

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 513986

(P2003 - 513986A)

(43)公表日 平成15年4月15日(2003.4.15)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	2 G 0 5 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02		1/68	A 4 B 0 6 3
1/68			Z 4 B 0 6 4
		G 0 1 N 21/78	C 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 26数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 537363(P2001 - 537363)

(86)(22)出願日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月10日(2002.5.10)

(86)国際出願番号 PCT/US00/30940

(87)国際公開番号 W001/034652

(87)国際公開日 平成13年5月17日(2001.5.17)

(31)優先権主張番号 09/438,895

(32)優先日 平成11年11月12日(1999.11.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 バイオメリュー・インコーポレイテッド  
B I O M E R I E U X , I N C .  
アメリカ合衆国27712ノースカロライナ州ダ  
ーラム、ロドルフ・ストリート100番

(72)発明者 マンガラセリル・ジー・サーンガダラン  
アメリカ合衆国22101バージニア州マクリ  
ン、ホリー・リーフ・ドライブ8422番

(72)発明者 ラナジット・パル  
アメリカ合衆国20878メリーランド州ゲイ  
ーズバーグ、ベイリッジ・テラス901番

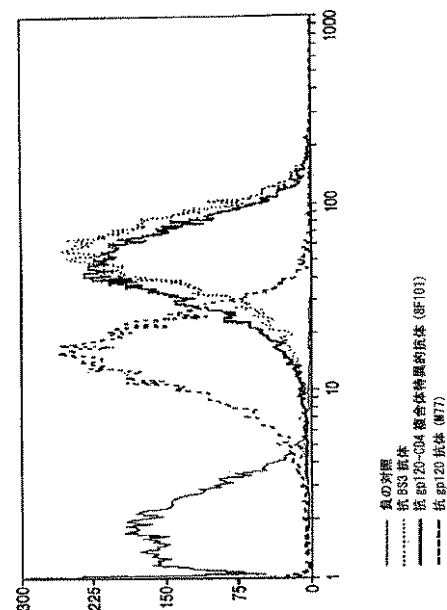
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 架橋剤に対する抗体およびその使用方法

(57)【要約】

本発明は、特定の架橋剤に結合したタンパク質または核酸とは反応するが遊離の架橋剤または遊離のタンパク質または核酸とは反応しない抗体の発見に関する。そのような結合特異性を有するモノクローナル抗体は、レセプター-リガンド結合、免疫診断、分子増幅アッセイおよび他の核酸診断において広範囲の応用を有する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 B S 3もしくはD S Sで修飾したタンパク質または核酸には特異的に結合するが、遊離のB S 3もしくは遊離のD S Sまたは非修飾タンパク質または核酸とは結合しないモノクローナル抗体。

【請求項2】 7 E 3 - 2 E 7、2 C 3 - 2 E 1 0、1 2 G 9 - 2 C 5および1 1 F 2 - 2 F 7よりなる群から選ばれる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 B S 3またはD S Sへの共有結合によって修飾した核酸分子。

【請求項4】 診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブである、請求項3に記載の核酸分子。

【請求項5】 レセプター - リガンド結合のアッセイ法であって、  
( a ) B S 3またはD S Sを目的リガンドに結合させ、  
( b ) 該B S 3またはD S Sで修飾したリガンドを該リガンドのレセプターを発現する細胞と反応させ、  
( c ) 結合したB S 3またはD S S修飾リガンド / レセプターを、標識した抗B S 3 / D S Sモノクローナル抗体と反応させ、ついで  
( d ) 該標識した抗体と該レセプター / リガンドとの間に生成した複合体上の標識を検出することを含む方法。

【請求項6】 レセプター - リガンド結合のアッセイ法であって、  
( a ) B S 3またはD S Sを目的リガンドに結合させ、  
( b ) 該B S 3またはD S Sで修飾したリガンドを該リガンドのレセプターを発現する細胞と反応させ、  
( c ) 結合したB S 3またはD S S修飾リガンド / レセプターを、抗B S 3 / D S Sモノクローナル抗体、ついでF I T Cにコンジュゲートした抗マウスI g Gと反応させ、ついで  
( d ) 該結合したF I T C - コンジュゲート抗体をフローサイトメトリーまたは免疫蛍光により検出する

ことを含む方法。

【請求項7】 該リガンドがg p 1 2 0であり、該レセプターがC D 4である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 核酸増幅の生成物の検出方法であって、

- (a) 遊離のNH<sub>2</sub>基を含むN T PをB S 3またはD S Sで標識し、
- (b) 該標識したN T Pを増幅反応混合物に用い、ついで
- (c) 増幅反応の終わりに増幅生成物を抗B S 3 / D S S抗体と反応させ、その際、該抗体はそれ自体検出可能な残基で標識されているか、または該抗B S 3 / D S S抗体を該抗体に結合する標識抗体と反応させ、それによって増幅生成物を検出する

ことを含む方法。

【請求項9】 該増幅反応が等温転写ベースの増幅反応であり、該N T Pがr N T Pである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 該増幅反応がN A S B Aである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 核酸配列の検出方法であって、該配列の相補的領域を有するプローブとハイブリダイズさせることを含み、その際、該プローブがB S 3またはD S Sで標識した核酸配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項12】 B S 3またはD S Sが標識であることを特徴とする、標識抗原または標識抗体を用いたイムノアッセイ。

【請求項13】 抗原の混合物中の目的抗原の検出方法であって、

- (a) 試料中の抗原をB S 3またはそのアナログで修飾し、
- (b) 該修飾した抗原を、I g A抗B S 3抗体である捕捉抗体と反応させ、
- (c) 結合した抗原を、目的抗原に特異的なI g G抗体と反応させ、ついで
- (d) 標識抗I g G抗体と反応させることにより、結合したI g Gを検出し、それによって目的抗原を検出する

ことを含む方法。

【請求項14】 該I g A抗体が7 E 3 - 2 E 7である、請求項13に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(技術分野)**

本発明は、特定の架橋剤に結合したタンパク質または核酸とは反応するが遊離の架橋剤または遊離のタンパク質または核酸とは反応しない抗体の発見に関する。そのような結合特異性を有するモノクローナル抗体は、レセプター-リガンド結合、免疫診断、分子増幅アッセイおよび他の核酸診断において広範囲の応用を有する。

**【0002】****(背景技術)**

DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル) は、非開裂性、膜透過性でアミン反応性のホモ2官能性の架橋剤である。BS3 (スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル]) は、非開裂性、膜非透過性 (membrane impregnable) で水溶性のDSSのアナログである。2つの2官能性のスルホ-NHSエステル反応性基により、BS3 (およびDSS) はアミノ基を有する分子間で架橋試薬として機能することができる。BS3およびDSS化合物はPierce (ロックフォード、イリノイ) によりタンパク質架橋試薬として販売されている。これら化合物は、ある距離 (すなわちスペーサーアーム長) 内にあるそのような分子は架橋するであろうが、そうでない場合は必ずしも該分子を架橋することなく修飾するであろう。それゆえ、BS3およびDSSは分析対象物の標識として用いることができる。

**【0003】**

たとえばジゴキシゲニンによるタンパク質および核酸のそのような修飾は当該技術分野で知られている。一般にジゴキシゲニンは生分析アッセイにおいて標識として用いられており、その際、ジゴキシゲニンはジゴキシゲニン標識した分析対象物の検出のためにそれ自体が放射性標識されるか、またはたとえばハプテンとして機能して抗ハプテン抗体と反応する。米国特許第3,855,208号; 同第5,198,537号; および同第5,804,371号を参照。

**【0004】**

ジゴキシゲニンおよびその誘導体はまた核酸診断の分野でも用いられており、

その場合、一般にジゴキシゲニンまたはその誘導体は増幅単位 (amplificates) またはプローブ中に標識として導入され、それによって標識残基はハプテンと抗ハプテンとの反応の原理によって検出される。たとえば米国特許第5,354,657号;同第5,843,670号;同第5,929,108号;および同第5,344,757号を参照。

#### 【0005】

(発明の開示)

(発明が解決しようとする技術的課題)

しかしながら、ジゴキシゲニン系には欠点がある。第一に、ジゴキシゲニンで誘導体化する手順は比較的複雑である。第二に、ジゴキシゲニンが大きな分子で疎水性のステロイドを含んでいるため、ジゴキシゲニンによる分子の修飾は該分子のコンホメーションをかき乱すであろう。第三に、ジゴキシゲニンは、たとえばBS3と比較して比較的高価である。

#### 【0006】

それゆえ、多数の誘導体化の工程を必要とせず、安価で修飾すべき分子のコンホメーションを破壊することの一層少ない簡単な生分析検出系に対する必要性が存在する。多くの観点でジゴキシゲニン系に匹敵する系が、今や予期せず見出された。この系はジゴキシゲニンと同様にして用いることができる。

#### 【0007】

(その解決方法)

本発明は、BS3修飾したgp120-CD4複合体に対して産生させたハイブリドーマにより産生されるある種のモノクローナル抗体が、実際にBS3リンカー自体に向けられたものであったという発見の結果である。これら抗体は遊離のBS3分子単独とは反応せず、異なる結合特異性を示す。たとえば、これら抗体のうちの幾つかのものは、修飾したタンパク質中のアミノ酸残基とBS3分子との間に形成された「ヒンジ」と反応するように思われる。これら抗体は、DSG (Pierce) やDTSSP (DS Sと類似であるがメチレン鎖の中央にS-S架橋を有する分子) などの他の架橋剤で処理したタンパク質と交差反応することが予想される。他のモノクローナル抗体は、BS3分子の2つの末端スルホスクシ

ンイミジル基の間に存在する直線状の炭素鎖と反応する。それゆえ、そのようなモノクローナル抗体はまた、D S S 修飾した（または架橋した）タンパク質とも反応することが予想され、おそらくはまたD M P、D M A、D S G およびM S A（すべてPierceより販売）などの他の架橋剤で修飾したタンパク質とも反応することが予想される。なぜなら、これらは同じ長いメチレン鎖を含むからである。

【0008】

本発明のモノクローナル抗体は、E L I S A などの診断イムノアッセイにおいて有用である。本発明のモノクローナル抗体はまた、リガンド - レセプターの研究においても有用である。最後に、B S 3 / 抗B S 3 系は核酸増幅アッセイのための検出系として使用できることも考えられる。実際、これら抗ハプテン抗体は、ジゴキシゲニン / 抗ジゴキシゲニンなどの当該技術分野で知られた他のハプテン / 抗ハプテン系と同様にして用いることができる。

【0009】

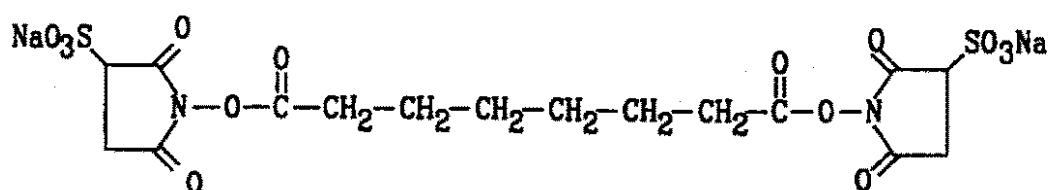
（発明を実施するための最良の形態）

本発明の抗体を参照する際の「抗B S 3」なる語は、これら抗体がB S 3 修飾した分子とのみ反応性であることを意味するのではなく、上記で説明したようにタンパク質または核酸を修飾するのに用いた他の知られた架橋剤とも反応することがあることを意味する。さらに、本明細書において「B S 3 修飾した」とは、上記で本発明の抗体と交差反応性であると言及した他の架橋剤で修飾した分子を包含する。B S 3 とD S S とは互いに極めて類似しているため、本発明で特に好ましい。

【0010】

B S 3（スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル]）は、2つの2官能性スルホ - N H S エステル反応性基を含む架橋剤である。以下の化学式を参照。

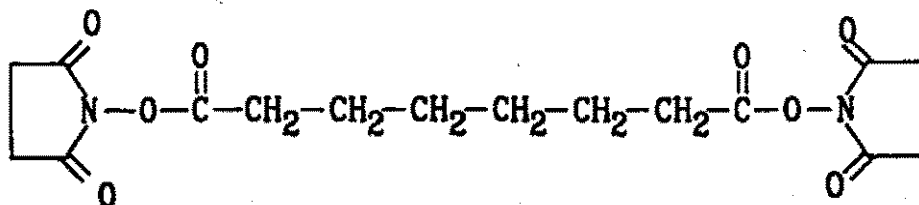
【化1】



## 【0011】

DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル) は、BS3の水不溶性のアナログであり、下記化学式を有する。

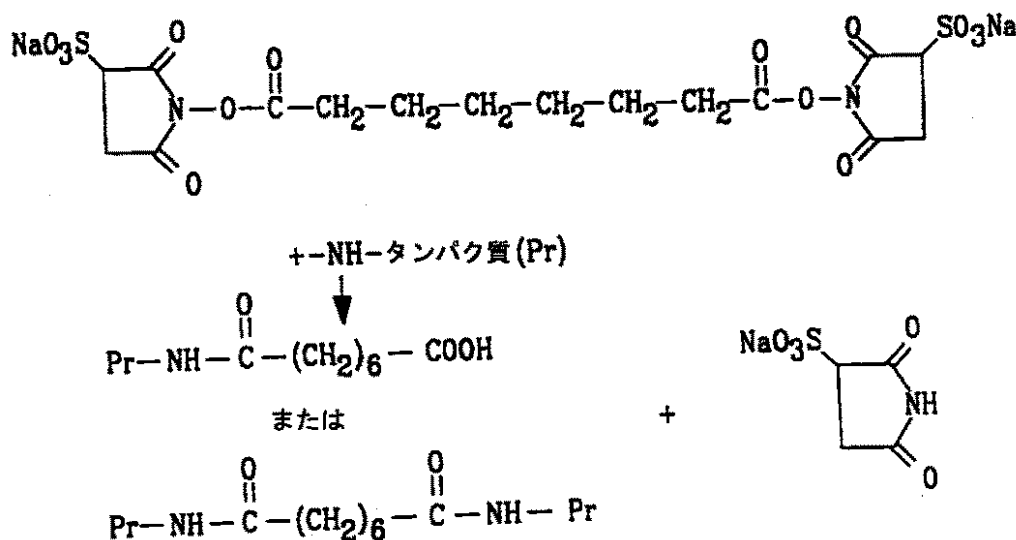
## 【化2】



## 【0012】

これら架橋剤がアミノ基を含む分子と反応すると、該架橋剤分子の両末端にあるスクシンイミジル基が開裂して架橋すべき2つの分子間かまたは修飾した分子から延びて本質的に6炭素原子の脂肪酸を残す。このことは以下に模式的に示すことができる。

## 【化3】



## 【0013】

HIVが関与する研究では、BS3はHIV-1のgp120エンベロープタンパク質と可溶性のヒトCD4との複合体を架橋するのに用いた。ついで、この共有結合架橋した複合体に特異的なモノクローナル抗体(mAb)を産生する目的で該複合体を用いてマウスを免疫した。免疫したマウスからは幾つかの複合体

特異的なモノクローナル抗体が得られたが、該複合体のBS3成分に特異的な幾つかのIgGおよびIgAハイブリドーマが産生された。興味深いことに、これらモノクローナル抗体のいずれもgp120、sCD4(可溶性CD4)または遊離のBS3と反応性ではなかった。反応性はアミノ基に結合したBS3に特異的であった。

#### 【0014】

好ましい態様において、本発明は独特の特異性を有するモノクローナル抗体を分泌する4つのマウスハイブリドーマに関する。タンパク質をBS3で化学修飾するとタンパク質中またはBS3中のエピトープを暴露させる結果となり、このものがこれら抗体に対して強い免疫反応性を示した。これらモノクローナル抗体のうちの1つはIgAであり(「7E3-2E7」と称する)、他の3つはIgGであった(「2C3-2E10」、「12G9-2C5」および「11F2-2F7」)。これらモノクローナル抗体はgp120-CD4以外のタンパク質と結合したBS3と反応し、それゆえアッセイ分野において広い有用性を有する。

#### 【0015】

これら抗体を産生するハイブリドーマは上記モノクローナル抗体と同じ表示を有し、4つの全てのハイブリドーマはブダペスト条約の規定の下、ATCC(マナッサス、バージニア、米国)に1999年11月11日に寄託され、以下の表示を与えられた:「7E3-2E7」についてはPTA-936、「2C3-2E10」についてはPTA-934、「12G9-2C5」についてはPTA-935および「11F2-2F7」についてはPTA-937。

#### 【0016】

IgA(7E3-2E7)モノクローナル抗体は5つの結合部位を有するために特に独特で好ましい。それゆえ、この抗体はイムノアッセイにおいてシグナルを増幅することができる。この抗体はまた、2抗体系において捕捉抗体としても特に有用である。すなわち、抗BS3 IgAは試料中の全てのBS3修飾抗原に対する捕捉抗体として用いることができる。捕捉した特定の抗原に特異的なIgGプローブ抗体を加えることができる。ついで、標識した抗IgGデテクター

抗体を加えることができ、このものはIgA捕捉抗体には結合しないであろう。

【0017】

他のモノクローナル抗体を当該技術分野でよく知られた方法により作製してよい。たとえば、HarlowおよびLane、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(1988)、ISBN 0-87969-314-2(参照のため本明細書に引用する)を参照。そのような方法における免疫原は架橋剤修飾した分子であろう。さらに、「抗体」なる語は、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントなどのフラグメント、またはたとえば遺伝子工学により修飾した他の抗体フラグメントをも包含することを意図している。

【0018】

タンパク質分析対象物のアッセイのためには、遊離のアミノ基をたとえば実施例1に記載する仕方でBS3と反応させることができる。標識したら、これらタンパク質は抗BS3抗体で検出ことができ、該抗BS3抗体はBS3のメチレンスペーサーまたは該タンパク質とBS3分子との間の「ヒンジ」(すなわち、C=O基を含む部分)と特異的に結合するであろう。これら抗体自体は通常の標識、たとえば酵素、蛍光、発色団、金属粒子または放射性標識で標識ことができ、または標識した抗IgAまたは抗IgG抗体を用いて検出することができる。

【0019】

本質的に、抗原アッセイの分野でジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン系を用いることが可能な方法であれば、いずれもBS3/抗BS3を用いることができる。この観点から、米国特許第3,855,208号、同第5,804,371号および同第5,843,670号(ジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン系を用いた種々のアッセイが開示されている)を参照のため本明細書に引用する。

【0020】

一つの態様において、BS3/抗BS3系は2つの抗体(捕捉抗体とデテクター抗体)を用いた診断イムノアッセイにおいて有用である。これらアッセイでは、デテクター抗体をBS3で処理し、未反応のBS3はすべてブロックする。捕

捉抗体によって捕捉された抗原に結合しBS3でコンジュゲートされた抗体を、HRPなどの標識を含む抗BS3抗体により認識することができる。このアッセイ系は、2つのマウスモノクローナル抗体と二次抗マウス抗体-酵素コンジュゲートを用いたELISAよりも感度が増大している。なぜなら二次抗体はまた固相上の捕捉抗体とも反応するからである。本発明のIgA抗体に関しては上記をさらに参照。

#### 【0021】

抗BS3モノクローナル抗体の核酸診断との関連性は、検出試薬としてのものである。BS3はアミノ基を有するdNTPまたはrNTPと反応性であるので、タンパク質の標識/架橋に用いたのと同じ化学プロセスを用いることができる。ヌクレオチドをBS3で修飾した後も該ヌクレオチドは核酸増幅反応においてモノマーとして機能することができ、その結果得られる生成物は抗BS3モノクローナル抗体と反応性であろう。ついで、結合した抗体は適当に標識した第二の抗体を用いるかまたは抗BS3抗体に標識を直接導入することにより検出することができる。本質的に、ジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン系を用いることが可能なDNA検出法であれば、いずれもBS3/抗BS3を用いることができる。この観点から、米国特許第5,843,670号、同第5,198,537号、同第5,354,657号、同第5,843,670号、同第5,929,108号および同第5,344,757号に開示された核酸検出アッセイを参照のため本明細書に引用する。

#### 【0022】

本発明のこの観点から、BS3とのdGTPモノマー複合体を作製し、ついで該複合体をポリC鋳型上でのインビトロトランスクリプターゼ反応に用いた。生成物をニトロセルロースに移し、抗BS3を用いたウエスタンブロットタイプの分析で分析した。この方法により生成物を首尾よく検出でき、(1) dGTPをBS3で標識できること、および(2) 修飾したdGTPが逆転写のための反応性モノマーとして機能しうることが示された。

#### 【0023】

これらモノクローナル抗体を用いた核酸診断システムにおいて幾つかの形式の

ものが考えられる。第一に、BS3修飾したNTP（アミノ基を含むもの、あるいはアミノ基を含むように修飾したもの）を増幅反応（PCR、NASBAなど）におけるモノマーとして用いることができる。モノマーはアンプリコン（増幅単位）中に導入され、ついでこれを抗BS3抗体で検出することができる。第二に、NASBAなどの転写ベースの増幅反応においてP2プライマーで5'末端を修飾することができ、これはモノクローナル抗体と組み合わせる一般的な捕捉法となりうる。

#### 【0024】

第三は、既知の捕捉プローブの5'末端の修飾および該捕捉プローブを表面に結合させる手段としての粒子または固体基体の間のリンカーに対するモノクローナル抗体を用いることである。第四に、核酸をBS3（または他の交差反応性架橋剤）で標識し、ハイブリダイゼーションのためのプローブとして用いることができる。アッセイすべき核酸の検出は、該核酸をプローブとハイブリダイズさせて核酸ハイブリッドを形成させ、遊離のプローブを系から除き、ついで該ハイブリッドに含まれる標識を検出することにより行うことができる。本発明ではBS3標識の検出は酵素結合抗BS3抗体を用いて行うことができる。アッセイすべき核酸は、通常、使用前にメンブレンまたはニトロセルロース上に固定化する。

#### 【0025】

本発明の核酸検出法におけるハイブリダイゼーションのためには、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、サザンまたはノーザンハイブリダイゼーションなどを含む通常のハイブリダイゼーション法を用いることができる。アッセイすべき核酸はDNAかまたはRNAのいずれであってもよい。核酸プローブもまたDNAかRNAのいずれであってもよい。

本発明のモノクローナル抗体の他の一層洗練された使用も当業者には明らかであろう。

#### 【0026】

本発明のモノクローナル抗体はまた、分子のカラム精製に用いることができる点でも一層優れている。たとえば、抗BS3カラムを用いてBS3（または他の

交差反応性の架橋剤) 修飾したタンパク質/核酸をその混合物から精製することができる。さらに、たとえば2つのマウスモノクローナル抗体を用いるイムノアッセイ系では複合体形成の検出のために標識した抗マウス抗体を用いることができない。しかしながら、これらマウス抗体の一つをBS3で標識し、ついで標識した抗BS3抗体で検出することができる。

#### 【0027】

以下の実施例は本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 実施例1:

##### BS3修飾タンパク質と反応するモノクローナル抗体の調製

BS3特異的抗体を分泌するハイブリドーマを、BS3で架橋したHIV-1 gp120-CD4複合体で免疫したマウスから単離した。HIV-1<sub>gp120</sub>単離物からの精製gp120と組換え可溶性CD4との等モル量をPBS中、37度60分間インキュベートした。BS3のストック溶液(5mM)を蒸留水中で調製した。そのようなインキュベーション後に生成した物理的に会合した複合体を、BS3を最終濃度0.5mMで加えることにより架橋した。この溶液を室温で30分間インキュベートし、未反応のBS3をトリス緩衝液(pH8.0)を最終濃度50mMで加えることによりブロックした。

#### 【0028】

5匹のマウスを完全フロイントアジュバント中のBS3標識gp120-CD4複合体(20µg/マウス)で免疫した。その後の免疫を、被験動物がgp120およびCD5に対する高力価の抗体応答を展開するまで不完全フロイントアジュバント中で投与した。これら免疫動物からの脾臓リンパ球をNS1細胞と融合し、そのような融合から得られたハイブリドーマを、架橋していないgp120-CD4複合体およびBS3架橋したgp120-CD4複合体に対してスクリーニングした。BS3架橋した複合体と特異的に反応するそのようなハイブリドーマの単一細胞クローニングから、以下に示す4つの安定なハイブリドーマが単離された。

#### 【0029】

表1

ハイブリドーマクローン	イソ型
7E3-2E7	I g A
2C3-2E10	I g G 1
12G9-2C5	I g G 1
11F2-2F7	I g G 1

## 【0030】

これらハイブリドーマからの上澄み液を、BS3架橋したgp120-CD4複合体および架橋していないgp120-CD4複合体に対する免疫反応性について種々の希釈でELISAにより試験した。その結果(450nmでの光学密度として表してある)を以下に示す。

表2

ハイブリドーマクローン	以下の希釈でBS3架橋gp120-CD4複合体と反応させたハイブリドーマ上澄み液			以下の希釈で非架橋gp120-CD4複合体と反応させたハイブリドーマ上澄み液		
	希釈せず	1:1	1:10	希釈せず	1:1	1:10
7E3-2E7	>3.00	>3.00	>3.00	0.125	0.108	0.105
2C3-2E10	2.741	2.728	2.486	0.125	0.120	0.095
12G9-2C5	2.644	>3.00	2.885	0.095	0.097	0.086
11F2-2F7	2.824	>3.00	2.728	0.252	0.104	0.091

上記に示す結果から、これらハイブリドーマクローンから分泌される抗体がBS3架橋gp120-CD4複合体と特異的に反応し、非架橋複合体とは反応性を有しないことが明らかである。

## 【0031】

これら抗体がBS3で標識した他のタンパク質と反応するか否かを決定するため、PBS中のドライミルクの5%溶液をELISAプレート上にコーティングした。タンパク質を37℃で60分間結合させた後、ウェルを室温で30分間、0.5mM BS3で処理した。ついで、未反応のBS3を上記と同様にトリス緩衝液でブロックし、ウェルを上記4つのハイブリドーマクローンからの上澄み液および非BS3抗体を分泌するハイブリドーマ(8F10-2E11)と反応させた。下記に示すように、4つの全ての上澄み液がBS3修飾したドライミルク

タンパク質との強い反応性を示した。しかしながら、予期されたように、非BS3抗体との反応性は観察されなかった。

### 【0032】

表3

PBS中のBS3修飾した5%ドライミルク溶液 (Blotto) に対する抗BS3抗体の免疫反応性

ハイブリドーマ クローン	各2つの種々の希釈のハイブリドーマ上澄み液のELISA反応性 (光学密度450nm)				
	希釈せず	1:1	1:20	1:200	1:2000
7E3-2E7	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	0.406
	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	0.383
2C3-2E10	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	1.574
	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	1.611
12G9-2C5	>3.00	2.683	1.417	0.284	0.090
	2.803	2.774	1.160	0.236	0.079
11F2-2F7	>3.00	>3.00	0.812	0.138	0.067
	>3.00	>3.00	0.857	0.141	0.068
DMEM 培地 (負の対照)	0.052 0.052	試験せず	試験せず	試験せず	試験せず
関連のない ハイブリドーマ (8F101) (負の対照)	0.170 0.169	試験せず	試験せず	試験せず	試験せず

### 【0033】

#### 実施例2：

#### 抗BS3抗体の応用：

##### 1. レセプター - リガンド結合研究

BS3 / 抗BS3系はレセプター - リガンド結合アッセイの分野で有用に応用できるであろう。そのようなアッセイは、固相ELISAフォーマットおよび細胞表面の両者で行うことができる。細胞表面上での結合アッセイでは、BS3結合したリガンドが該リガンドのレセプターを発現する細胞と反応させられるであろう。ついで、細胞表面へのBS3標識リガンドの結合は、抗BS3モノクローナル抗体に続いてFITCにコンジュゲートした抗マウスIgGを用いて検出されるであろう。抗体にコンジュゲートしたFITCの細胞表面への結合は、フロ

ーサイトメトリーかまたは免疫蛍光アッセイのいずれかにより検出することができる。BS3結合したリガンドを用いたそのようなアッセイの一例を以下に記載する。

#### 【0034】

HIV-1 gp120の細胞表面上のそのレセプターCD4への結合を、抗BS3抗体を用いて調べた。精製したgp120タンパク質をPBS中の0.5 mM BS3と室温で30分間インキュベートすることによりBS3で標識した。未反応のBS3をトリス緩衝液(pH8.0)を最終濃度50 mMで加えることによりブロックした。ついで、標識タンパク質をSup T1細胞と4で30分間インキュベートした。Sup T1細胞は細胞表面上に高レベルのCD4を発現することが示されており、HIV-1感染に対して極めて感受性である。ついで細胞をPBSで洗浄し、抗BS3抗体と4で30分間反応させた。

#### 【0035】

細胞表面への抗BS3抗体の結合を、FITCコンジュゲートしたヤギ抗マウス抗体を用いて検出した。図1は、sup T1細胞膜へのBS3標識gp120の結合に関するFACSプロファイルを示す。sup T1細胞への非修飾gp120の結合もまた比較のために調べた(図2)。これら図面から、CD4へのBS3標識gp120の結合が、モノクローナル抗体8F101によって認識される複合体特異的なエピトープを暴露させることが明らかである。この実験はさらに、BS3によるgp120の修飾が該糖タンパク質の結合特異性に対して影響を及ぼさないことを示している。さらに、抗V3ループモノクローナル抗体(M77)もまた、細胞表面に結合したBS3標識gp120と反応した。

#### 【0036】

レセプターリガンド結合はまた、BS3/抗BS3系を用いた固相ELISAによっても行うことができる。このアッセイではレセプターを固相プラスチック表面上に吸着させ、ついでBS3標識リガンドと反応させることができる。レセプターへのBS3標識リガンドの結合の検出は、抗BS3抗体に続いてHRP-コンジュゲートヤギ抗マウス抗体を用いて行うことができる。

#### 【0037】

### 実施例3：

#### 免疫診断アッセイ

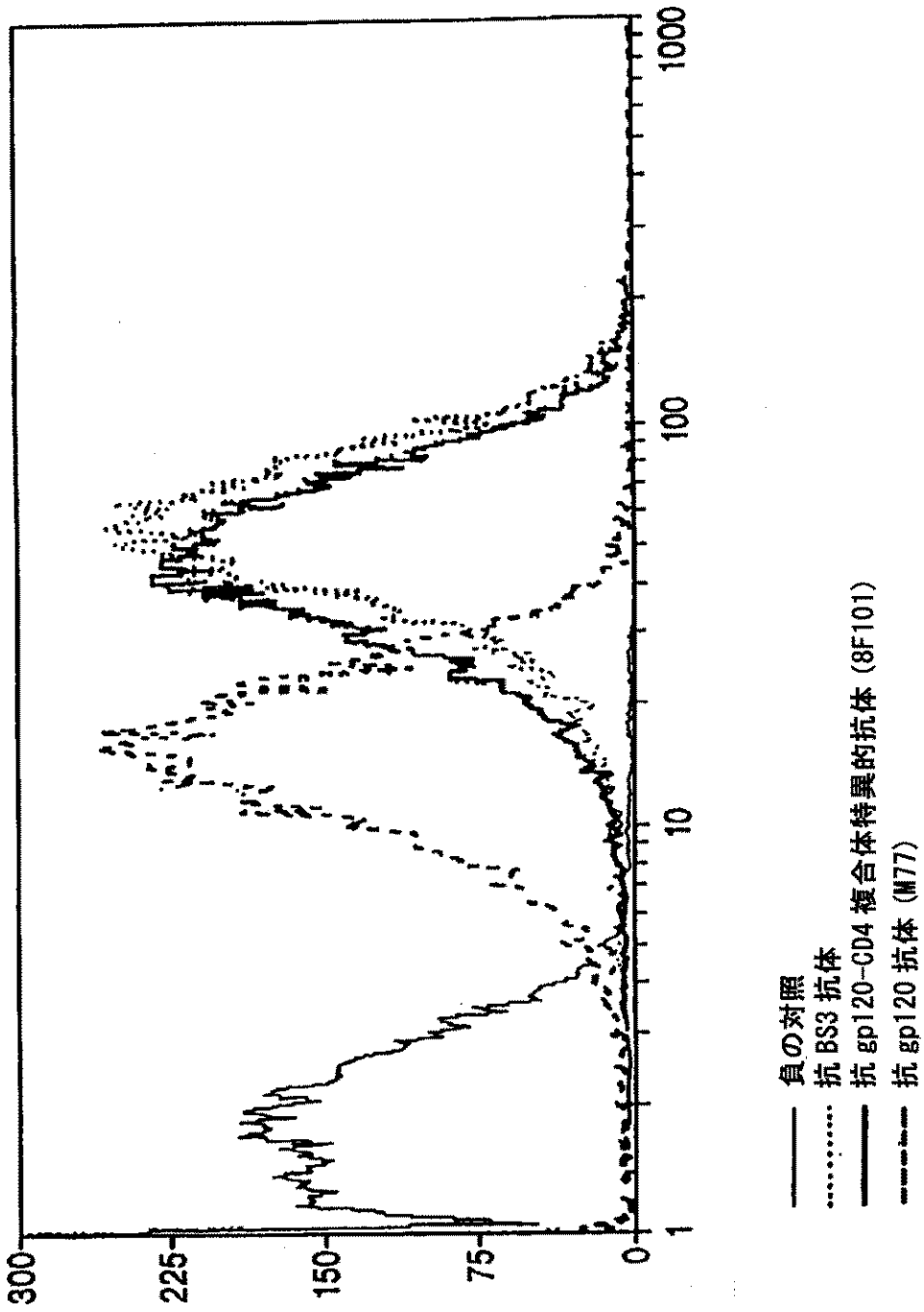
B S 3 / 抗 B S 3 系の他の有用性は、2つの抗体検出系を用いる免疫診断アッセイの領域であろう。このアッセイでは、プレート上にコーティングした捕捉抗体を用いて検出すべき抗原を捕捉するであろう。B S 3 標識デテクター抗体が、捕捉抗体によってプレート上に捕捉された抗原と反応させられるであろう。ついで、H R P などの標識をコンジュゲートさせた抗 B S 3 は、抗原に結合した B S 3 標識デテクター抗体を認識することができる。それゆえ、抗 B S 3 抗体を用いることにより2つのマウス抗体を同時に用いたアッセイをデザインすることができるであろう。B S 3 標識デテクター抗体を用いた抗原捕捉アッセイは、2つのマウスモノクローナル抗体および二次抗マウス抗体 - 酵素コンジュゲートを用いた E L I S A に比べて感度が増大しているであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

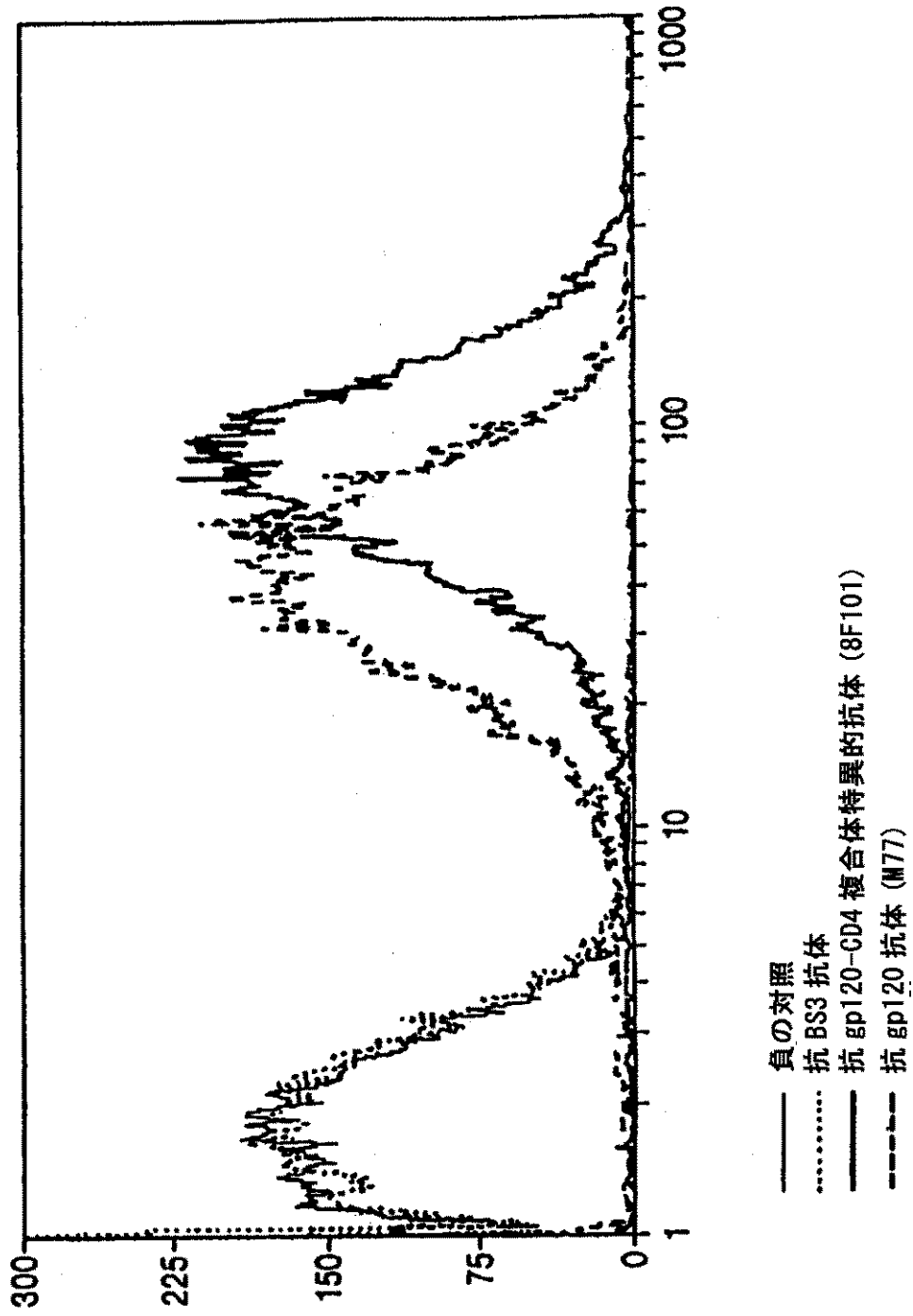
【図1】 s u p T 1 細胞膜への B S 3 標識 g p 1 2 0 の結合に関する F A C S プロフィールを示す。

【図2】 s u p T 1 細胞への非修飾 g p 1 2 0 の結合に関する F A C S プロフィールを示す。

【図1】



【図2】



**【手続補正書】****【提出日】**平成14年5月28日(2002.5.28)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** B S 3もしくはD S Sで修飾したタンパク質または核酸には特異的に結合するが、遊離のB S 3もしくは遊離のD S Sまたは非修飾タンパク質または核酸とは結合しないモノクローナル抗体。

**【請求項2】** ハイブリドーマ7 E 3 - 2 E 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 9 3 6 ) によって產生された7 E 3 - 2 E 7、ハイブリドーマ2 C 3 - 2 E 1 0 ( A T C C 受託番号 P T A - 9 3 4 ) によって產生された2 C 3 - 2 E 1 0、ハイブリドーマ1 2 G 9 - 2 C 5 ( A T C C 受託番号 P T A - 9 3 5 ) によって產生された1 2 G 9 - 2 C 5、およびハイブリドーマ1 1 F 2 - 2 F 7 ( A T C C 受託番号 P T A - 9 3 7 ) によって產生された1 1 F 2 - 2 F 7よりなる群から選ばれる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項3】** レセプター-リガンド結合のアッセイ法であって、

- ( a ) B S 3またはD S Sを目的リガンドに結合させ、
- ( b ) 該B S 3またはD S Sで修飾したリガンドを該リガンドのレセプターを発現する細胞と反応させ、
- ( c ) 結合したB S 3またはD S S修飾リガンド/レセプターを、標識した抗B S 3 / D S Sモノクローナル抗体と反応させ、ついで
- ( d ) 該標識した抗体と該レセプター/リガンドとの間に生成した複合体上の標識を検出することを含む方法。

**【請求項4】** レセプター-リガンド結合のアッセイ法であって、

- ( a ) B S 3またはD S Sを目的リガンドに結合させ、

(b) 該BS3またはDSSで修飾したリガンドを該リガンドのレセプターを発現する細胞と反応させ、

(c) 結合したBS3またはDSS修飾リガンド/レセプターを、抗BS3/DSSモノクローナル抗体、ついでFITCにコンジュゲートした抗マウスIgGと反応させ、ついで

(d) 該結合したFITC-コンジュゲート抗体をフローサイトメトリーまたは免疫蛍光により検出する

ことを含む方法。

【請求項5】 該リガンドがgp120であり、該レセプターがCD4である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 核酸増幅の生成物の検出方法であって、

(a) 遊離のNH<sub>2</sub>基を含むNTPをBS3またはDSSで標識し、

(b) 該標識したNTPを増幅反応混合物に用い、ついで

(c) 増幅反応の終わりに増幅生成物を抗BS3/DSS抗体と反応させ、その際、該抗体はそれ自体検出可能な残基で標識されているか、または該抗BS3/DSS抗体を該抗体に結合する標識抗体と反応させ、それによって増幅生成物を検出する

ことを含む方法。

【請求項7】 該増幅反応が等温転写ベースの増幅反応であり、該NTPがrNTPである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 該増幅反応がNASBAである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 抗原の混合物中の目的抗原の検出方法であって、

(a) 試料中の抗原をBS3またはそのアナログで修飾し、

(b) 該修飾した抗原を、IgA抗BS3抗体である捕捉抗体と反応させ、

(c) 結合した抗原を、目的抗原に特異的なIgG抗体と反応させ、ついで

(d) 標識抗IgG抗体と反応させることにより、結合したIgGを検出し、それによって目的抗原を検出する

ことを含む方法。

【請求項10】 該IgA抗体が7E3-2E7である、請求項9に記載の

方法。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/30940
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/44 G01N33/53 C12N15/11 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 843 454 A (PAL RANAJIT ET AL) 1 December 1998 (1998-12-01)  column 4, line 44 -column 6, line 7 example 2  ---	1,2, 5-10,13, 14
X	WO 99 02266 A (AKZO NOBEL NV ;DAMME HENDRIK SIBOLT VAN (NL); KREUWEL HERMANUS JOH) 21 January 1999 (1999-01-21) claims 14-16; example 2  ---	3,4,11, 12
X	US 5 922 534 A (LICHTENWALTER KAY) 13 July 1999 (1999-07-13) claims 11,17  ---	3,4,11, 12
X	US 5 747 244 A (RUNNING JOYCE ET AL) 5 May 1998 (1998-05-05) column 2, line 42 - line 67  ---	3,4,11, 12
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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. *B* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  12 February 2001		Date of mailing of the international search report  20/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  von Ballmoos, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/30940

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DEVICO A L ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES RAISED AGAINST COVALENTLY CROSSLINKED OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 GP120 AND CD4 RECEPTOR IDENTIFY A NOVEL COMPLEX-DEPENDENT EPITOPE ON GP120" VIROLOGY,US,ACADEMIC PRESS,ORLANDO, vol. 211, no. 2, 20 August 1995 (1995-08-20), pages 583-588, XP000578383 ISSN: 0042-6822 abstract page 583, last paragraph -page 584, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
A	<p>US 5 559 039 A (DOW CORNING CORPORATION) 24 September 1996 (1996-09-24) claims 1,4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/30940

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5843454 A	01-12-1998	AU 680916 B	14-08-1997
		AU 6907394 A	12-12-1994
		CA 2160922 A	24-11-1994
		EP 0699077 A	06-03-1996
		JP 8510246 T	29-10-1996
		US 6030772 A	29-02-2000
		WO 9426305 A	24-11-1994
		US 5518723 A	21-05-1996
WO 9902266 A	21-01-1999	AU 724382 B	21-09-2000
		AU 8863298 A	08-02-1999
		EP 1050588 A	08-11-2000
		EP 0975427 A	02-02-2000
		JP 2000515251 T	14-11-2000
US 5922534 A	13-07-1999	NONE	
US 5747244 A	05-05-1998	AT 191237 T	15-04-2000
		AU 3427693 A	28-07-1993
		CA 2125145 A	08-07-1993
		DE 69230864 D	04-05-2000
		DE 69230864 T	09-11-2000
		EP 0620864 A	26-10-1994
		JP 7502656 T	23-03-1995
		WO 9313224 A	08-07-1993
		US 5712383 A	27-01-1998
		US 5559039 A	24-09-1996
US 5545317 A	13-08-1996		

## フロントページの続き

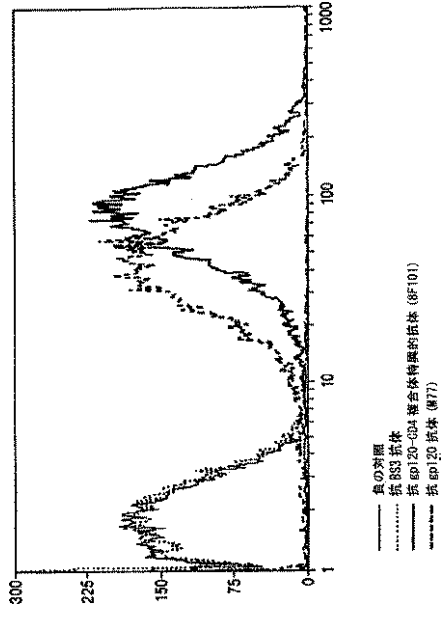
(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 33/53	M
	33/53		N
		33/536	S
	33/536		A
		33/566	D
	33/566	33/577	B
	33/577	C 1 2 P 21/08	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 アンソニー・エル・デビコ  
 アメリカ合衆国22304バージニア州アレキ  
 サンドリア、ピーコック・アベニュー4533  
 番

Fターム(参考) 2G054 AA10 BB20 CA22 CA23 CA30  
 EA03 GA04  
 4B024 AA11 CA09 HA14 HA15  
 4B063 QA18 QA19 QQ43 QR56 QR62  
 QR77 QS25 QS33 QS34 QX02  
 4B064 AG27 DA13  
 4H045 AA11 AA30 DA76 EA50

【要約の続き】



专利名称(译)	抗交联剂的抗体及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003513986A</a>	公开(公告)日	2003-04-15
申请号	JP2001537363	申请日	2000-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	主要生物有限公司刘 生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物主刘，公司		
[标]发明人	マンガラセリルジーサーンガダラン ラナジツパル アンソニーエルデビコ		
发明人	マンガラセリルジーサーンガダラン ラナジツパル アンソニーエルデビコ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/536 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/44 Y10S530/809		
FI分类号	C07K16/44 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/53.N G01N33/53.S G01N33/536.A G01N33/536.D G01N33/566 G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G054/AA10 2G054/BB20 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA30 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	09/438895 1999-11-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及发现与结合到特定交联剂的蛋白质或核酸反应但不与游离交联剂或游离蛋白质或核酸反应的抗体的发现。具有这种结合特异性的单克隆抗体在受体-配体结合，免疫诊断，分子扩增测定和其他核酸诊断中具有广泛的应用。

