 3 2 】

30

【 表 3 】

サンプル	生信号	平均信号	修正平均信号	SD(%CV)	信号/雑音比
MEDI-503/SBAS4 チメロサル+ 4°C保管	1657	1713	1564	204(11.9%)	11.4
“	1940				
“	1543				
RT1週保管	540	513	364	106(23.3%)	
“	397				
“	603				
A1PO <sub>4</sub> 対照(-)	151	150	0	15(10.1%)	
“	134				
“	164				
MEDI-503/SBAS4 チメロサル- RT保管	15189	13735	13560	2693 (19.6%)	78.2
“	15389				
“	10628				
SBAS4対照(-)	217	176	0	38(21.9%)	
“	141				
“	169				
MEDI-503/A1OH チメロサル- RT保管	2696	2319	2170	672(29.0%)	15.5
“	1543				
“	2718				
A1OH対照(-)	180	149	0	32(21.1%)	
“	117				
“	151				

表3. SBAS4調合HPV-16物質(チメロサル含有物質用ロットL98H072およびチメロサルなしでA1OHに係る物質用ロット25Nov98)2 μg/ウェルと、標識V5抗体(IRL#1820)2.5 μg/ウェルと共に使用する最適遮断及び希釈タンパク質を決定するためのV5濾過平板検定データ。この表はBSAと10 μg/ml非特異的マウスIgG<sub>2a</sub>の両方を含む遮断および希釈剤で得られた結果を示し、一方表4は、遮断および希釈剤でBSAのみで検定された同一のサンプルに対する結果を示す。

【 0 0 3 3 】

【 表 4 】

10

20

30

サンプル	生信号	平均信号	修正平均信号	SD(%CV)	信号/雑音比
MEDI-503/SBAS4 チメロサル+ 4°C保管	2039	2103	1891	123(5.9%)	9.9
“	2025				
“	2245				
RT1週保管	430	391	179	34(8.8%)	
“	377				
“	366				
A1PO <sub>4</sub> 対照(-)	238	212	0	23(10.8%)	
“	199				
“	198				
MEDI-503/SBAS4 チメロサル- RT保管	15418	17434	17249	1844 (10.6%)	94.2
“	19037				
“	17846				
SBAS4対照(-)	182	185	0	7(3.8%)	
“	193				
“	180				
MEDI-503/A1OH チメロサル- RT保管	3745	3561	3364	572(16.1%)	18.1
“	2919				
“	4018				
A1OH対照(-)	190	196	0	18(9.3%)	
“	217				
“	182				

表4. SBAS4調合HPV-16物質(チメロサルを含有する物質用ロットL98H072およびチメロサルなしでA1OHに係る物質用ロット25Nov98) 2 μg/ウェルと、標識V5抗体(IRL#1820) 2.5 μg/ウェルと共に使用する最適遮断および希釈タンパク質を決定するためのV5濾過平板検定データ。この表は、遮断タンパク質としてBSAのみを含有する遮断および希釈剤で得られた結果を示す。

【 0 0 3 4 】

【 表 5 】

サンプル	修正平均信号V5 (9.2標識) IRL #1844	修正平均信号V5 (4.3標識) IRL #1820	修正平均信号V5 (5.4標識) IRL #1869	修正平均信号V5 (6.8標識) IRL #1835	修正平均信号V5 (3.4標識) IRL #1828
L99C059/SBAS4 4 μg/ml (0.2 μg/ウェル)	21864	40823	54367	3594	691
L99C058/SBAS4 40 μg/ml (2 μg/ウェル)	68387	355356	411052	11538	4707
信号比 40/4 μg/ml	3.1	8.7	7.6	3.2	6.8

表5. IgG分子当たりアレクサ-488標識の表示番号を持つバッチおよびバルク標識V5および18A1抗体を試験するV5濾過平板検定データ。IgG分子当りそれぞれ4.3と3.4標識で標識されたV5と18A1抗体は、調合VLP濃度に基づき予期された10倍の差に近い信号比を示した。

【 0 0 3 5 】

【 表 6 】

10

20

30

40

抗体	サンプル	平均修正信号	対照信号の%
アレキサ-488標識V5 (標準方法)	調合HPV-16, 未処理	399576	100
アレキサ-488標識V5 (標準方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	86295	22
10 $\mu$ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16, 未処理	118531	100
10 $\mu$ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	107670	91
20 $\mu$ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16, 未処理	104163	100
20 $\mu$ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	101317	97
25 $\mu$ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16, 未処理	122826	100
25 $\mu$ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	94742	77

表6. 直接標識されたV5抗体(標準濾過平板方法)と二次アレキサ-488標識接合体で検出された未標識V5を用いる変形とから得られた結果の比較。

10

20

【0036】

実施例B: HPV-18ベースワクチンの免疫原性を測定するB免疫検定

この実施例はJ4濾過平板検定に関し、これはHPV-18アルミニウム吸着モノバルク(AMB)での、また調合物質でのJ4エピトープの存在を測定する抗原性検定である。J4モノクローナル抗体は、免疫原性に必要とされるHPV-18 VLPでのJ4構造性エピトープに指向し、一方18A1モノクローナル抗体は、分解物質に露出された線状エピトープを認識する。VLP物質はリン酸アルミニウム粒子または水酸化アルミニウム粒子のいずれかに吸着することができる。

【0037】

実施例Aに記載されたHPV-16のために開発された検定に類似したHPV-18のための検定を開発する一つの成果として、実験が行なわれ、ここでそれはAlOH吸着物質がチメロサルで処理され、いくつかの構造に特異的かつ線状エピトープに特異的モノクローナル抗体で染色された。これはV5検定に類似した検定で潜在的に有用であるHPV-18 VLPを除いた抗体をスクリーンするために行なわれた。このアプローチは、試験された4個の構造特異的モノクローナル抗体の内、J4エピトープだけがチメロサル処理により影響を受けたことを示唆した。構造的モノクローナル抗体R5は、チメロサル処理の結果、結合では何らの変化も示さなかった。線状エピトープ特異的モノクローナル抗体(18A1)も、チメロサル処理に反応して劇的な変化を示した。最適化されたHPV-18抗原性検定は、J4および18A1モノクローナル抗体両方を利用する。J4検定と平行して行なわれた、続く免疫原性研究は、J4エピトープが免疫原性を必要としたという仮説を支持した。

30

40

【0038】

J4濾過平板検定は、水酸化アルミニウムとリン酸アルミニウム調合HPV-18 VLPsでの構造的エピトープの存在を決定するために、エピトープ特異的モノクローナル抗体(J4)を使用する。更に物質は、調合VLPの構造的状態についての追加の情報を提供するモノクローナル抗体(18A1)を認識する線状エピトープでプローブされる。この検定は96ウエル濾過平板を使用し、これに対し2gの調合または対照アジュバント物質(VLPsなし)が加えられる。濾過平板はマニホールドに配設され、ウエル底部にリン酸アルミニウム粒子を蒸着するように適度の真空が適用される。粒子を1時間非特異的タンパク質(ウシ胎仔血清アルブミン)で遮断した後に、粒子は食塩加リン酸緩衝液(P

50

BS)で洗浄され、またJ4または18A1モノクローナル抗体がウエルに加えられる。平板はシールされ、平板シェーカーで1時間37℃で配置される。振動ステップが懸濁状態でアルミニウム粒子を保存するために使用され、これにより保温時間が最小にされた。保温後に洗浄ステップが行なわれ、蛍光標識ラビット抗マウスIgGがウエルに加えられる。保温と洗浄ステップ後に、物質の最終ペレットが12チャンネルピペットを使用して食塩加リン酸緩衝液(PBS)で再懸濁され、平板は485nm/530nmで蛍光マイクロプレートリーダーで読みとられた。生成されたJ4および18A1信号はバックグラウンド修正され、データは修正信号、または対照条件信号のパーセントとして表現された。

#### 【0039】

10

##### タンパク質A/Gカラムを用いるJ4モノクローナル抗体の精製

タンパク質A/Gカラムと緩衝液が、使用に先立ち室温まで暖められた。凍結J4腹水が解凍され、等量のイムノピュアIgGバインディングバッファーで希釈され、前もって10mlのバインディングバッファーで平衡にされたA/Gカラムに適用された。サンプルがレジンに入った後、カラムは20mlのバインディングバッファーで洗浄された。結合IgGは10mlのイムノピュアIgG溶解バッファーで溶離され、0.1分画量の1Mトリス, pH7.5に収集された。カラムは8mlの溶解バッファー、続いていくつかのカラム量のアジ化ナトリウムを含むPBSで再生され、4℃で保管された。精製抗体はセントリプレップ(CentriPrep)-30装置を用いて30分、3,000rpmの遠心分離で濃縮された。抗体は次いでアジ化ナトリウム0.02%を含む4リットルのPBSで一晩4℃で透析された。抗体の濃度は1.4の吸光率でA<sub>280</sub>吸光度を使用して決定された。

20

#### 【0040】

##### 中空繊維リアクターでの18A1とR5モノクローナル抗体の調製

凍結細胞株が37℃水浴で急速に解凍され、20mlの事前に暖められた培地で希釈され、細胞は1,000×gで10分遠心分離により収穫された。上澄みは廃棄され、細胞ペレットは10mlの新鮮培地にゆっくり再懸濁され一晩25ml組織培養フラスコで37℃で培養された。細胞フラスコは毎日試験され、補給または継代培養された。

#### 【0041】

約3-5×10<sup>7</sup>細胞が遠心分離で収穫され16ml量の新鮮培地に再懸濁され、前もって37℃加湿保温器で少なくとも48時間100mlの培地で馴化された事前馴化中空繊維カートリッジに接種された。中空繊維システムは、もともと125mlの培地で容器に供給された。細胞成長は産出される乳酸塩の量を測定することによりモニターされ、容器培地の乳酸塩がリットル当たり1グラムを越えた時点で、125ml容器は500mlの新鮮培地と1リットル容器サイズ、それぞれで置換された。一般にカートリッジは、1リットル培地容器が必要とされる毎に収穫できたが、それは一般にカートリッジの接種2週間であった。乳酸塩水準は毎日モニターされ、収穫は各培地変更の際に行なわれた。収穫物質は2,000×gで10分遠心分離により細胞と破片が清澄化され、生成上澄みは除去され精製が実行されるまで-20℃で凍結された。各収穫物からの小さなアリコートが、精製に先立ち産出されるモノクローナル抗体の水準を決定するために、直接エリザ(抗原ダウン)を用いて分析された。典型的には各中空繊維リアクターは、1日おきに収穫され、培養物は生産性の低下なしに最低8週維持することができた。

30

40

#### 【0042】

##### マクロプレップセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを使用する18A1とR5モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体は、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを使用して、中空繊維収穫物から精製された。20グラムのマクロプレップセラミックヒドロキシアパタイト樹脂が再水和され、カラムは製造業者により提供される手順「スラリーパッキングを使用する小カラムのパッキング」に従って注がれた。パックカラムは、フローレート7-10ml/分で5ベッド量(~100ml)の10mM, PO<sub>4</sub>緩衝液, pH6.8

50

で平衡化された。凍結収穫物質1管( ~ 30 ml )で解凍され、0.2 mが濾過され、脱イオン水で1 : 4で希釈された。希釈収穫物はカラムにのせられ、280 nmの紫外線吸光度の流出が安定した基線に戻るまで平衡緩衝液で洗浄された。結合モノクローナル抗体は0 - 1 MからのNaCl勾配( 緩衝液A = 10 mM、PO<sub>4</sub> , pH 6.8 ; 緩衝液B = 10 mM、PO<sub>4</sub> + 1 M、NaCl , pH 7.2 )を使用して溶離され、典型的な溶離は18A1に対しては300 - 400 mM、NaClの間で発生した。精製抗体は最終タンパク質濃度1 - 2 mg / mlまで濃縮され、10,000ダルトンカットオフ透析管材料を使用して、カルシウムまたはマグネシウムなしでのダルベッコ食塩加リン酸緩衝液( D - P B S )のいくつかの変形物に対して透析された。物質の純度は、毛管ゲル電気泳動( C G E )により決定され、絶えず90%超の純度を有していた。カラムは100 mlの400 mM、PO<sub>4</sub> , pH 6.8、次いで120 mlの1 M、NaOHで2 ml / 分の減少フローレートで洗浄することにより再生された。カラムは次いで流出pHが6.8と測定されるまで10 ml / 分のフローレートで400 mM、PO<sub>4</sub> , pH 6.8で洗浄された。カラムは最後にアジ化ナトリウム0.02%を含む100 mlの10 mM、PO<sub>4</sub> , pH 6.8で洗浄され、RTで直立して保管された。

#### 【0043】

J4検定は、V5濾過平板検定で使用されたのと同じサンプルと抗体の濃度を採用した。検定の最適化は最小であったが、これは検定がこれらの条件を使用して効果的に行われたためであった。この方法最適化の主要な焦点は、我々の利用できるいずれかの構造特異的モノクローナル抗体が、免疫原性の予言に使えたかどうかを決定することであった。これまでに我々は、HPV-16免疫原性に必要とされるV5エピトープが、有機水銀チメロサルで物質を処理することにより分解されたことを示してきた。更なる実験では、チメロサル処理HPV-16物質が、もはや免疫化マウスでの抗体応答を引き出さなかったことが示された。我々の目標は、我々が接近したいずれかの構造特異的モノクローナル抗体がチメロサル処理HPV-18 VLPsとの結合で損失を示したかどうか、およびその結合の損失がマウスでの免疫原性と何らかの関係を持っていたかどうかを見るために、チメロサルを手段として使用することであった。

#### 【0044】

リン酸アルミニウムに形成されたHPV-18物質は、チメロサル100 µg / mlまたは200 µg / mlのいずれかで、37 °Cで6日または10日処理された。この物質は未処理の対照と共に、J4およびR5構造特異的抗体、同じく18A1線状エピトープ特異的抗体を使用して、J4検定で分析された。J4結合信号は、6日チメロサルで物質を処理した後は減少し、10日後には完全になくなった( 図1および図2 )。R5信号は、チメロサル処理6日後には影響がなく、処理10日後に僅かばかり減少した。HPV-16反応に類似して、18A1結合はチメロサル処理後に増加した。この結果は、J4エピトープが有機水銀分解に感受性であり、また免疫原性研究が確実に開始されることを示唆した。

#### 【0045】

J4エピトープが、マウスの免疫原性に必要であったという仮説を支持する最初の組のデータは、加速安定性試験を受けた後で免疫原性試験に失敗した調合HPV-18物質( ロット# L98H074 )を試験した後で引き出された( S C W 9 7 1 巻 : 5 9 ページ )。この物質は等濃度で対照物質と比較してみると、低水準のJ4信号を有していた( ロット# 20Apr99 )。R5結合信号は影響を受けず、また18A1結合信号は上昇し、分解を示した( 図3参照 )。このデータは、J4エピトープが免疫原性に伴われる、という仮説を支持するものである。

#### 【0046】

J4モノクローナル抗体と結合するエピトープが、更に免疫原性に必要とされることを実証するために、チメロサル処理または未処理物質を使用して、マウス免疫化と平行してJ4検定を行う必要があった。チメロサル分解が温度を上昇させた場合においてもなお数日間を必要とするために、有機水銀PCMPs( p - クロロ水銀フェニルスルホン酸 )

がその J 4 エピトープに対する効果を試験された。この化合物は、チオール基に対する引証された効果では、チメロサルよりずっと優れた特性のある物質であった。HPV-18 VLPs は 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のチメロサルで一晩、または 1 mM の PCMP S で室温で 30 分のいずれかで処理された。サンプルすべては HPV-18 抗原性 (J 4) 濾過平板検定で分析された。チメロサル処理物質は J 4 信号を喪失し、未処理対照に比べて 18 A 1 信号を増加させた (図 4 参照)。PCMP S 処理は J 4 信号を減少させ 18 A 1 信号を増加し (図 5 参照)、これはチメロサル処理で観察された効果に類似していた。このデータは、PCMP S がチメロサルと同じ J 4 エピトープに対する効果を持ち、但し運動量は加速された。

## 【 0 0 4 7 】

免疫原性における J 4 エピトープの役割は、調合された HPV-18 物質が 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のチメロサルで処理され、平行して J 4 および免疫原性検定で試験された。表 7 で示されるように、200 ng 用量では、血清変換率は、1 : 200, 400, または 800 の血清希釈ではチメロサル処理物質で僅か 40% であったが、未処理対照では同じ希釈でも 100% であった。チメロサル処理免疫原の J 4 信号は、対照 (未処理) 信号に標準化した場合には 49% であった。表 8 は、PCMP S を使用した追加の抗原性 / 免疫原性の結果を示している。この実験では、HPV-18 物質 (MEDI-504.2, MJA 02 Jul 99) は室温で 30 分、1 mM の PCMP S で処理され、次いで分解を止めるために氷中に投入された。これらのサンプルは J 4 抗原性検定を用いて分析され、またマウス当り 2  $\mu\text{g}$  および 0.2  $\mu\text{g}$  の用量でマウスに免疫性を与えた。表 8 で示されるように、2% のみの J 4 信号を持つ (未処理対照に標準化された) PCMP S 処理物質は、0.2  $\mu\text{g}$  用量でのいずれの血清希釈でも血清変換を引き出さなかった。能力の大きな損失が同じく 2  $\mu\text{g}$  用量で観察された。R 5 信号は僅かばかり減少し、これは分子の何らかの構造的完全性が無傷で残っていることを示唆している。表 7 および表 8 で要約された研究は、J 4 エピトープが、マウスの HPV-18 VLP 免疫原性 (潜在力) に必要であることを強力に示唆している。

## 【 0 0 4 8 】

## 【 表 7 】

表 7. 免疫原性および J4 検定による分解 MEDI-504-2 物質の分析 (SCW971 巻: 116-120 ページ, 172-178 ページ)

サンプル	動物 当たり 容量	J4 信号%*	R5 信号%*	変換@ 1:200**	変換@ 1:400**	変換@ 1:800**	変換@ 1:1600**	変換@ 1:3200**
未処理	2 $\mu\text{g}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チメロサル	2 $\mu\text{g}$	49%	111%	100%	100%	100%	100%	80%
未処理	0.2 $\mu\text{g}$			100%	100%	100%	60%	60%
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チメロサル	0.2 $\mu\text{g}$			40%	40%	40%	0%	0%

\* 信号% は、試験サンプルからのバックグラウンド修正蛍光信号値を標準状態 (4°C 保管物質) からのバックグラウンド修正蛍光信号で割り、その値を 100 倍して計算される。

\*\* 血清変換率は、個体動物 (条件毎に n=5) からの一次血清 3 週後のエリザ分析で決定された。OD 読み取り > 貯蔵生動物血清の OD3 回での動物の割合が報告された。

## 【 0 0 4 9 】

## 【 表 8 】

10

20

30

40

表8. 対照(未処理)物質と比較した室温で20分1m $\mu$ のPCMPsで処理したMEDI-504-2物質を試験した免疫原性とJ4検定からの結果(SCW1010巻:27-33, 65-69ページ)

サンプル	動物 当たり 容量	J4信号%*	R5信号%*	変換@ 1:200**	変換@ 1:400**	変換@ 1:800**	変換@ 1:1600**	変換@ 1:3200**
未処理	2 $\mu$ g	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
100 M PCMPs	2 $\mu$ g	2%	89%	90%	80%	50%	50%	40%
未処理	0.2 $\mu$ g			100%	100%	90%	70%	60%
100 M PCMPs	0.2 $\mu$ g			0%	0%	0%	0%	0%

\*信号%は、試験サンプルからのバックグラウンド修正蛍光信号値を標準状態(4 $^{\circ}$ C保管物質)からのバックグラウンド修正蛍光信号で割り、その値を100倍して計算される。

\*\*血清変換率は、個体動物(条件毎にn=10)からの一次血清3週後のエリザ分析で決定された。OD読み取り>貯蔵生動物血清のOD3回を持つ動物の割合が報告された。

10

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】モノクローナル抗体18A1がいかに変性抗原に選択的に結合するかを示す図。

【図2】PCAMPsの抗原性に対する効果を示す図。

【図3】PCMPsの免疫原性に対する影響を示す図。

【図4】SBASを伴うALPO<sub>4</sub>に調合されたHPV-16物質からのV5抗体信号の、チメロサルあり(L98H072)およびチメロサルなし(L99C058)で調合された物質との比較を示す図。両物質はV5濾過平板検定での試験に先立ち、4で保管された。その結果は、試験の際のL98H072物質が、同じVLP濃度(40 $\mu$ g/ml)での新鮮調合物質と比較した時、V5信号を殆んど検出できなかったことを示している。

20

【図5】ALPO<sub>4</sub>に調合されたHPV-16物質からの18A1抗体信号(IRL#1828)のチメロサルあり(L98H072)およびチメロサルなし(L99C058)で調合された物質との比較を示す図。両物質はV5濾過平板検定での試験に先立ち、4で保管された。その結果は、試験の際のL98H072物質が、異常に高い18A1信号を有し、VLPの破損を示唆していることを示している。

30

【図6】J4, R5, および18A1モノクローナル抗体結合パターンに対するチメロサル処理の効果を示すJ4濾過平板検定からのデータを示す図。エラーバーは検定での3回のランでの標準エラーを表わしている。

【図7】チメロサル処理サンプルでJ4抗体結合の劇的な損失を示す37でのチメロサル処理10日後のJ4検定データを示す図。エラーバーは検定での3回のランでの標準エラーを表わしている。

【図8】8ヶ月の加速安定性時点で免疫原性試験を失敗したJ4濾過平板検定試験MEDI-517(ロットL98H074)からの結果を示す図。同じロットから対照物質が留保されなかったため、同じHPV-18濃度での追加ロットの物質が調製され、対照として使用された。エラーバーはJ4検定での3回のランの標準エラーである。

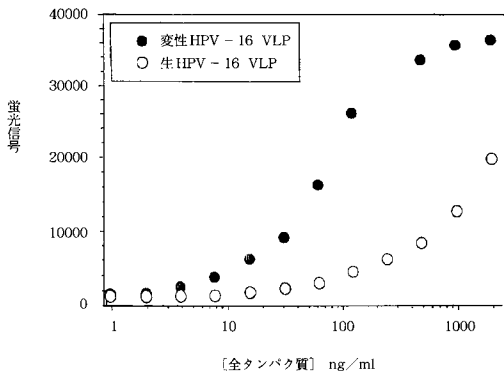
40

【図9】J4濾過平板検定で試験されるHPV-18物質のJ4エピトープに対する、チオール特異的有機水銀p-クロロ水銀フェニルスルホン酸(PCMPs)の効果を示す図。エラーバーはJ4検定での3回のランの標準エラーを表す。

【図10】40への温度上昇でのJ4エピトープに対するチメロサル一晩処理の効果を示す図。J4エピトープの損失は、37以上の保管条件で非常に加速され、それは同程度の損失を達成するためにほぼ10日を要した。エラーバーはJ4検定での3回のランの標準エラーを表わす。

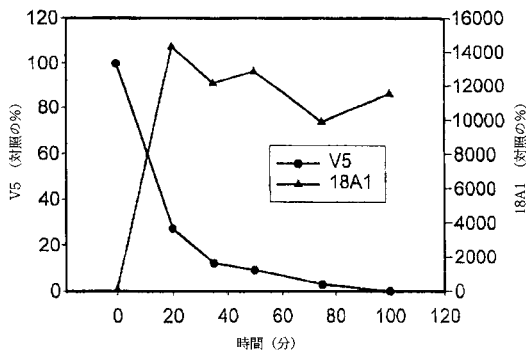
【 図 1 】

モノクローナル抗体 18A1 は変性抗原に選択的に結合する

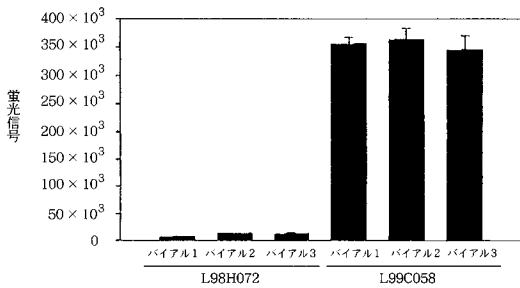


【 図 2 】

PCMPS の抗原性に対する効果



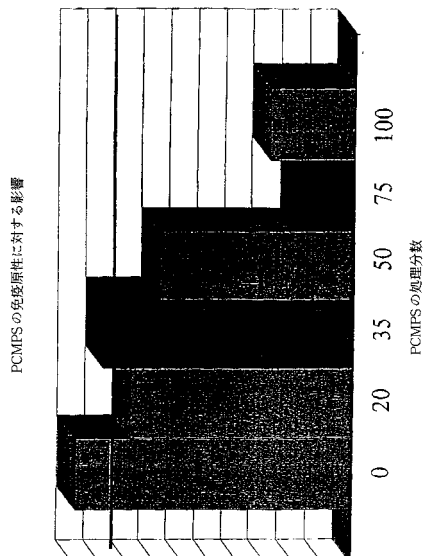
【 図 4 】



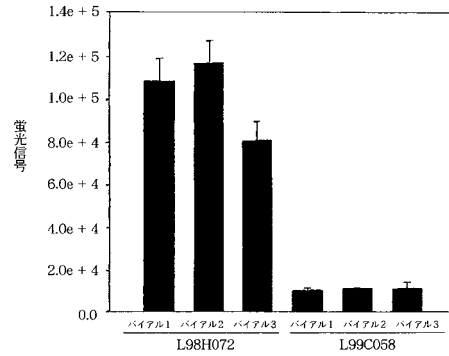
すべてのバイアルからの L98H072 の平均信号 (n = 9 サンプル) = 9366 +/- 1475 (sem)

すべてのバイアルからの L99C058 の平均信号 (n = 9 サンプル) = 349316 +/- 5706 (sem)

【 図 3 】



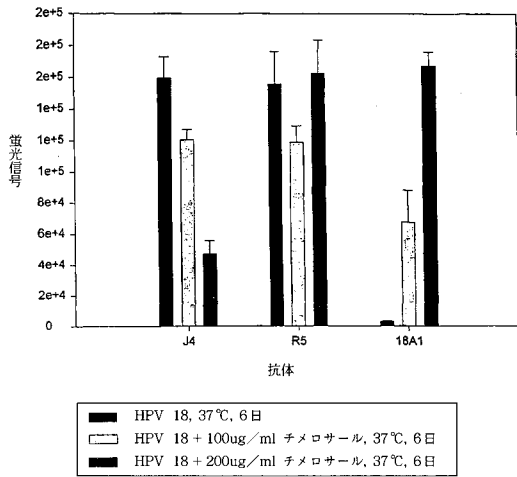
【 図 5 】



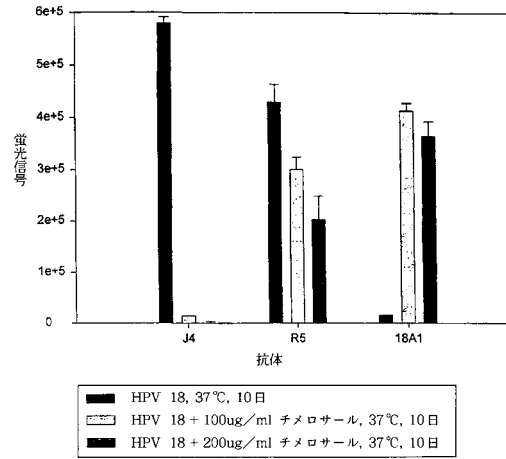
すべてのバイアルからの L98H072 の平均信号 (n = 9 サンプル) = 101471 +/- 11023 (sem)

すべてのバイアルからの L99C058 の平均信号 (n = 9 サンプル) = 9745 +/- 255 (sem)

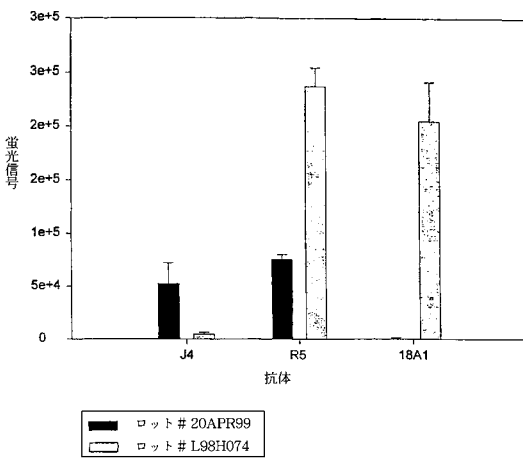
【 図 6 】



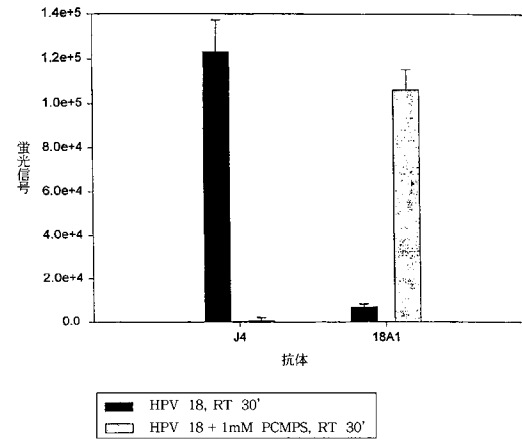
【 図 7 】



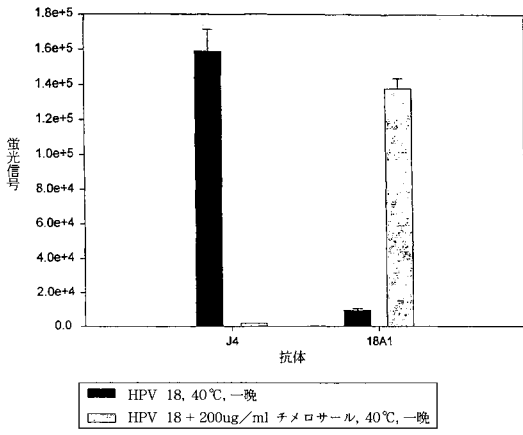
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 March 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/24961 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/70, 1/68, 1/18, 1/04, G01N 33/53, A61K 49/00, 39/42, 39/23
- (21) International Application Number: PCT/US01/28877
- (22) International Filing Date: 17 September 2001 (17.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/233,439 18 September 2000 (18.09.2000) US
- (71) Applicant: MEDIMMUNE, INC. [US/US]; 35 West Watkins Mill Road, Gaithersburg, MD 20878 (US).
- (72) Inventors: SCHENERMAN, Mark, A.; 1 Cornfield Court, Reisterstown, MD 21136 (US); WANG, Shean-Chiann; 14029 Saddle River Drive, Gaithersburg, MD 20878 (US); STROUSE, Robert, J.; 7232 Titonka Way, Derwood, MD 20855 (US); SUZICH, JoAnn; 122 Chestnut Avenue, P.O. Box 411, Washington Grove, MD 20882 (US); WHITE, Wendy, L.; 10717 Wayfarer Road, Germantown, MD 20876 (US).
- (74) Agents: TESKIN, Robin, L. et al.; Pillsbury Winthrop LLP, 1600 Tysons Boulevard, McLean, VA 22102 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/24961 A1

(54) Title: IN VITRO ASSAY FOR MEASURING THE IMMUNOGENICITY OF A VACCINE

(57) Abstract: The present invention provides an assay for measuring the immunogenicity of a vaccine, wherein the vaccine contains an epitope having a conformation associated with an immunogenically active form of the vaccine and a fragment having a conformation associated with an immunogenically inactive form of the vaccine, wherein the method includes exposing a sample of the vaccine to a first ligand capable of binding to the epitope in the conformation associated with the immunogenically active form of the vaccine and a second ligand capable of binding to the fragment in the conformation associated with the immunogenically inactive form of the vaccine and measuring the amount of first ligand bound to the vaccine sample and the amount of the second ligand bound to the vaccine sample.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

**IN VITRO ASSAY FOR MEASURING  
THE IMMUNOGENICITY OF A VACCINE**

Cross Reference to Related Application

This application claims priority from U.S. Provisional Application Serial No. 60/233,439, filed September 18, 2000, the entirety of which is incorporated herein by reference.

Background of the Invention

Field of the Invention

The present invention relates to the field of in vitro measurement of the immunogenicity of vaccines. In particular, the invention relates to the measurement of vaccine immunogenicity based on the binding properties of immunogenic and nonimmunogenic forms of vaccines based on Virus Like Particles.

Summary of the Related Art

One of the critical factors in determining the stability of the bulk and vial vaccine products is measuring immunogenicity. For example, potency testing of HPV-16 Virus-Like Particles (VLPs) by the immunization of mice is a labor and time-intensive endeavor. Typically, after immunization of the formulated VLP material into mice at various dose levels, it requires about six weeks before it can be determined whether the animals are able to mount a sufficient immune response. This problem becomes even more difficult when testing a variety of adjuvants and excipients because of the number of animals which must be utilized. In an effort to streamline development efforts it is desirable to find a rapid and reliable assay that allows the assessment of the immunogenicity of Virus Like Particle (VLP) based vaccines.

Summary and Objects of the Invention

It is an object of the invention to provide an assay for measuring the immunogenicity of a vaccine, wherein the vaccine comprises an epitope having a conformation associated with an immunogenically active form of the vaccine and a fragment having a conformation associated with an immunogenically inactive form of the vaccine. The method comprises exposing a sample of the vaccine to a first ligand capable

WO 02/24961

PCT/US01/28877

of binding to the epitope in the conformation associated with the immunogenically active form of the vaccine and a second ligand capable of binding to the fragment in the conformation associated with the immunogenically inactive form of the vaccine and measuring the amount of first ligand bound to the vaccine sample and the amount of the second ligand bound to the vaccine sample. Preferably, the first and second ligands are each labeled with first and second detectable substances, respectively, prior to exposure of the vaccine thereto, and wherein the amount of first ligand bound to the immunogenically active form of the vaccine and second ligand bound to the immunogenically inactive form of the vaccine are determined by measuring the amount of first and second detectable substances associated with the vaccine sample upon exposure to the first and second ligands. Most preferably, the first and second detectable substances emit fluorescent light of different wave lengths when bound to the immunogenically active form of the vaccine and the immunogenically inactive form of the vaccine, respectively, and wherein measuring the amount of first and second ligand bound to the vaccine is conducted by measuring the fluorescent light emitted by the first and second detectable substances. Typically, the vaccine sample comprises vaccine material and an adjuvant.

In a preferred embodiment, the vaccine sample is placed in a filterplate prior to exposure to the first and second ligands. The filterplate comprises two or more wells, wherein the vaccine sample is placed in at least one well and control adjuvant devoid of vaccine material is placed in at least another well not containing the vaccine material, and wherein the first and second labeled ligands are added to the wells in the plate. The wells containing the vaccine sample are washed upon addition of the first and second ligands to remove from the wells containing the vaccine sample excess ligand that is not bound to the vaccine material prior to measuring the light emitted by the fluorescent substances.

The subject invention is particularly suitable for implementation of immunogenicity assays directed papillomavirus vaccine, particularly papillomavirus vaccine based on Virus Like particles comprising L1 protein, more particularly HPV-16 and HPV-18.

#### Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows how Mab 18A1 selectively binds to denatured antigen.

Figure 2 shows the effect of PCMPS on antigenicity.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Figure 3 shows the impact of PCMPS on immunogenicity.

Figure 4 shows V5 antibody signal (IRL #1820) from HPV-16 material formulated on  $\text{AlPO}_4$  with SBAS4 comparing material formulated with thimerosal (L98H072) and without thimerosal (L99C058). Both materials were stored at 4°C prior to testing in the V5 filterplate assay. Results indicate that the L98H072 material at the time of testing had little detectable V5 signal when compared with the freshly formulated material at the same VLP concentration (40 µg/ml).

Figure 5 shows 18A1 antibody signal (IRL#1828) from HPV-16 material formulated on  $\text{AlPO}_4$  with SBAS4 comparing material formulated with thimerosal (L98H072) and without thimerosal (L99C058). Both materials were stored at 4°C prior to testing in the V5 filterplate assay. Results indicate that the L98H072 material at the time of testing had an extremely high 18A1 signal, indicative of VLP breakdown.

Figure 6 shows data from the J4 filterplate assay showing the effect of thimerosal treatment on the J4, R5, and 18A1 monoclonal antibody binding patterns. The error bars represent the standard error of triplicates tested in the assay.

Figure 7 shows J4 assay data after 10 days of thimerosal treatment at 37°C showing the dramatic loss of J4 antibody binding in thimerosal treated samples. The error bars represent the standard error of triplicates run in the assay.

Figure 8 shows results from the J4 filterplate assay testing MEDI-517 (lot L98H074) that failed immunogenicity testing at the accelerated stability timepoint of 8 months. Because no control material was retained from the same lot, an additional lot of material at the same HPV-18 concentration was prepared and used as the control. The error bars represent the standard error of triplicates run in the J4 assay.

Figure 9 shows the effect of the thiol-specific organomercurial p-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMPS) on the J4 epitope of HPV-18 material as tested in the J4 filterplate assay. The error bars represent the standard error of triplicates run in the J4 assay.

Figure 10 shows the effect of overnight thimerosal treatment on the J4 epitope at the elevated temperature of 40°C. Loss of the J4 epitope was much accelerated over the 37°C storage condition, which required nearly 10 days to accomplish the same level of loss. The error bars represent the standard error of triplicates run in the J4 assay.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Detailed Description of the Preferred Embodiments

The present invention is based on the discovery that the combination of conformational and linear epitope Mab binding can help to determine the relative state of denaturation of a vaccine sample. The invention is further based on the discovery of the correlation of conformational epitope binding with immunogenicity and neutralization. Based on these discoveries, it is believed that the correlative data obtained in conjunction with the development of the subject invention will allow an alternative route to immunogenicity of vaccines that eliminate or drastically reduce or the need for animal testing for immunogenicity associated with conventional methods of vaccine development and quality control.

The inventive concept of the subject application is particularly suitable for implementation using monoclonal antibodies that specifically bind an epitope or other fragment of vaccine material in various conformational states that are directly correlated to vaccine activity or inactivity.

While the subject application can be practiced in the testing and development of any vaccine that includes one or more fragments that may have conformations specifically associated with the active or the inactive state and being capable of binding with a traceable substance, the subject application will be described below by referring to Virus Like Particle based papillomavirus vaccines, specifically HPV-16 and HPV-18. However, the concepts illustrated through these vaccines can be easily generalized to a variety of other vaccines based on the foregoing specification.

The following materials are hereby incorporated by reference in their entirety:

White, W.I., Wilson, S.D., Palmer-Hill, F.J., Woods, R.M., Ghim, S.J., Hewitt, L.A., Goldman, D.M., Burke, S.J., Jenson, A.B., Koenig, S., and Suzich, J.A. "Neutralizing Human Papillomavirus Type 16 L1 Antibodies Primarily Target a Single Antigenic Domain." *J. Virol.*, in press, June 1999.

Roden, R.B.S., Armstrong, A., Haderer, P., Christensen, N.D., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Kirnbauer, R. "Characterization of a Human Papillomavirus Type 16 Variant-dependent Neutralizing Epitope." *J. Virol.*, 71:6247-52, 1997.

White, W.I., Wilson, S.D., Palmer-Hill, F.J., Woods, R.M., Ghim, S.J., Hewitt, L.A., Goldman, D.M., Burke, S.J., Jenson, A.B., Koenig, S., and Suzich, J.A.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

"Neutralizing Human Papillomavirus Type 16 L1 Antibodies Primarily Target a Single Antigenic Domain." J. Virol., in press, June 1999.

EXAMPLE A: Immunoassay B for Measuring the Immunogenicity of HPV-16 Based Vaccine

This Example relates to an antigenicity assay that measures the binding of two fluorescently labeled monoclonal antibodies to probe HPV-16 VLP material on aluminum phosphate or aluminum hydroxide adjuvants. The V5 monoclonal antibody is directed towards the V5 structural epitope on the HPV-16 (VLP) surface which has been shown to be required for immunogenicity (3), while the 18A1 monoclonal antibody recognizes a linear epitope primarily present on degraded or denatured HPV-16 VLPs. This SOP applies to the general assessment of antigenicity on HPV-16 truncated VLP material adsorbed onto aluminum phosphate or aluminum hydroxide particles.

Utilizing the information from the experiments carried out by White, et al. that demonstrated the absolute necessity of the V5 structural epitope on the VLP surface for immunogenicity, we were able to construct an assay that correlated with in vivo immunogenicity in mice. By overexpressing the major HPV-16 capsid protein (L1) in a variety of expression systems it has been shown that, under the correct biochemical conditions, these subunits can assemble into virus-like particles (VLPs), often mimicking the native virus both structurally and immunologically. A number of monoclonal antibodies have been identified by Roden, et al., and two of these antibodies (HPV16.E70 and HPV16.V5) possess viral neutralizing activity against authentic HPV-16 virus. As reported by White, et al., mutation of three amino acids from the wild type L1 sequence, phenylalanine to leucine, alanine to threonine and lysine to asparagine at positions 50, 266 and 380, respectively, resulted in VLPs that were unable to be recognized by either the E70 or V5 monoclonal antibodies. Additionally, mice immunized with VLPs consisting of these mutations were found to be poorly immunogenic, and did not result in significant titers of neutralizing antibody. Mutation of a single V5 epitope amino acid at position 50 from leucine back to the wild type residue of phenylalanine resulted in not only the restoration of V5 antibody binding to the VLP, but also in the ability of the VLP to elicit antibody responses similar to the wild type L1 sequence in vivo.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

The assay utilizes fluorescently labeled V5 antibody which binds to the immunogenic epitope on HPV-16 VLPs either formulated (adsorbed) onto aluminum particles, or unformulated bulk VLPs. There are two assay formats to accommodate each type of preparation. When VLPs were formulated on aluminum phosphate particles, the V5 filterplate format assay was the method of choice. This assay uses a 96-well filterplate to which small volumes of the formulated or control adjuvant materials (no VLPs) are added. The filter plate is mounted on a manifold, and a gentle vacuum is applied to deposit the aluminum phosphate particles on the well bottom to accomplish washing and separation steps. After blocking the particles for 1 hour with bovine serum albumin (BSA) the particles were washed, and fluorescently labeled V5 or 18A1 monoclonal antibodies were added (18A1 antibody preferentially recognizes a non-structural epitope on the HPV-16 VLP). The plate was then sealed and placed on a shaker for 2 hours at 37° C. The shaking step was included in order to keep the aluminum particles in suspension, thus keeping incubation times to a minimum. After a brief wash step the final pellet of material was resuspended with phosphate buffered saline (PBS) using a multi-channel pipette, and the plate was read on a fluorescent microplate reader with excitation at 485 nm and emission at 530 nm. The resulting V5 and 18A1 signals were background corrected, and the data was expressed as either a corrected signal, or as a percent of the control condition signal. Prior to the introduction of the filterplate assay, a microfuge tube-based assay using microcentrifugation to wash and separate phases was used. This was replaced by the filterplate version, which allowed greater sample throughput.

The V5 filterplate assay (DV-6363, ed. 001) uses an epitope-specific monoclonal antibody (V5) to determine the presence of the V5 structural epitope on aluminum phosphate formulated HPV-16 VLPs. Additionally, material is probed with a linear epitope recognizing monoclonal antibody (18A1), which provides additional information on the structural state of the formulated VLP. This assay uses a 96-well filterplate to which 50 µl volumes of the formulated or control adjuvant materials (no VLPs) are added. The filter plate is mounted on a manifold, and a gentle vacuum is applied to deposit the aluminum phosphate particles on the well bottom. After blocking the particles for 1 hour with a non-specific protein (bovine serum albumin) the particles were washed with PBS, and fluorescent-labeled V5 or 18A1 monoclonal antibodies were added to the wells. The plate was sealed and placed on a plate shaker for 2 hours at 37° C. The shaking step was

WO 02/24961

PCT/US01/28877

included in order to keep the aluminum particles in suspension, thus keeping the incubation time to a minimum. After a brief wash step the final pellet of material was resuspended with phosphate buffered saline (PBS) using a 12-channel pipette, and the plate was read on a fluorescent microplate reader at 485<sub>EX</sub>/530<sub>EM</sub>. The resulting V5 and 18A1 signals were background corrected, and the data was expressed as either a corrected signal, or as a percent of the control condition signal. Prior to the introduction of the filterplate assay, early V5 assay data was generated using a microfuge tube-based assay using microcentrifugation to wash and separate the aluminum phosphate particles. This was replaced by the filterplate version, which allowed greater sample numbers to be efficiently run by one analyst.

#### Preparation of Monoclonal Antibodies in Hollow-Fiber Reactors

Cells maintained in T-75 flasks (V5) were harvested by centrifugation, and resuspended in fresh media specific for that cell type. Frozen cell stocks (18A1) were thawed in a 37°C water, diluted with 20 ml of warm media, and the cells were harvested by centrifugation at 1,000 x g for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the cell pellet was gently resuspended in 10 ml of fresh warm media and cultured overnight in a 25 ml tissue culture flask at 37°C. Cell flasks were examined daily, and fed or sub-cultured accordingly.

Following the hollow-fiber manufacturer's directions, approximately  $3-5 \times 10^7$  cells were harvested by centrifugation, resuspended in a 16 ml volume of fresh media, and inoculated into a hollow-fiber cartridge that had been previously conditioned with media according to the manufacturer's instructions. The hollow-fiber system was initially supplied with 125 ml of media in the reservoir. Cell growth was monitored by measuring the amount of lactate produced, and the 125 ml reservoir was replaced with fresh medium in 500 ml and 1 L reservoir sizes when lactate levels in the reservoir medium exceeded 1 gram per liter. Generally, the cartridge could be harvested once the 1L media reservoir was required, which typically was 2 weeks post-inoculation of the cartridge. The lactate levels were monitored daily, and harvesting was performed upon each media change. The harvest material was cleared of cells and debris by centrifugation at 2,000 x g for 10 minutes, and the resulting supernatant was removed and frozen at -20°C until purification could be performed. A small aliquot from each harvest was analyzed by ELISA to

WO 02/24961

PCT/US01/28877

determine the level of mAb produced prior to purification. Typically, each hollow-fiber reactor was harvested every 2<sup>nd</sup> day, and could be harvested for over 8 weeks with no loss in productivity.

Our experience with the filterplate assay has been gathered over a very short period of time, since the assay was only in existence for several months. However, during that time a number of performance characteristics and trends were determined during the method's optimization and sample testing. Assay optimization data is limited since the assay performed very well from its inception. Optimization efforts centered on three areas, namely, sample volume reduction, reduction in the amount of labeled antibody required per reaction well, and evaluation of different blocking reagents.

The first set of experiments varied the amount of formulated VLP material and amount of labeled antibody added per reaction well in the 96-well filterplate. HPV-16 material formulated with SBAS4 was tested at concentrations of 5 or 2  $\mu$ g/ml (125 or 50  $\mu$ l/well, respectively) with labeled V5 or 18A1 at concentrations of 10, 5, or 2.5  $\mu$ g/well. The assay was performed as described in SOP DV-6363 with the exception that the assay diluent also contained 0.1% (v/v) of non-specific mouse IgG. The results from this experiment are summarized in Tables 1 and 2. The data from Table 1 shows that based upon the signal/noise ratio the optimal 18A1 or V5 antibody concentration to use with 5  $\mu$ g/well of adjuvanted material is 2.5  $\mu$ g/well. Table 2 shows data generated at the same antibody concentrations with 2  $\mu$ g/ml of adjuvanted material, and yields similar results. Based on these experiments the volume of adjuvanted material to test per well was set at 50  $\mu$ l (2  $\mu$ g/well) with labeled V5 or 18A1 antibody levels being set at 2.5  $\mu$ g/well. The Alexa-488 labeling levels of the V5 and 18A1 antibodies used in this experiment were 4.3 and 1.1, respectively.

The original V5 tube method used a non-specific mouse IgG<sub>2a</sub>, in addition to BSA, as a blocking agent. The addition of this secondary blocking agent was found to yield superior background in the tube assay format over that of BSA alone. This blocking procedure was investigated again when the assay format was changed to the 96-well filterplate format because of the drastic reduction in the amount of AlPO<sub>4</sub> and antibody material used per assay sample. Tables 3 and 4 show the results of the blocking study, and compares the use of blocking agent containing BSA alone, or BSA with 10  $\mu$ g/ml of non-specific mouse IgG<sub>2a</sub> used as the block and diluent in the filterplate assay. This study was

WO 02/24961

PCT/US01/28877

performed with HPV-16 formulated antigen with a 50  $\mu$ l (2  $\mu$ g/well) sample volume, and labeled antibody amounts of 2.5  $\mu$ g/well, previously determined to be optimal for the system. The Alexa-488 labeling levels of the V5 and 18A1 antibodies used in this study were 4.3 and 1.1, respectively. As seen in Tables 3 and 4, the removal of the mouse IgG<sub>2a</sub> actually improved the assay performance by reducing the %CV of the replicates from each group, as well as by increasing the signal/noise ratio observed. Therefore, based on these studies it was decided to omit the non-specific mouse IgG<sub>2a</sub> from the filterplate-based V5 assay.

The most critical performance characteristic observed in this assay system was the labeling levels of the V5 and 18A1 with the Alexa-488 fluorescent dye. Initially, we labeled 1-mg amounts of V5 or 18A1 and obtained varying labeling levels, often less than the 4-mole minimum mentioned in the kit instructions. Because of this, and the manufacturer's claim that Alexa-488 was relatively insensitive to self-quenching, we purchased bulk amounts of Alexa-488-SE (succinimidyl ester) so that we could label one large bulk amount of V5 or 18A1 antibody. Our bulk labeling effort, described above, followed essentially the same procedure as listed in DV-5204 with the exception that the 12.5 mg of V5 or 18A1 antibody was labeled in one bulk amount with the same proportions of antibody and Alexa-488-SE that had been custom-packaged by the vendor. This bulk labeling approach resulted in labeling levels of 6.7 and 9.4 moles of incorporation per mole of 18A1 and V5, respectively.

Upon using these bulk labeled reagents in the assay at identical concentrations to the old batch labeled reagents, it was discovered that AlPO<sub>4</sub>-adsorbed HPV-16 VLPs exhibited much less signal than was observed when the old reagents with lower labeling efficiencies were used. In an additional study, VLPs that were adsorbed on AlPO<sub>4</sub> at 40 or 4  $\mu$ g/ml (and tested at 2 and 0.2  $\mu$ g/well) were stained with the bulk or batch-labeled V5 and 18A1 preparations. Our results demonstrated that the V5 and 18A1 at lower labeling levels had near the expected ten-fold drop in signal between the 40 and 4  $\mu$ g/ml materials, while the highly labeled bulk V5 and 18A1 had only 2-3.5 fold signal modulation. Moreover, the V5 signal for the lower labeling-level batch V5 was about 7-fold higher than the bulk-labeled V5 when used to probe the 40  $\mu$ g/ml AlPO<sub>4</sub>-adsorbed samples.

A similar phenomenon was observed for the bulk and batch labeled 18A1 antibodies. This data is shown in Table 5. From our limited experiments it cannot be

WO 02/24961

PCT/US01/28877

conclusively determined whether the signal reduction observed for the bulk-labeled materials was due to fluorophore quenching or loss of antibody binding, but the limited data we gathered suggests the former. If loss of binding was responsible for the signal loss, one would expect to see a similar drop in the batch:bulk signal ratio. For example, the six-fold signal difference for the 40 µg/ml material probed with V5 should be observed for the 4 µg/ml material as well. This constant ratio was not observed, which suggests that fluorescence quenching is occurring when higher levels of VLP material are probed. The hypothesis is that at higher VLP adsorption levels, the heavily labeled V5 antibody is in a more sterically constrained state, allowing the Alexa-488 molecules to be in close proximity to one another. This steric organization results in Alexa-488 self-quenching, in a manner identical to that reported for fluorescein.

Although the instructions supplied with the Alexa-488 labeling kits (specifically designed to label IgG) stated an acceptable coupling range of 4-9 moles of Alexa-488 per mole of IgG, our experience has been that any levels in excess of 5.4 moles of label result in a significant loss of signal. This was based on the batch labeling experiment that labeled 2 mg of IgG per reaction vial, which is twice the level of protein recommended by the supplier of the labeling kit. This resulted in a 5.4 molar labeling ratio, and also a satisfactory signal ratio for the 2 VLP doses tested (see Table 5). Based upon our findings we have changed the range of incorporation from the vendor recommended 4-9 moles of label per mole of antibody to 1-5.4 moles of incorporation. DV-5204 will be updated accordingly.

Additional data generated using the V5 filterplate method is shown in Table 6. Figures 1 and 2 show the V5 and 18A1 signals generated when comparing two lots of HPV-16 materials formulated on AlPO<sub>4</sub> (SBAS4) with and without thimerosal. The data shows that when compared with non-thimerosal containing material, formulated material with thimerosal underwent almost a complete loss of V5 binding ability despite being stored at 4°C (Fig. 1). Also, the loss in V5 binding was corroborated by the large increase in 18A1 binding signal observed (Fig. 2), which is indicative of breakdown of the VLP. This breakdown exposes additional linear epitopes to which the 18A1 monoclonal preferentially binds.

Table 6 provides data on a study to determine if unlabeled antibody (V5) can be used in the filterplate assay and subsequently detected with a commercially available

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Alexa-488 labeled anti-mouse conjugate (Molecular Probes). In this study formulated material (MEDI-503.1 w/SBAS4 at 40 µg/ml) was treated with 1 mM p-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMPs) at RT for 30 minutes to intentionally degrade the V5 epitope. The filterplate assay was run using directly labeled V5 and 18A1 (standard method), as well as with varying concentrations of unlabeled V5 subsequently detected with the anti-mouse Alexa-488 conjugate. As shown in Table 6, there was no apparent correlation between the two methods, indicating that using unlabeled antibody was not feasible for the V5 filterplate assay.

In summary, this example provides a detailed of the V5 filterplate assay and its use in evaluating the antigenicity of VLP based vaccines.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

[Antibody] µg/well	Sample identity	Raw value	Mean corrected value	Signal/Noise
(V5) 10	HPV-16	4994	5406	8.8
"	"	5818		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	627	616	
"	"	604		
(V5) 5	HPV-16	4607	5899	27.8
"	"	7190		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	259	212	
"	"	165		
(V5) 2.5	HPV-16	7430	5732	28.7
"	"	4033		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	261	200	
"	"	138		
(18A1) 10	HPV-16	5656	7904	10.8
"	"	10151		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	531	733	
"	"	935		
(18A1) 5	HPV-16	3173	5189	26.0
"	"	7204		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	187	200	
"	"	212		
(18A1) 2.5	HPV-16	2427	4445	26.7
"	"	6462		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	181	167	
"	"	152		

Table 1. V5 filterplate assay data to determine the optimal labeled antibody concentration to use with 5 µg/well of SBAS4 formulated HPV-16 material, lot L98H072. At the 5 µg/well level of formulated material the optimal labeled antibody concentration was 2.5 µg/well for both the V5 (IRL#1820) and 18A1 (IRL#1822) antibodies.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

[Antibody] µg/well	Sample identity	Raw value	Mean corrected value	Signal/Noise
(V5) 10	HPV-16	2908	2647	7.6
"	"	2386		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	313	348	
"	"	382		
(V5) 5	HPV-16	1934	1691	6.6
"	"	1448		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	186	258	
"	"	329		
(V5) 2.5	HPV-16	2247	2361	12.0
"	"	2475		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	201	196	
"	"	191		
(18A1) 10	HPV-16	3341	3466	8.5
"	"	3590		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	393	406	
"	"	419		
(18A1) 5	HPV-16	2822	2808	12.2
"	"	2793		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	225	231	
"	"	237		
(18A1) 2.5	HPV-16	1986	2260	13.5
"	"	2434		
"	AlPO <sub>4</sub> only (-)	134	168	
"	"	201		

Table 2. V5 filterplate assay data to determine the optimal labeled antibody concentration to use with 2 µg/well of SBAS4 formulated HPV-16 material, lot L98H072. At the 2 µg/well level of formulated material the optimal labeled antibody concentration was 2.5 µg/well for both the V5 (IRL#1820) and 18A1 (IRL#1822) antibodies.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Sample	Raw Signal	Mean Signal	Corrected Mean Signal	SD (%CV)	Signal/Noise Ratio
MEDI-503/SBAS4 Thimerosal +					
4°C storage	1657	1713	1564	204 (11.9%)	11.4
"	1940				
"	1543				
RT storage 1 week	540	513	364	106 (23.3%)	
"	397				
"	603				
AlPO <sub>4</sub> control (-)	151	150	0	15 (10.1%)	
"	134				
"	164				
MEDI-503/SBAS4 Thimerosal -					
RT storage	15189	13735	13560	2693 (19.6%)	78.2
"	15389				
"	10628				
SBAS4 control (-)	217	176	0	38 (21.9%)	
"	141				
"	169				
MEDI-503/AIOH Thimerosal -					
RT storage	2696	2319	2170	672 (29.0%)	15.5
"	1543				
"	2718				
AIOH control (-)	180	149	0	32 (21.1%)	
"	117				
"	151				

Table 3. V5 filterplate assay data to determine the optimal blocking and diluent proteins to use with 2 µg/well of SBAS4 formulated HPV-16 material (lot L98H072 for material containing thimerosal, and lot 25Nov98 for material without thimerosal and on AIOH) and 2.5 µg/well of labeled V5 antibody (IRL #1820). This table shows the results obtained for block and diluent containing both BSA and 10 µg/ml of non-specific mouse IgG<sub>2b</sub>, while Table 4 shows the results for the identical samples assayed with only BSA in the block and diluent.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Sample	Raw Signal	Mean Signal	Corrected Mean Signal	SD (%CV)	Signal/ Noise Ratio
MEDI-503/SBAS4 Thimerosal +					
4°C storage	2039	2103	1891	123 (5.9%)	9.9
"	2025				
"	2245				
RT storage 1 week	430	391	179	34 (8.8%)	
"	377				
"	366				
AlPO <sub>4</sub> control (-)	238	212	0	23 (10.8%)	
"	199				
"	198				
MEDI-503/SBAS4 Thimerosal -					
RT storage	15418	17434	17249	1844 (10.6%)	94.2
"	19037				
"	17846				
SBAS4 control (-)	182	185	0	7 (3.8%)	
"	193				
"	180				
MEDI-503/AlOH Thimerosal -					
RT storage	3745	3561	3364	572 (16.1%)	18.1
"	2919				
"	4018				
AlOH control (-)	190	196	0	18 (9.3%)	
"	217				
"	182				

Table 4. V5 filterplate assay data to determine the optimal blocking and diluent proteins to use with 2 µg/well of SBAS4 formulated HPV-16 material (lot L98H072 for material containing thimerosal, and lot 25Nov98 for material without thimerosal and on AlOH) and 2.5 µg/well of labeled V5 antibody (IRL #1820). This table shows the results obtained for block and diluent containing only BSA as the blocking protein.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Sample	Corrected Mean Signal V5 (9.2 labels) IRL#1844	Corrected Mean Signal V5 (4.3 labels) IRL#1820	Corrected Mean Signal V5 (5.4 labels) IRL#1869	Corrected Mean Signal 18A1 (6.8 labels) IRL#1835	Corrected Mean Signal 18A1 (3.4 labels) IRL#1828
L99C059/SBAS4					
4 µg/ml (0.2 µg/well)	21864	40823	54367	3594	691
L99C058/SBAS4					
40 µg/ml (2 µg/well)	68387	355356	411052	11538	4707
Signal ratio 40/4 µg/ml	3.1	8.7	7.6	3.2	6.8

Table 5. V5 filterplate assay data testing batch and bulk labeled V5 and 18A1 antibody, with the indicated number of Alexa-488 labels per IgG molecule. The V5 and 18A1 antibodies labeled with 4.3 and 3.4 labels per IgG molecule, respectively, gave signal ratios close to the expected 10-fold difference, based upon formulated VLP concentration.

Antibody	Sample	Mean corrected signal	% of control signal
Alexa-488 labeled V5 (standard method)	formulated HPV-16, untreated	399576	100
Alexa-488 labeled V5 (standard method)	Formulated HPV-16, 1 mM PCMPS (30 min. RT)	86295	22
10 µg/ml V5 unlabeled (test method)	formulated HPV-16, untreated	118531	100
10 µg/ml V5 unlabeled (test method)	Formulated HPV-16, 1 mM PCMPS (30 min. RT)	107670	91
20 µg/ml V5 unlabeled (test method)	formulated HPV-16, untreated	104163	100
20 µg/ml V5 unlabeled (test method)	Formulated HPV-16, 1 mM PCMPS (30 min. RT)	101317	97
25 µg/ml V5 unlabeled (test method)	formulated HPV-16, untreated	122826	100
25 µg/ml V5 unlabeled (test method)	Formulated HPV-16, 1 mM PCMPS (30 min. RT)	94742	77

Table 6. Comparison of results obtained from directly labeled V5 antibody (standard filterplate method) with the variation of using unlabeled V5 detected with a secondary Alexa-488 labeled conjugate.

EXAMPLE B: Immunoassay B for Measuring the Immunogenicity of HPV-18 Based Vaccine

This Example relates to the J4 filterplate assay, which is an antigenicity assay that measures the presence of the J4 epitope on HPV-18 aluminum-adsorbed mono-bulks (AMB), and on formulated materials. The J4 monoclonal antibody is directed towards the J4 structural epitope on the HPV-18 VLP which is required for immunogenicity, while the 18A1 monoclonal antibody recognizes a linear epitope exposed on degraded material. The VLP material can be adsorbed to either aluminum phosphate or aluminum hydroxide particles.

In an effort to develop an assay for HPV-18 similar to the assay developed for HPV-16 as described in Example A, experiments were performed in which AIOH-adsorbed material was treated with thimerosal and stained with several structure specific and a linear epitope specific monoclonals. This was done to screen for antibodies which potentially may be of use in an assay similar to the V5 assay, but for the HPV-18 VLP. This approach suggested that of the four structure-specific monoclonals tested, only the J4 epitope was affected by thimerosal treatment. The structural monoclonal R5 showed no change in binding as a result of thimerosal treatment. The linear epitope specific monoclonal (18A1) also showed dramatic changes in response to thimerosal treatment. The optimized HPV-18 antigenicity assay utilizes both the J4 and 18A1 monoclonal antibodies. Subsequent immunogenicity studies that were run in parallel with the J4 assay supported the hypothesis that the J4 epitope was required for immunogenicity.

The J4 filterplate assay uses epitope-specific monoclonal antibody (J4) to determine the presence of the structural epitope on aluminum hydroxide and aluminum phosphate formulated HPV-18 VLPs. Additionally, material is probed with a linear epitope recognizing monoclonal antibody (18A1), which provides additional information on the structural state of the formulated VLP. This assay uses a 96-well filterplate to which 2 g of the formulated or control adjuvant materials (no VLPs) are added. The filter plate is mounted on a manifold, and a gentle vacuum is applied to deposit the aluminum particles on the well bottom. After blocking the particles for 1 hour with a non-specific protein (bovine serum albumin), the particles are washed with phosphate buffered saline (PBS), and the J4 or 18A1 monoclonal antibodies are added to the wells. The plate is sealed and placed on a plate shaker for one hour at 37° C. The shaking step is used to

WO 02/24961

PCT/US01/28877

keep the aluminum particles in suspension, thus keeping the incubation time to a minimum. A wash step is performed after the incubation, and fluorescent-labeled rabbit anti-mouse IgG is added to the wells. After the incubation and wash steps, the final pellet of material is resuspended with PBS using a 12-channel pipette, and the plate is read on a fluorescent microplate reader at 485<sub>EX</sub>/530<sub>EM</sub>. The resulting J4 and 18A1 signals were background corrected, and the data was expressed as either a corrected signal, or as a percent of the control condition signal.

#### Purification of J4 Monoclonal Antibodies Using Protein A/G Column

The Protein A/G column and buffers were allowed to warm to room temperature prior to use. The frozen J4 ascites was thawed, diluted with an equal volume of ImmunoPure IgG Binding buffer, and applied to the A/G column previously equilibrated with 10 ml of Binding Buffer. After the sample entered the resin, the column was washed with 20 ml of Binding Buffer. The bound IgG was eluted with 10 ml of ImmunoPure IgG Elution Buffer, and collected into 0.1 fraction volumes of 1 M Tris, pH 7.5. The column was regenerated using 8 ml of Elution buffer followed with several column volumes of PBS containing 0.02% sodium azide, and stored at 4 °C. The purified antibody was concentrated using a CentriPrep-30 device with centrifugation for 30 min. at 3,000 rpm. The antibody was then dialyzed in 4 liters of PBS containing 0.02% sodium azide overnight at 4 °C. The concentration of the antibody was determined using A<sub>280</sub> absorbance with an extinction coefficient of 1.4.

#### Preparation of 18A1 and R5 Monoclonal Antibodies in Hollow-Fiber Reactors

A frozen cell stock was rapidly thawed in a 37°C water bath, diluted with 20 ml of pre-warmed media, and the cells were harvested by centrifugation at 1,000 x g for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the cell pellet was gently resuspended in 10 ml of fresh media and cultured overnight in a 25 ml tissue culture flask at 37°C. Cell flasks were examined daily, and fed or sub-cultured accordingly.

Approximately 3-5 x 10<sup>7</sup> cells were harvested by centrifugation, resuspended in a 16 ml volume of fresh media, and inoculated into a preconditioned hollow-fiber cartridge that had been previously conditioned with 100 ml of media in a 37 °C humidified incubator for at least 48 hours. The hollow-fiber system was initially supplied with 125

WO 02/24961

PCT/US01/28877

ml of media in the reservoir. Cell growth was monitored by measuring the amount of lactate produced, and the 125 ml reservoir was replaced with fresh medium in 500 ml and 1 liter reservoir sizes, respectively, when lactate levels in the reservoir medium exceeded 1 gram per liter. Generally, the cartridge could be harvested once the 1 liter media reservoir was required, which typically was 2 weeks post-inoculation of the cartridge. The lactate levels were monitored daily, and harvesting was performed upon each media change. The harvest material was cleared of cells and debris by centrifugation at 2,000 x g for 10 minutes, and the resulting supernatant was removed and frozen at -20°C until purification could be performed. A small aliquot from each harvest was analyzed using a direct ELISA (antigen down) to determine the level of monoclonal produced prior to purification. Typically, each hollow-fiber reactor could be harvested every other day, and the culture could be maintained for a minimum of 8 weeks with no loss in productivity.

#### Purification of 18A1 and R5 Monoclonal Antibody Using Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Chromatography

Monoclonal antibody was purified from the hollow-fiber harvests using ceramic hydroxyapatite chromatography. Twenty grams of Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite resin was rehydrated, and a column was poured following the procedure, "Packing Small Columns Using Slurry Packing," supplied by the manufacturer. The packed column was equilibrated with 5 bed volumes (~100 ml) of 10 mM PO<sub>4</sub> buffer, pH 6.8, at a flow rate of 7-10 ml/min. One tube (~30 ml) of frozen harvest material was thawed, 0.2 m filtered, and diluted 1:4 with deionized water. The diluted harvest was loaded onto the column, and the column was washed with equilibration buffer until the 280 nm UV absorbance of the effluent returned to a stable baseline. The bound monoclonal antibody was eluted using a NaCl gradient from 0-1 M (Buffer A = 10 mM PO<sub>4</sub>, pH 6.8; Buffer B = 10 mM PO<sub>4</sub> + 1 M NaCl, pH 7.2), with a typical elution occurring between 300-400 mM NaCl for 18A1. The purified antibody was concentrated to a final protein concentration of 1-2 mg/ml, and dialyzed against several changes of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS), without calcium or magnesium, using 10,000 Dalton cutoff dialysis tubing. The purity of the material was determined by capillary gel electrophoresis (CGE), and has consistently had purity greater than 90%. The column was regenerated by rinsing with 100 ml of 400 mM PO<sub>4</sub>, pH 6.8, followed by 120 ml of 1 M NaOH at a reduced flow rate of 2

WO 02/24961

PCT/US01/28877

ml/min. The column was then rinsed with 400 mM PO<sub>4</sub>, pH 6.8, at a 10 ml/min flow rate until the effluent pH measured 6.8. The column was finally rinsed with 100 ml of 10 mM PO<sub>4</sub>, pH 6.8, containing 0.02% sodium azide, and stored upright at RT.

The J4 assay adopted the same sample and antibody concentrations used in the V5 filterplate assay. Assay optimization was minimal because the assay performed well using these conditions. The major focus of this method optimization was to determine if any of the structure-specific monoclonals available to us were predictive of immunogenicity. Previously, we have shown that the V5 epitope, required for HPV-16 immunogenicity, was degraded by treatment of the material with the organomercurial thimerosal. Further experimentation showed that the thimerosal treated HPV-16 material no longer elicited an antibody response in immunized mice. Our goal was to use thimerosal as a tool to see if any of the structure-specific monoclonals that we had access to showed a loss of binding to thimerosal treated HPV-18 VLPs, and if that loss of binding had any relation to immunogenicity in mice.

The HPV-18 material formulated on aluminum phosphate was treated with either 100 or 200 µg/ml of thimerosal at 37 °C for either 6 or 10 days. This material, along with the untreated control, were analyzed in the J4 assay using the J4 and R5 structure-specific antibodies, as well as the 18A1 linear-epitope specific antibody. The J4 binding signal decreased after treatment of the material with thimerosal for 6 days, and was completely gone after 10 days (Figures 1 and 2). The R5 signal was unaffected after 6 days of thimerosal treatment, and only slightly decreased after 10 days of treatment. Similar to the HPV-16 reaction, the 18A1 binding increased after the thimerosal treatment. This result suggested that the J4 epitope was sensitive to organomercurial degradation, and warranted that immunogenicity studies be started.

The first set of data supporting the hypothesis that the J4 epitope was required for immunogenicity in mice was elicited after testing formulated HPV-18 material (lot #L98H074) that had failed the immunogenicity test after undergoing accelerated stability testing (SCW 971:59). This material had a low-level of J4 signal compared to control material at an equivalent concentration (lot #20Apr99). The R5 binding signal was unaffected, and the 18A1 binding signal was elevated indicating degradation (see Figure 3). This data supports the hypothesis that the J4 epitope is involved in immunogenicity.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

To verify that the epitope bound by the J4 monoclonal was also required for immunogenicity, it was necessary to perform the J4 assay in parallel with mouse immunizations using thimerosal treated and untreated material. Because thimerosal degradation requires several days even at elevated temperatures, the organomercurial PCMPS (p-chloromercuriphenylsulfonic acid) was tested for its effect on the J4 epitope. This compound was a much better characterized substance than thimerosal with documented effects on thiol groups. HPV-18 VLPs were treated with either 200 µg/ml thimerosal at 40 °C overnight, or with 1 mM PCMPS at room temperature for 30 minutes. All of the samples were analyzed in the HPV-18 antigenicity (J4) filterplate assay. The thimerosal treated material lost J4 signal and had increased 18A1 signal when compared to the untreated control (see Figure 4). The PCMPS treatment showed decreased J4 signal and increased 18A1 signal (see Figure 5), which was similar to the effect observed with thimerosal treatment. This data showed that PCMPS had the same effect on the J4 epitope as thimerosal, but with accelerated kinetics.

The role of the J4 epitope in immunogenicity was examined in a study in which formulated HPV-18 material was treated with 200 µg/ml thimerosal, and tested in the J4 and immunogenicity assay in parallel. As shown in Table 1, at the 200 ng dose the seroconversion rate was only 40% in the thimerosal-treated material at sera dilutions of 1:200, 400, or 800, but was 100% in the untreated control at these same dilutions. The J4 signal of the thimerosal treated immunogen was 49% when normalized to the control (untreated) signal. Table 2 shows the result of an additional antigenicity/immunogenicity study using PCMPS. In this experiment HPV-18 material (MEDI-504.2, MJA 02Jul99) was treated with 1 mM PCMPS at room temperature for 30 minutes, and then put on ice to stop the degradation. These samples were analyzed using the J4 antigenicity assay, and also immunized into mice at doses of 2 and 0.2 µg/mouse. As shown in Table 2, the PCMPS treated material that had only a 2% J4 signal (normalized to untreated control) elicited no seroconversion at any sera dilution at the 0.2 µg dose. A large loss of potency was also observed at the 2 µg dose. The R5 signal was only slightly reduced, suggesting that some structural integrity of the molecule was left intact. The studies summarized in Tables 1 and 2 strongly suggest that the J4 epitope is required for HPV-18 VLP immunogenicity (potency) in mice.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

Therefore, this assay provides an in vitro means of evaluating the potential efficacy of a VLP based vaccine based on antigenicity.

Sample	Dose per animal	% Signal J4*	% Signal R5*	Conversion @ 1:200*	Conversion @ 1:400	Conversion @ 1:800	Conversion @ 1:1600	Conversion @ 1:3200
Untreated	2 µg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
200 µg/ml thimerosal	2 µg	49%	111%	100%	100%	100%	100%	80%
Untreated	0.2 µg			100%	100%	100%	60%	60%
200 µg/ml thimerosal	0.2 µg			40%	40%	40%	0%	0%

\*Percent signals are calculated by dividing the background corrected fluorescent signal value from the test sample by the background corrected fluorescent signal from the standard condition (4°C stored material) and multiplied by 100.

\*\*Seroconversion rates were determined by ELISA analysis of 3 week post-primary sera from individual animals (n=5 per condition). The percentage of animals with OD readings > 3 times the OD of pooled naïve animal's sera were reported.

Table 1. Analysis of degraded MEDI-504-2 material by both immunogenicity and J4 assays (SCW971:116-120, 172-178).

Sample	Dose per animal	% Signal J4*	% Signal R5*	Conversion @ 1:200*	Conversion @ 1:400	Conversion @ 1:800	Conversion @ 1:1600	Conversion @ 1:3200
Untreated	2 µg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
100 M PCMPS	2 µg	2%	89%	90%	80%	50%	50%	40%
Untreated	0.2 µg			100%	100%	90%	70%	60%
100 M PCMPS	0.2 µg			0%	0%	0%	0%	0%

\*Percent signals are calculated by dividing the background corrected fluorescent signal value from the test sample by the background corrected fluorescent signal from the standard condition (4°C stored material) and multiplied by 100.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

\*\*Seroconversion rates were determined by ELISA analysis of 3 week post-primary sera from individual animals (n=10 per condition). The percentage of animals with OD readings > 3 times the OD of pooled naïve animal's sera were reported.

Table 2. Results from immunogenicity and J4 assay testing of MEDI-504-2 material treated with 1 mM PCMPs for 20 minutes at room temperature as compared to control (untreated) material. (SCW1010: 27-33, 65-69).

WO 02/24961

PCT/US01/28877

What is claimed is:

1. An assay for measuring the immunogenicity of a vaccine, wherein the vaccine comprises an epitope having a conformation associated with an immunogenically active form of the vaccine and a fragment having a conformation associated with an immunogenically inactive form of the vaccine, wherein the method comprises exposing a sample of the vaccine to a first ligand capable of binding to the epitope in the conformation associated with the immunogenically active form of the vaccine and a second ligand capable of binding to the fragment in the conformation associated with the immunogenically inactive form of the vaccine and measuring the amount of first ligand bound to the vaccine sample and the amount of the second ligand bound to the vaccine sample.

2. The assay of Claim 1, wherein the first and second ligands are each labeled with first and second detectable substances, respectively, prior to exposure of the vaccine thereto, and wherein the amount of first ligand bound to the immunogenically active form of the vaccine and second ligand bound to the immunogenically inactive form of the vaccine are determined by measuring the amount of first and second detectable substances associated with the vaccine sample upon exposure to the first and second ligands.

3. The assay of Claim 2, wherein the first and second detectable substances emit fluorescent light of different wave lengths when bound to the immunogenically active form of the vaccine and the immunogenically inactive form of the vaccine, respectively, and wherein measuring the amount of first and second ligand bound to the vaccine is conducted by measuring the fluorescent light emitted by the first and second detectable substances.

4. The assay of Claim 3, wherein the vaccine sample comprises vaccine material and an adjuvant.

5. The assay of Claim 4, wherein the vaccine sample is placed in a filterplate prior to exposure to the first and second ligands.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

6. The assay of Claim 5, wherein the filterplate comprises two or more wells, wherein the vaccine sample is placed in at least one well and control adjuvant devoid of vaccine material is placed in at least another well not containing the vaccine material, and wherein the first and second labeled ligands are added to the wells in the plate.
7. The assay of Claim 6, wherein the wells containing the vaccine sample are washed upon addition of the first and second ligands to remove from the wells containing the vaccine sample excess ligand that is not bound to the vaccine material prior to measuring the light emitted by the fluorescent substances.
8. The assay of Claim 1, wherein the vaccine is a papillomavirus vaccine.
9. The assay of Claim 8, wherein the vaccine comprises a Virus Like Particle.
10. The assay of Claim 9, wherein the Virus Like Particle comprises L1 protein.
11. The assay of Claim 9, wherein the Virus Like Particle comprises HPV-16.
12. The assay of Claim 11, wherein the epitope having a conformation associated with an active form of the vaccine is V5 epitope.
13. The assay of Claim 12, wherein the ligand capable of binding to the epitope in a conformation associated with the immunogenically active form of the vaccine is HPV16.V5 monoclonal antibody.
14. The assay of Claim 13, wherein HPV16.V5 is labeled with a fluorescent substance.
15. The assay of Claim 11, wherein the inactive form of the vaccine comprises denatured L1 protein.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

16. The assay of Claim 15, wherein the denatured L1 protein comprises linear L1 protein.
17. The assay of Claim 16, wherein the ligand capable of binding to the vaccine in a conformation associated with the immunogenically inactive form of the vaccine comprises 18A1 monoclonal antibody.
18. The assay of Claim 17, wherein 18A1 is labeled with a fluorescent substance.
19. The assay of Claim 18, wherein 18A1 is employed in conjunction with HPV16.V5, wherein HPV16.V5 is labeled with a fluorescent substance which emits light at a wavelength different from the wavelength of the light emitted by the fluorescent substance on 18A1.
20. The assay of Claim 9, wherein the Virus Like Particle comprises HPV-18.
21. The assay of Claim 20, wherein the epitope having a conformation associated with an active form of the vaccine is J4 epitope.
22. The assay of Claim 21, wherein the ligand capable of binding to the epitope in a conformation associated with the immunogenically active form of the vaccine is HPV18.J4 monoclonal antibody.
23. The assay of Claim 22, wherein HPV18.J4 is labeled with a fluorescent substance.
24. The assay of Claim 20, wherein the inactive form of the vaccine comprises denatured L1 protein.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

25. The assay of Claim 24, wherein the denatured L1 protein comprises linear L1 protein.

26. The assay of Claim 25, wherein the ligand capable of binding to the vaccine in a conformation associated with the immunogenically inactive form of the vaccine comprises 18A1 monoclonal antibody.

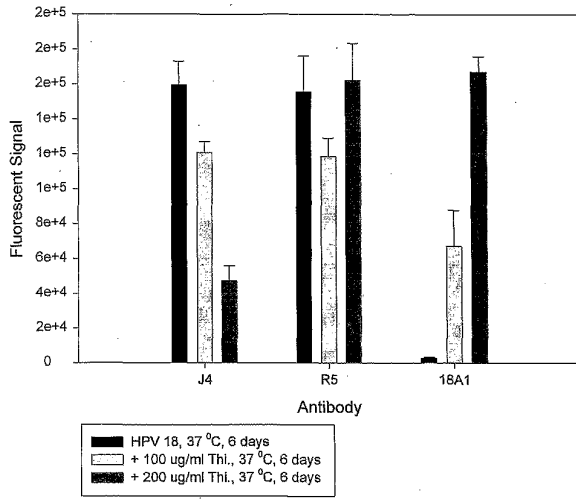
27. The assay of Claim 26, wherein 18A1 is labeled with a fluorescent substance.

28. The assay of Claim 27, wherein 18A1 is employed in conjunction with HPV18.J4, wherein HPV18.J4 is labeled with a fluorescent substance which emits light at a wavelength different from the wavelength of the light emitted by the fluorescent substance on 18A1.

WO 02/24961

PCT/US01/28877

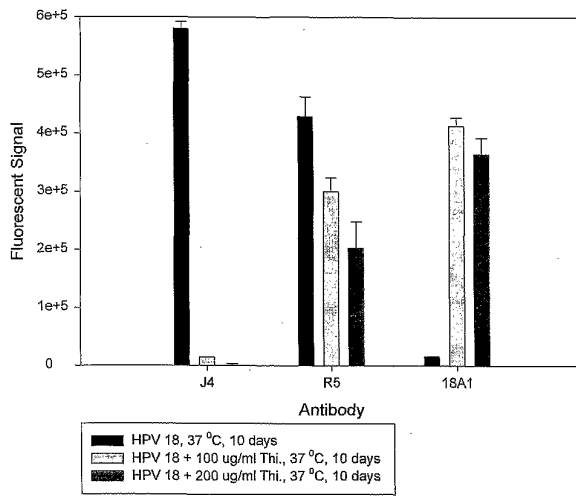
Figure 1



WO 02/24961

PCT/US01/28877

Figure 2



WO 02/24961

PCT/US01/28877

Figure 3

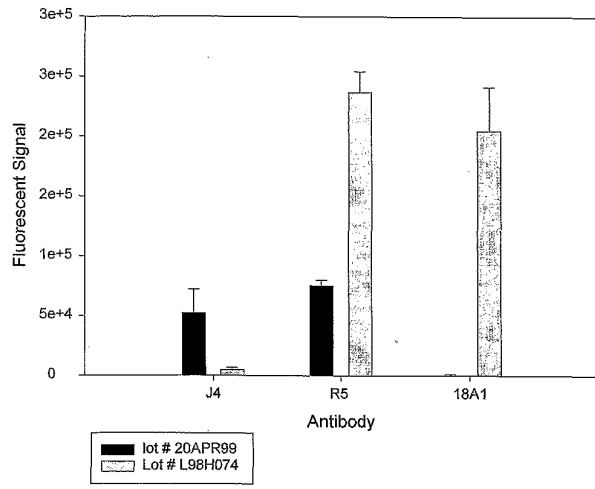
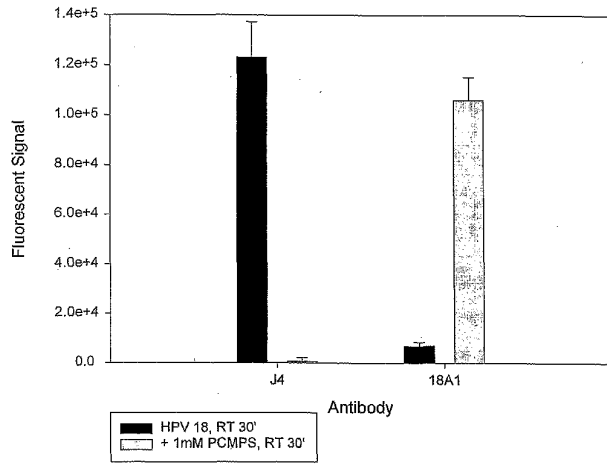


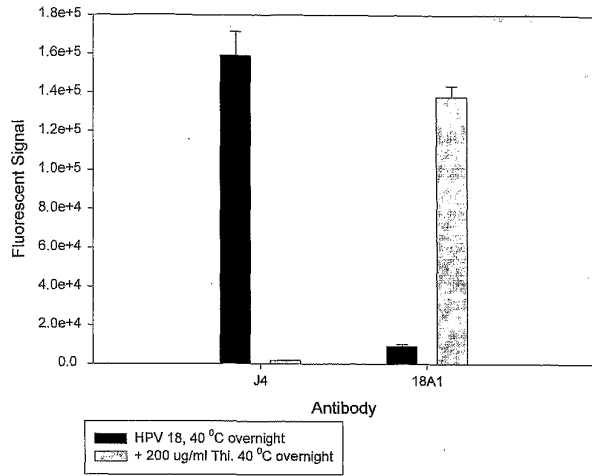
Figure 4



WO 02/24961

PCT/US01/28877

Figure 5



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28877
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/70, 1/68, 1/18, 1/04; G01N 33/53; A61K 49/00, 39/42, 39/12, 39/23 US CL : 435/5, 6, 7.1, 32, 34; 424/9.1, 9.2, 159.1, 204.1, 233.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 6, 7.1, 32, 34; 424/9.1, 9.2, 159.1, 204.1, 233.1 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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHILLER, J.T. et al. Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. Cancer Biology. 1996, Vol. 7, pages 373-382, especially page 376, second column.	1-28
A	WHITE, W.I. et al. Characterization of a Major Neutralizing Epitope on Human Papillomavirus Type 16 L1. Journal of Virology. June 1999, Vol. 73, No. 6, pages 4882-4889, especially abstract.	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	"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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"R" document member of the same patent family	
"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 15 November 2001 (15.11.2001)	Date of mailing of the international search report 17 JAN 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Stacy S. Brown Telephone No. 703-308-0196 JOYCE BRIDGERS PARALEGAL SPECIALIST CHEMICAL MATRIX	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/28877

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

EAST, CAS ONLINE, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS

search terms: scheneman, m?, wang, s?, strouse, r?, suzich, j?, white, w?, papillomavirus, hpv, hpv-16, hpv-18, vaccine, conformational, linear, activated, inactivated, epitope, virus-like particle, vlp, potency testing, tetanus, infectivity, denaturated, assay

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R

(72)発明者 ストルース, ロバート, ジェイ.

アメリカ合衆国, 20855 メリーランド, ダーウッド, ティトンカ ウェイ 7232

(72)発明者 スージック, ジョアン

アメリカ合衆国, 20882 メリーランド, ワシントン グローブ, ピー.オー.ボックス 411, チェスナット アベニュー 122

(72)発明者 ホワイト, ウェンディー, アイ.

アメリカ合衆国, 20876 メリーランド, ジャーマンタウン, ウェイフェアラー ロード 10717

Fターム(参考) 4B063 QA05 QQ10 QQ79 QQ96 QS33

专利名称(译)	用于测量疫苗免疫原性的体外试验		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004510144A</a>	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002529553	申请日	2001-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 公司		
[标]发明人	シエナーマンマークエイ ワンショーチアン ストルースロバートジェイ スージックジョアン ホワイトウエンディーアイ		
发明人	シエナーマン, マーク, エイ. ワン, ショー-チアン ストルース, ロバート, ジェイ. スージック, ジョアン ホワイト, ウエンディー, アイ.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/08 C12Q1/70 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/084		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/70 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QS33		
代理人(译)	丹羽浩之		
优先权	60/233439 2000-09-18 US		
其他公开文献	JP4746819B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了用于确定疫苗免疫原性的试验，其中疫苗包含具有与免疫原活性形式的疫苗相关的构象的表位和免疫原性形式的疫苗和具有相关构象的片段，并且其中所述方法包括使疫苗样品与疫苗的免疫原性活性接触暴露于能够结合能够结合与表单有关的表位的构象的第一配体的第二配位体，在构象中的片段与疫苗免疫原性活性的形式，结合疫苗样本相关联测量第一配体的量和与疫苗样品结合的第二配体的量。

[抗体] μg/well	サンプル同定	生値	平均修正地	信号/雑音
(V5)10	HPV-16	4994	5406	8.8
"	"	5818		
"	AlPO <sub>4</sub> のみ(-)	627	616	
"	"	604		
(V5)5	HPV-16	4607	5899	27.8
"	"	7190		
"	AlPO <sub>4</sub> のみ(-)	259	212	
"	"	165		
(V5)2.5	HPV-16	7430	5732	28.7
"	"	4033		
"	AlPO <sub>4</sub> のみ(-)	261	200	
"	"	138		
(18A1)10	HPV-16	5656	7904	10.8
"	"	10151		
"	AlPO <sub>4</sub> のみ(-)	531	733	
"	"	935		
(18A1)5	HPV-16	3173	5189	26.0
"	"	7204		
"	AlPO <sub>4</sub> のみ(-)	187	200	
"	"	212		
(18A1)2.5	HPV-16	2427	4445	26.7
"	"	6462		
"	AlPO <sub>4</sub> のみ(-)	181	167	
"	"	152		