

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4746819号

(P4746819)

(45) 発行日 平成23年8月10日(2011.8.10)

(24) 登録日 平成23年5月20日(2011.5.20)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70 Z
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z

請求項の数 28 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2002-529553 (P2002-529553)	(73) 特許権者	504333972
(86) (22) 出願日	平成13年9月17日(2001.9.17)		メディミュン, エルエルシー
(65) 公表番号	特表2004-510144 (P2004-510144A)		アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイザーズバーグ, ワン メディミュン ウェイ
(43) 公表日	平成16年4月2日(2004.4.2)	(74) 代理人	100066061
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028877		弁理士 丹羽 宏之
(87) 国際公開番号	W02002/024961	(72) 発明者	シェナーマン, マーク, エイ.
(87) 国際公開日	平成14年3月28日(2002.3.28)		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
審査請求日	平成20年9月17日(2008.9.17)	(72) 発明者	ワン, ショーチアン
(31) 優先権主張番号	60/233, 439		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
(32) 優先日	平成12年9月18日(2000.9.18)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(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) 【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。

【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、異なる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

10

20

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。

【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。

10

【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。

20

【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 を含むことを特徴とする検定。

30

【請求項 12】

請求項 11 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、V5 エピトープであることを特徴とする検定。

【請求項 13】

請求項 12 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 . V5 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 14】

請求項 13 記載の検定であって、ここで HPV 16 . V5 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 15】

請求項 11 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 16】

請求項 15 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 17】

請求項 16 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

50

徴とする検定。

【請求項 18】

請求項 17 記載の検定であって、ここで 18 A 1 が蛍光物質で標識されることを特徴とする検定。

【請求項 19】

請求項 18 記載の検定であって、ここで 18 A 1 が HPV 16 . V 5 と関係して使用され、ここで HPV 16 . V 5 が、18 A 1 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 20】

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。

10

【請求項 21】

請求項 20 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 22】

請求項 21 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 23】

請求項 22 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。

20

【請求項 24】

請求項 20 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 25】

請求項 24 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 26】

請求項 25 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、18 A 1 モノクローナル抗体を含むことを特徴とする検定。

30

【請求項 27】

請求項 26 記載の検定であって、ここで 18 A 1 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 18 A 1 が、HPV 18 . J 4 と関係して使用され、ここで HPV 18 . J 4 が、18 A 1 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】

40

【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 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】

50

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】

【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。

【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エルを含み、ここでワクチンサンプルは、少なくとも1個のウエルに置かれ、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エルに置かれ、またここで第1および第2リガンドが、プレート内のウエルに加えられる。ワクチンサンプルを含むウエルは、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。

【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。

【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ち得る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関連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。

【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。

10

【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., ハパート, 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。

20

【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】

実施例A: HPV-16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HPV-16 VLP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。V5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HPV-16(VLP)表面でのV5構造的エピトープに指向され、一方18A1モノクローナル抗体は、分解または変性HPV-16 VLPsに主として存在する線状エピトープを認識する。このSOP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HPV-16切形VLP物質の免疫原性総合評価に用いられる。

30

【0015】

免疫原性のためのVLP表面でのV5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関連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HPV-16キャプシドタンパク質(L1)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(VLPs)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(HPV16.E70およびHPV16.V5)は真正HPV-16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L1配列からの3個のアミノ酸の突然変異、それぞれ50, 266および380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、E70またはV5モノクローナル抗体のいずれかで認

40

50

識できなかったVLPsで生じた。またこれらの突然変異より成るVLPs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50での単一V5エピトープアミノ酸の突然変異は、V5抗体のVLPへの結合の回復だけでなく、野生型生体内L1配列への類似の抗体応答を誘出するVLPの能力で生じた。

【0016】

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VLPsのいずれかに調合(吸着)されたHPV-16 VLPsで免疫原エピトープと結合する蛍光標識V5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。VLPsがリン酸アルミニウム粒子で調合された場合には、V5濾過平板形態検定は、選択の問題であった。この形態は96ウエ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(VLPs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時間胎仔ウシ血清アルブミン(BSA)で遮断した後に、粒子は洗浄され、蛍光標識V5または18A1モノクローナル抗体が加えられた(18A1抗体は、優先的にHPV-16 VLP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(PBS)で再懸濁され、平板は485nmの励起と530nm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。これは濾過平板バ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。

【0017】

V5濾過平板検定(DV-6363, 001版)は、リン酸アルミニウム調合HPV-16 VLPsでのV5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(V5)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(18A1)でプローブされ、これは調合VLP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)50µl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℃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。濾過平板検定の導入に先立ち、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。

【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℃水で解凍され、20mlの暖かい培地で希釈され、細胞は1,000×g, 10分の遠心分離で収穫された。上澄み

10

20

30

40

50

は廃棄され、細胞ペレットは新鮮常温培地 10 ml に再懸濁され、25 ml 組織培養フラスコで 37 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。

【0019】

中空繊維製造業者の指示に従って、約 $3 - 5 \times 10^7$ 細胞が遠心分離で収穫され、16 ml 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 125 ml 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、125 ml 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、500 ml および 1 L 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、1 L 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 x 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 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。

【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 個の領域、すなわちサンプル量の減少、反応ウエル当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。

【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 2.5 g / ウエルの濃度の標識 V5 または 18A1 で、5 または 2 g / ml (それぞれ 125 または 50 l / 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 IgG 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、18A1 または V5 抗体濃度が 2.5 μ g / ウエルであることを示している。表 2 は、2 μ g / ml 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 50 μ l (2 μ g / ウエル) に設定され、標準 V5 または 18A1 抗体水準は 2.5 μ g / ウエルに設定された。この実験で使用された V5 および 18A1 抗体のアレクサ (Alexa) - 488 標識水準は、それぞれ 4.3 と 1.1 であった。

【0022】

もとの V5 管法は、BSA に加えて、非特異的マウス IgG_{2a} を遮断薬として使用した。この第 2 遮断薬の追加は、BSA 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 AlPO₄ 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 96 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、BSA 単独、または BSA と濾過検定で遮断薬と希釈剤として使用される 10 μ g / ml の非特異的マウス IgG_{2a} を含む遮断薬の使用を比較する。この研究は HPV-16 調合抗原と、50 μ l (2 μ g / ウエル) サンプル量、および 2.5 μ 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 V5 および 18A1 抗体のアレクサ - 488 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 IgG_{2a} の除去は、各グル

10

20

30

40

50

ープからの複製物の%CV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IgG_{2a}を濾過平板ベースV5検定から省略することが決定された。

【0023】

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-488蛍光染料でのV5と18A1の標識水準であった。もともと我々は、V5または18A1の1mg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-488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-488-SE(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V5または18A1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、DV-5204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12.5mgのV5または18A1抗体が、販売者により注文包装された抗体とアレクサ-488-SE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、18A1およびV5それぞれのモル当たりとり込みの6.7および9.4モルの標識水準を生み出した。

10

【0024】

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、AlPO₄吸着HPV-16VLPs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、40μg/mlまたは4μg/mlで吸着され(また2μg/ウエルおよび0.2μg/ウエルで試験され)たVLPsが、バルクまたはバッチ標識されたV5および18A1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V5および18A1が40μg/mlと4μg/mlの物質の間で期待された信号の10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V5と18A1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V5は、40μg/ml AlPO₄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V5よりも約7倍高かった。

20

【0025】

類似の現象が、バルクおよびバッチ標識18A1抗体で観察された。このデータは表5で示される。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、バッチ: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40μg/mlの物質での6倍の信号の差が、同じように4μg/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

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のモル当たりアレクサ-488の4-9モルの許容カプリンク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たり2mgのIgGを標識したバ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

50

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 $AlPO_4$ (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。

10

【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)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 μ g/mlでのMED I - 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。

20

【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] $\mu\text{g/well}$	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 ₄ のみ(-)	627	616	
"	"	604		
(V5)5	HPV-16	4607	5899	27.8
"	"	7190		
"	AIPO ₄ のみ(-)	259	212	
"	"	165		
(V5)2.5	HPV-16	7430	5732	28.7
"	"	4033		
"	AIPO ₄ のみ(-)	261	200	
"	"	138		
(18A1)10	HPV-16	5656	7904	10.8
"	"	10151		
"	AIPO ₄ のみ(-)	531	733	
"	"	935		
(18A1)5	HPV-16	3173	5189	26.0
"	"	7204		
"	AIPO ₄ のみ(-)	187	200	
"	"	212		
(18A1)2.5	HPV-16	2427	4445	26.7
"	"	6462		
"	AIPO ₄ のみ(-)	181	167	
"	"	152		

10

20

表1. SBAS4調合HPV-16物質, ロットL98H072の5 $\mu\text{g/well}$ 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 $\mu\text{g/well}$ 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 $\mu\text{g/well}$ 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 ₄ のみ(-)	313	348	
“	“	382		
(V5)5	HPV-16	1934	1691	6.6
“	“	1448		
“	AIPO ₄ のみ(-)	186	258	
“	“	329		
(V5)2.5	HPV-16	2247	2361	12.0
“	“	2475		
“	AIPO ₄ のみ(-)	201	196	
“	“	191		
(18A1)10	HPV-16	3341	3466	8.5
“	“	3590		
“	AIPO ₄ のみ(-)	393	406	
“	“	419		
(18A1)5	HPV-16	2822	2808	12.2
“	“	2793		
“	AIPO ₄ のみ(-)	225	231	
“	“	237		
(18A1)2.5	HPV-16	1986	2260	13.5
“	“	2434		
“	AIPO ₄ 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 】

【表 3】

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	1657	1713	1564	204(11.9%)	11.4
“	1940				
“	1543				
RT1週保管	540	513	364	106(23.3%)	
“	397				
“	603				
A1PO ₄ 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				

10

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_{2a}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。

20

【 0 0 3 3 】

30

【 表 4 】

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 ₄ 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				

10

20

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 】

30

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

40

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 】

抗体	サンプル	平均修正信号	対照信号の%
アレクサ-488標識V5 (標準方法)	調合HPV-16, 未処理	399576	100
アレクサ-488標識V5 (標準方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	86295	22
10 μ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16, 未処理	118531	100
10 μ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	107670	91
20 μ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16, 未処理	104163	100
20 μ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16,1 mM PCMPS(30分.RT)	101317	97
25 μ g/ml V5未標識 (試験方法)	調合HPV-16, 未処理	122826	100
25 μ 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)と二次アレクサ-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。

【 0 0 3 6 】

実施例 B : H P V - 1 8 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 J 4 濾過平板検定に関し、これは H P V - 1 8 アルミニウム吸着モノバルク (A M B) での、また調合物質での J 4 エピトープの存在を測定する抗原性検定である。 J 4 モノクローナル抗体は、免疫原性に必要とされる H P V - 1 8 V L P での J 4 構造性エピトープに指向し、一方 1 8 A 1 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。 V L P 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。

【 0 0 3 7 】

実施例 A に記載された H P V - 1 6 のために開発された検定に類似した H P V - 1 8 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 A 1 O H 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 V 5 検定に類似した検定で潜在的に有用である H P V - 1 8 V L P 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、 J 4 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 R 5 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 (1 8 A 1) 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 H P V - 1 8 抗原性検定は、 J 4 および 1 8 A 1 モノクローナル抗体両方を利用する。 J 4 検定と平行して行なわれた、続く免疫原性研究は、 J 4 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。

【 0 0 3 8 】

J 4 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 H P V - 1 8 V L P s 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 (J 4) を使用する。更に物質は、調合 V L P 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 (1 8 A 1) 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 9 6 ウエル濾過平板を使用し、これに対し 2 g 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

10

20

30

40

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】

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A₂₈₀吸光度を使用して決定された。

【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3-5×10⁷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。

【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、PO₄緩衝液、pH6.8

10

20

30

40

50

で平衡化された。凍結収穫物質1管(～30ml)で解凍され、0.2m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、280nm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0-1MからのNaCl勾配(緩衝液A=10mM、 PO_4 、pH6.8;緩衝液B=10mM、 PO_4 +1M、NaCl、pH7.2)を使用して溶離され、典型的な溶離は18A1に対しては300-400mM、NaClの間で発生した。精製抗体は最終タンパク質濃度1-2mg/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-PBS)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(CGE)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100mlの400mM、 PO_4 、pH6.8、次いで120mlの1M、NaOHで2ml/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10ml/分のフローレートで400mM、 PO_4 、pH6.8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100mlの10mM、 PO_4 、pH6.8で洗浄され、RTで直立して保管された。

10

【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。

20

【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 μ g/mlまたは200 μ g/mlのいずれかで、37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。

30

【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(SCW971巻:59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。

40

【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)

50

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 μg および 0.2 μg 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 μg 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 μg 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 μg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チメロサル	2 μg	49%	111%	100%	100%	100%	100%	80%
未処理	0.2 μg			100%	100%	100%	60%	60%
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チメロサル	0.2 μg			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 OD 3 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1mμ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	2μg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
100 M PCMPs	2μg	2%	89%	90%	80%	50%	50%	40%
未処理	0.2μg			100%	100%	90%	70%	60%
100 M PCMPs	0.2μg			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℃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AlPO₄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(40μg/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。

【図5】 AlPO₄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。

【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。

【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。

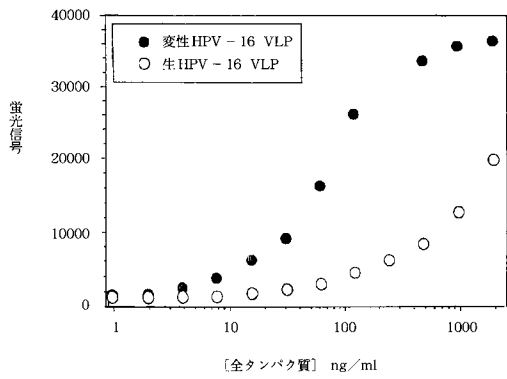
20

30

40

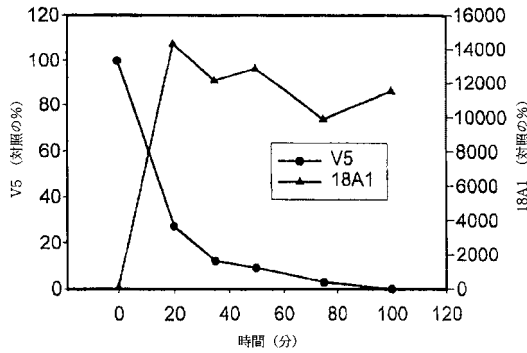
【 図 1 】

モノクローナル抗体 18A1 は変性抗原に選択的に結合する

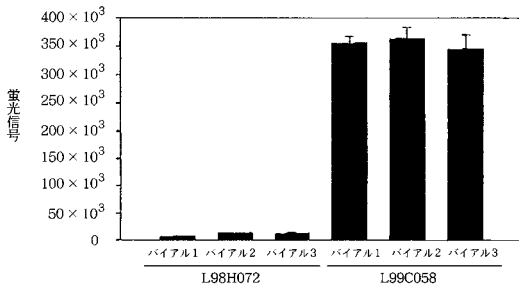


【 図 2 】

PCMPS の抗原性に対する効果



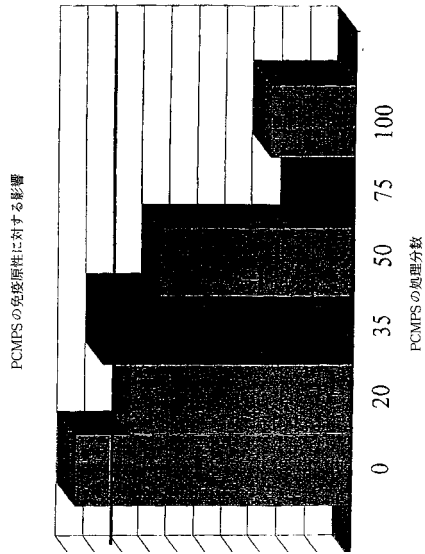
【 図 4 】



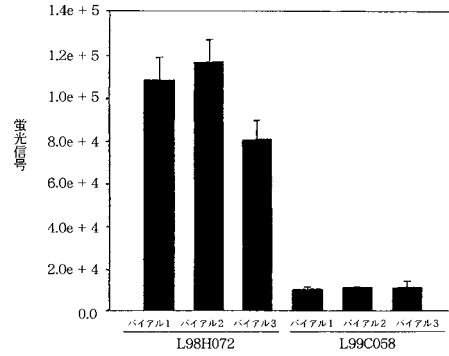
すべてのバイアルからの L98H072 の平均信号 (n = 9 サンプル) = 9366 + / - 1475 (sem)

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 】



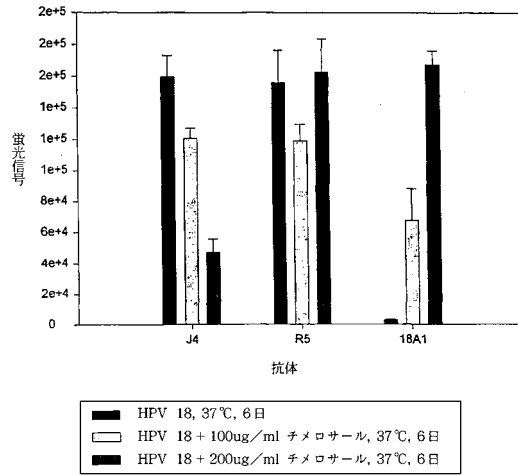
【 図 5 】



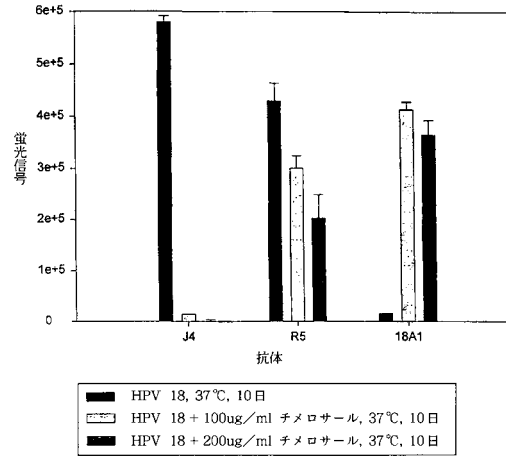
すべてのバイアルからの L98H072 の平均信号 (n = 9 サンプル) = 101471 + / - 11023 (sem)

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)

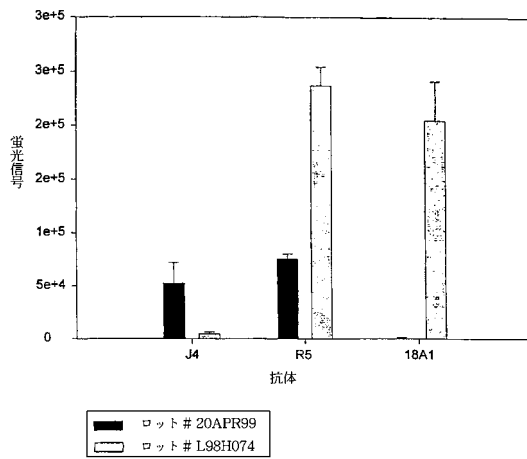
【図6】



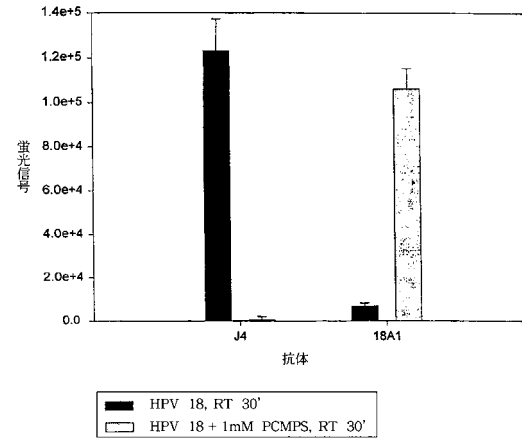
【図7】



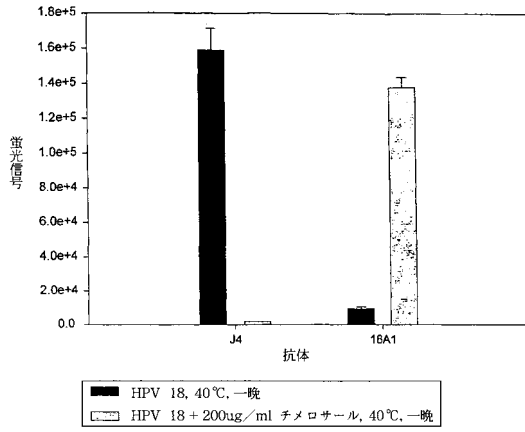
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

- (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 ウエイ 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. ボクス 41
1, 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 1
0717

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特表平09-508525(JP, A)
特開平03-282260(JP, A)
特表平08-507685(JP, A)
特表2001-515922(JP, A)
VIROLOGY, 1996年, Vol.223, p.174-184

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

C12Q 1/70

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	JP4746819B2	公开(公告)日	2011-08-10
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		
当前申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
[标]发明人	シェ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	シェナーマン, 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 C12Q1/70 A61K39/00 C07K16/08 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/084		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/70 A61K39/00.Z		
代理人(译)	丹羽浩之		
优先权	60/233439 2000-09-18 US		
其他公开文献	JP2004510144A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于测量疫苗免疫原性的测定法, 其中疫苗包含具有与疫苗的免疫原性活性形式相关的构象的表位和免疫原性失活形式的疫苗。含有相关构象的片段, 并且其中所述方法还包括: 第一配体, 其能够将疫苗样品与与疫苗的免疫原性活性形式相关的构象中的表位结合; 暴露于第二配体, 其能够结合与无活性形式相关的构象中的片段, 并测量与疫苗样品结合的第一配体的量与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	平均修正値	信号/雑音
(V5)10	HPV-16	4994	5406	8.8
"	"	5818		
"	AlPO ₄ のみ(-)	627	616	
"	"	604		
(V5)5	HPV-16	4607	5899	27.8
"	"	7190		
"	AlPO ₄ のみ(-)	259	212	
"	"	165		
(V5)2.5	HPV-16	7430	5732	28.7
"	"	4033		
"	AlPO ₄ のみ(-)	261	200	
"	"	138		
(18A1)10	HPV-16	5656	7904	10.8
"	"	10151		
"	AlPO ₄ のみ(-)	531	733	
"	"	935		
(18A1)5	HPV-16	3173	5189	26.0
"	"	7204		
"	AlPO ₄ のみ(-)	187	200	
"	"	212		
(18A1)2.5	HPV-16	2427	4445	26.7
"	"	6462		
"	AlPO ₄ のみ(-)	181	167	
"	"	152		