

(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2011-523860

(P2011-523860A)

(43) 公表日 平成23年8月25日(2011.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 A	4 B 0 6 4
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577 B	4 H 0 4 5
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 C	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-513505 (P2011-513505)	(71) 出願人 510326795 チェン シュリン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 539 フレモント ウォーム スプリン グス ブールバード 47853
(86) (22) 出願日 平成21年6月12日 (2009.6.12)	
(85) 翻訳文提出日 平成23年2月8日 (2011.2.8)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2009/003538	
(87) 国際公開番号 W02009/151633	
(87) 国際公開日 平成21年12月17日 (2009.12.17)	(74) 代理人 100147485 弁理士 杉村 憲司
(31) 優先権主張番号 12/456,054	(74) 代理人 100119530 弁理士 富田 和幸
(32) 優先日 平成21年6月10日 (2009.6.10)	(74) 代理人 100144266 弁理士 鈴木 一寿
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(72) 発明者 チェン シュリン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 539 フレモント ウォーム スプリン グス ブールバード 47853 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号 61/131,991	
(32) 優先日 平成20年6月13日 (2008.6.13)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 12/456,053	
(32) 優先日 平成21年6月10日 (2009.6.10)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

(54) 【発明の名称】 HPVタンパクに対する新規なモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明の実施形態は、HPV感染、および様々なHPV遺伝子型、初期および/もしくは後期段階の、HPV関連またはHPV特異性の癌による感染を含むHPVに関連する癌の診断を検出する方法、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、分析ならびにキットを提供する。特異的なHPVタンパク質またはHPV型に特異的なエピトープ、様々なHPVタンパク質またはHPV型の共通のエピトープを認識する様々なモノクローナル抗体を得る。得られるモノクローナル抗体は、HPV感染の初期の臨床的検出およびHPVに関連する疾患の一般的な検出、侵襲的子宮頸癌の特異的な検出、他のHPVに関連する癌初期段階の前癌病変ならびに後期段階の癌進行の検出において有効な手段である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

2 個以上のヒトパピローマウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体の生成方法であって、

2 個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質で抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングする工程を含み、このスクリーニング工程は、2 個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応で、非 HPV タンパク質に陰性反応で抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択する工程を含み、抗体生成ハイブリドーマ細胞が、2 個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成する方法。

10

【請求項 2】

2 個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、HPV 16 E 6 タンパク質、HPV 16 E 7 タンパク質、HPV 16 L 1 タンパク質、HPV 18 E 6 タンパク質、HPV 18 E 7 タンパク質、HPV 18 L 1 タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

異なる HPV 型から 2 個以上の HPV ウイルス性タンパク質に結合でき、2 個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質で抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得られるモノクローナル抗体であって、前記スクリーニング工程は、2 個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応で、非 HPV タンパク質に陰性反応で抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択する工程を含み、抗体生成ハイブリドーマ細胞が、2 個以上の HPV ウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するモノクローナル抗体。

20

【請求項 4】

モノクローナル抗体は HPV 16 E 7 および HPV 18 E 7 タンパク質に結合できる請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

モノクローナル抗体は HPV 16 E 6 および HPV 18 E 6 タンパク質に結合できる請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

モノクローナル抗体は HPV 16 L 1 および HPV 18 L 1 タンパク質に結合できる請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 7】

モノクローナル抗体は、初期 HPV ウイルス性タンパク質および後期 HPV ウイルス性タンパク質に異なる HPV 型から結合でき、1 個の HPV 型からの精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質、および他の HPV 型からの精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質をスクリーニングすることによって得られ、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質に陽性反応で、非 HPV タンパク質に陰性反応で抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択する請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項 8】

モノクローナル抗体は、HPV 16 E 6、HPV 16 E 7、HPV 16 L 1、HPV 18 E 6 および HPV 18 E 7 のタンパク質の全てに結合できる請求項 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体は、HPV 16 E 6、HPV 16 E 7、HPV 16 L 1、HPV 18 E 6、HPV 18 E 7 および HPV 18 L 1 タンパク質の全てに結合できる請求項 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

モノクローナル抗体は、ELISA（抗原捕捉免疫測定法）、パピローマウイルス性タ

50

ンパク質の抗原分析、パピローマウイルス性タンパク質に対する抗体の抗体分析、パピローマウイルス性免疫複合体に関する分析、タンパク質チップ分析、放射免疫沈降分析、迅速膜放射免疫沈降分析、迅速スティック免疫クロマトグラフィー、組織および/または子宮頸部細胞に関する免疫組織化学、フローサイトメトリによる免疫化学分析およびそれらの組み合わせからなる群から選択される1個以上の免疫学的分析で用いる請求項3に記載の方法。

【請求項11】

同じHPV型から2個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合できるモノクローナル抗体。

【請求項12】

モノクローナル抗体は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質で抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得られ、前記スクリーニング工程は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応で、非HPVタンパク質に陰性反応で抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択する工程を含み、抗体生成ハイブリドーマ細胞が、2個以上のHPVウイルス性タンパク質に特異的に結合できるモノクローナル抗体を生成する請求項11に記載のモノクローナル抗体。

【請求項13】

2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は同じHPV型からである請求項12に記載のモノクローナル抗体。

【請求項14】

2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は異なるHPV型からである請求項12に記載のモノクローナル抗体。

【請求項15】

2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV16 L1タンパク質、HPV18 E6タンパク質、HPV18 E7タンパク質、HPV18 L1タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択する請求項12に記載のモノクローナル抗体。

【請求項16】

2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質の各々は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質であり、モノクローナル抗体が2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に対応する、2個以上の精製組み換え型HPV初期タンパク質に結合できる請求項12に記載のモノクローナル抗体。

【請求項17】

2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質であり、モノクローナル抗体が精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質に対応する、初期ウイルス性タンパク質および後期ウイルス性タンパク質に結合できる請求項12に記載のモノクローナル抗体。

【請求項18】

モノクローナル抗体は、HPV16 E6およびHPV16 E7ウイルス性タンパク質の両方に結合できる請求項11に記載のモノクローナル抗体。

【請求項19】

モノクローナル抗体は、HPV16 E6、HPV16 E7およびHPV16 L1ウイルス性タンパク質の全てに結合できる請求項11に記載のモノクローナル抗体。

【請求項20】

モノクローナル抗体は、HPV18 E6およびHPV18 E7ウイルス性タンパク質の両方に結合できる請求項11に記載のモノクローナル抗体。

【請求項21】

モノクローナル抗体は、高リスクHPV型、低リスクHPV型、HPV-16、HPV

10

20

30

40

50

- 18, HPV - 31, HPV - 33, HPV - 35, HPV - 39, HPV - 45, HPV - 51, HPV - 52, HPV - 56, HPV - 58, HPV - 59 および HPV - 68, HPV - 6, HPV - 11, HPV - 42, HPV - 43, HPV - 44, HPV - 53, HPV - 54, HPV - 55 および HPV - 56 ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される同じ HPV 型からの 2 個以上の HPV ウイルス性タンパク質に結合できる請求項 11 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 22】

モノクローナル抗体は、ELISA (抗原捕捉免疫測定法)、パピローマウイルス性タンパク質に関する抗原分析、パピローマウイルス性タンパク質に対する抗体の抗体分析、パピローマウイルス性免疫複合体に関する分析、タンパク質チップ分析、放射免疫沈降分析、迅速膜放射免疫沈降分析、迅速スティック免疫クロマトグラフィー、組織および/または子宮頸部細胞に関する免疫組織化学、フローサイトメトリによる免疫化学分析およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 個以上の免疫学的分析に用いる請求項 11 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 23】

第 1 HPV ウイルス性タンパク質のみに結合でき、第 1 HPV ウイルス性タンパク質とは異なる第 2 HPV ウイルス性タンパク質には結合せず、第 1 HPV 型から第 1 精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応で、第 2 HPV 型からの第 2 精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陰性反応で抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得られるモノクローナル抗体であって、第 1 および第 2 のウイルス性タンパク質は、第 1 および第 2 の HPV 型の、第 1 および第 2 の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に対応するモノクローナル抗体。

20

【請求項 24】

第 1 のウイルス性タンパク質は、HPV 16 E6 タンパク質、HPV 16 E7 タンパク質、HPV 16 L1 タンパク質、HPV 18 E6 タンパク質、HPV 18 E7 タンパク質、HPV 18 L1 タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 23 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 25】

モノクローナル抗体は、高リスク HPV 型、低リスク HPV 型、HPV - 16, HPV - 18, HPV - 31, HPV - 33, HPV - 35, HPV - 39, HPV - 45, HPV - 51, HPV - 52, HPV - 56, HPV - 58, HPV - 59 および HPV - 68, HPV - 6, HPV - 11, HPV - 42, HPV - 43, HPV - 44, HPV - 53, HPV - 54, HPV - 55 および HPV - 56、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される HPV 型から第 1 HPV ウイルス性タンパク質に結合できる請求項 23 に記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 26】

モノクローナル抗体は、ELISA (抗原捕捉免疫測定法)、パピローマウイルス性タンパク質に関する抗原分析、パピローマウイルス性タンパク質に対する抗体の抗体分析、パピローマウイルス性免疫複合体に関する分析、タンパク質チップ分析、放射免疫沈降分析、迅速膜放射免疫沈降分析、迅速スティック免疫クロマトグラフィー、組織および/または子宮頸部細胞に関する免疫組織化学、フローサイトメトリによる免疫化学分析、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 個以上の免疫学的分析に用いる請求項 23 に記載のモノクローナル抗体。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願明細書は、2008年6月13日に開示された米国仮出願特許第61/131991号明細書および2008年9月22日に開示された米国仮出願特許第61/192912号明細書の利益を要求する。前述した各関連明細書は、参照して全体に組み込むものとする。

50

【背景技術】

【0002】

上皮特異細胞での上皮の増殖を誘起するヒトパピローマ（乳頭腫）ウイルス（HPV）による感染は、子宮頸癌に対して重要な役割を果たす。約99パーセントの確認された子宮癌は、生検確認した扁平上皮病変（SIL）または子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）を有するHPV感染に関連する。約1%の人口は陰部疣贅を有し、女性の約4%は、軽度の扁平上皮内病変（LSIL）もしくは重度の扁平上皮内病変（HSIL）または異型扁平上皮細胞（ASCUS）等の子宮頸癌前駆病変を有する。一般的には、ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染は、子宮頸癌前駆病変の発達に関して重要であると考えられている。LSILを有する女性に対して高リスクなHPVの感染は、HSILに進行することがある。事実、いくつかはHSILまで進行するが、LSILヒト対象の多くが寛解する。99.7%の子宮頸癌はHPV陽性であるが、宿主遺伝子内へのウイルス遺伝子の統合は、HSILまたは癌へ進行する発現に重要な遺伝子を促進するために必要である。持続HPV感染した10人の女性のうち1人だけが、子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）グレード2およびグレード3（それぞれCIN2, CIN3）等の重度のCIN病変に進行し、これらの内皮病変の場合の一部は最終的に子宮頸癌に進行する。

10

【0003】

過去において、子宮頸癌のスクリーニングは、細胞染色法に関するパパニコロー（パップ）スメアを得る等の従来の細胞学的スクリーニングに基づき、疑わしいスメアは、腸内視鏡検査および/または組織学的生検で検査する。しかし、主観的試験基準のために、パップスメア試験には様々な欠点があり：サンプル獲得の困難性、観測者内同意、高確率の偽陰性および偽陽性、高度な訓練を受けた特別な研究員の必要性、および多くのHPV感染ヒト対象の特定の不可能性である。より再現可能な分析が現在のスクリーニングテストを改良して、感染した女性の不必要な医学的介入および精神的苦痛をなくす必要がある。

20

【0004】

「DNA Hybrid Capture」等の核酸試験によるHPV感染の検査は、高感度の分析で発展したが、高コストの分析操作手順、設備および高度な訓練の研究員だけでなく、子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）試験サンプルにおける非常に低い陽性予測値のために、まだ理想的でない。Pre Tect HPV-Proofer（登録商標）等の分析は、高い陽性予測値のHPV Hybrid Capture試験と等しい高感度でE6/E7 mRNAの検出を提供するが；E6/E7癌タンパクをin situで直接検出できない。加えて、DNA試験は、HPV感染後の疾患段階を識別できず、また、異なる細胞病変の診断もできない（例えば、HSILとLSILの識別ができず、また、非形質転換の潜在または寛解ウイルス感染からCIN病変を識別できない）。臨床検査質または医局の繰り返しの練習で行うことができ、初期の内皮病変を検出し、LSILをHSILと識別でき、または子宮頸癌への進行の危険性を予測することができる、低コスト、簡単、高感度および特異的な分析が必要である。

30

【0005】

モノクローナル抗体の生成の既知のプロトコールは、概して、抗HPVモノクローナル抗体の生成に適切でなく、一般集団のヒト対象に行う免疫組織化学的診断試験において用いることができない。これは、これらのプロトコールによって生成した抗体が感染したヒト細胞における自然発生的なHPVウイルスタンパクに必ずしも反応しないからである。加えて、これらの問題は、臨床的HPV検出に存在する。一つは、臨床サンプルにおけるHPVタンパク質は非常に少ない量である。第2に、臨床サンプルにおいて存在する多くのHPV型およびほとんどのHPV型は、利用可能な抗体がないため、わかっていなく、合成的に識別できない。したがって、抗HPV抗体を生成する免疫原として多量に精製した利用可能なHPVたんぱくがなく、臨床HPV検出に対する臨床サンプルにおいて存在する抗ウイルス抗体またはウイルスタンパク質を認識する利用可能なHPVタンパク質または精製した抗HPV抗体がない。

40

【0006】

50

たった約15種類のHPV型による感染(100以上の利用可能なHPV型のうちの1つ)は、高リスクで子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)または子宮頸癌に進行する。それらのうち、報告された約70%の子宮頸癌および報告されたCIN2およびCIN3の50%は、2つの高リスクHPV型、すなわち、HPVタイプ16およびHPVタイプ18によって起こる。しかし、いくつかの進行性子宮頸癌の場合は、低リスクのHPV型によって感染したと報告されているが、いくつかの高リスクのHPV型の感染は、子宮頸癌に決して進行しない。これらの2個の一般的な高リスクHPV型による感染は、腫瘍成長または癌の進行に関連しない。高リスク型によるHPV感染を特定するだけでなく特定の発癌タンパク質を発現するそれらのHPV感染ヒト対象を特定するのが重要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、これらの発癌タンパク質は、高いグレードの細胞病変もしくは子宮頸癌に関連する疾患に発展するリスクを予測する子宮頸癌バイオマーカーとして機能するため、臨床サンプルにおけるHPVに関連する発癌タンパク質の発現を検出する必要がある。また、子宮頸癌バイオマーカーとしての侵襲性子宮頸癌および/またはHPVに関連する発癌タンパク質の存在を検出し、また、子宮頸癌となる内皮病変の悪性転換に対するリスクを予測する抗HPV抗体および適切なHPV免疫学的分析を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の実施形態は、概して、一般的なHPV感染症および様々なHPV遺伝子型、高リスクHPVおよび低リスクHPVによる感染等のHPV感染を検出するのに有効な、様々な方法、検出分析、キット、ポリクローナルおよびモノクローナル抗HPV抗体、ポリペプチド、組み換え型HPVタンパク質および核酸に関連するものとする。バイオマーカーとして有効およびHPVウイルスタンパク質を検出するツールとして有効な、HPVタンパク質に対する様々な新規のモノクローナル抗体、HPV発癌タンパク質、子宮頸癌の初期スクリーニングおよびCIN、形成異常、および/または浸潤子宮頸癌および他の癌の診断を提供する。本発明のツールはまた、HPV感染に関する初期臨床検出、および子宮頸癌および他の癌の一般的な診断、浸潤子宮頸癌の特異的な検出、他のHPVに関連する癌、初期段階の前癌病変および晩期の癌進行の検出においても用いることができる。

【0009】

モノクローナル抗体の生成方法は、様々なHPVタンパク質またはHPV型、例えばpan抗HPV抗体の中のHPVタンパク質の1個以上の一般的なエピトープを認識するモノクローナル抗体を得るために提供する。加えて、本願明細書で得られるいくつかのモノクローナル抗体は、HPV型特異性であるが、本願明細書で得られるいくつかのモノクローナル抗体は、非HPV型特異性である。非HPV特異性pan抗体は、臨床サンプルにおいて存在する最も一般的なHPV型からHPVタンパク質を認識および結合する。本発明のいくつかの態様において、これらのpanモノクローナル抗体の結合能は、1個以上の臨床サンプルにおけるHPV感染を検出する1個の便利な分析において用いるのに適切である。他の態様において、2個以上のHPV免疫学的分析も用いることができる。他の態様において、単一のHPVタンパク質に特異的な抗HPV抗体(1個のHPV型からの1個のタンパク質だけであり、他のHPV型、他のHPVタンパク質ではない)も得ることができる。

【0010】

本発明の一つの実施形態は、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマをスクリーニングすることによって得られるモノクローナル抗体を提供する。このスクリーニング工程は、2個およびそれ以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質に陽性反応を示し、非HPVタンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマを選択して、抗体生成ハイブリドーマ細胞が2個以上のヒトパピローマウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成

10

20

30

40

50

するようにする工程を有する。様々なHPVに関連する抗体には、1個のHPV遺伝子型または2個以上の遺伝子型からの初期遺伝子および/または後期遺伝子によってコードした1個以上のHPVタンパク質に対して特異性を示すポリクロナルおよびモノクローナル抗体も含む。本願明細書に記載する抗体は、異なるヒト対象に対する免疫学的分析を行い、また、陽性および陰性対照を比較するのに用いることができる。

【0011】

一つの実施形態において、モノクローナル抗体は、第1HPV型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2HPV型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得られ、モノクローナル抗体が同じまたは異なるHPV型からヒトパピローマウイルス性タンパク質上の共通のエピトープを認識できるようにする。他の実施形態において、第1HPV型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2HPV型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得て、モノクローナル抗体が他の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質ではなく、第1および第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質のうち1個のみの特異的なエピトープを認識できるようにする、モノクローナル抗体を提供する。

10

【0012】

他の実施形態において、同じHPV型からの2個以上のHPVウイルス性タンパク質を結合することができるモノクローナル抗体を提供し、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得る。2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質は、同じHPV型および/または異なるHPV型からのものであり、抗体生成ハイブリドーマ細胞が、同じ型からの2個以上のヒトパピローマウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するようにする。2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質であり、モノクローナル抗体が2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質に対応する2個以上のHPV初期タンパク質に結合できるようにする。2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質を有し、モノクローナル抗体が精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質に対応する初期ウイルス性タンパク質および後期ウイルス性タンパク質に結合できるようにする。

20

30

【0013】

他の実施形態において、異なるHPV型からの2個以上のHPVタンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を提供する。このモノクローナル抗体は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得られ、スクリーニング工程は、異なるHPV型からの2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応を示し、非HPVタンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択し、抗体生成ハイブリドーマ細胞が、2個以上のウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するようにする工程を有する。

40

【0014】

さらに他の実施形態において、異なるHPV型からの初期HPVウイルス性タンパク質および後期HPVウイルス性タンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を提供する。さらに他の実施形態において、第1HPVウイルス性タンパク質だけでなく第1HPVウイルス性タンパク質からの第2HPVウイルス性タンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を提供し、第1HPV型からの第1精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応を示し第2HPV型からの第2精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングす

50

ることによって得られ、第1および第2ウイルス性タンパク質は、第1および第2HPV型の第1および第2精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に対応する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】図1Aは、本発明の一つの実施形態に従ったEIA（酵素免疫測定）で分析したときの、HPV16 E6およびHPV16 E7組み換え型タンパク質（同じHPV型からの異なるHPVタンパク質）の両方に反応でき、同じHPV16型からの異なるHPV16 E6およびHPV16 E7タンパク質上の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図1B】図1Bは、本発明の一つの実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV16 E6およびHPV16 E7組み換え型タンパク質の両方に反応でき、HPV16 E6およびHPV16 E7タンパク質上の共通のエピトープを認識できる他のモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図2A】図2Aは、本発明の一つの実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV16 E6, E7, L1およびL1 N末端組み換え型タンパク質（同じHPV型からの異なるHPVタンパク質）に反応でき、同じHPV16型からのHPV16 E6, E7, L1およびL1 N末端タンパク質上の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図2B】図2Bは、図2Bにおいて示すモノクローナル抗体のウエスタンブロットを示す図であり、全てのHPV16 E6, E7およびL1組み換え型タンパク質への結合を確認する。

【図2C】図2Cは、図2Aにおいて示したモノクローナル抗体を用いた子宮癌細胞株からの細胞溶解物のウエスタンブロットの結果を示す図であり、これらの子宮頸癌細胞株において存在する全てのHPV16 E6, E7およびL1組み換え型タンパク質への結合を確認する。

【図3A】図3Aは、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、全ての組み換え型HPV16 E6, E7, L1 N末端タンパク質およびHPV18 E6およびE7タンパク質（異なるHPV型からのHPVタンパク質）に結合することができ、HPV16およびHPV18からのE6, E7, L1 N末端タンパク質上の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図3B】図3Bは、図3Aにおいて示したモノクローナル抗体のウエスタンブロットの結果を示す図であり、異なる組み換え型タンパク質への結合および異なるHPV型であるHPV16およびHPV18からの異なるE6, E7, L1-N末端タンパク質上の共通のエピトープの認識を確認する。

【図3C】図3Cは、図3Aにおいて示したモノクローナル抗体を用いた子宮頸癌細胞株からのウエスタンブロット細胞溶解物を示す図であり、これらの子宮頸癌細胞株において存在するHPV16 E6, E7およびL1タンパク質およびHPV18 E6, E7およびL1-N末端ウイルス性タンパク質への結合を確認する。

【図4A】図4Aは、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、2個のE6組み換え型タンパク質（HPV16 E6およびHPV18 E6, 異なるHPV型からのE6タンパク質）に結合することができ、異なるHPV型からの2個のE6タンパク質上の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図4B】図4Bは、図4Aにおいて示したモノクローナル抗体を用いた子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を分析するウエスタンブロットの結果を示す図であり、これらの子宮頸癌細胞株において存在するHPV16 E6およびHPV18 E6ウイルス性タンパク質への結合を確認する。

【図5】図5は、EIAで分析したときの、2個の組み換え型HPV16 E7およびHPV18 E7タンパク質（異なるHPV型からのE7タンパク質）に反応することができ、異なるHPV型からの2個のE7タンパク質上の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、本発明の一つの実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV16 E6組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV組み換え型タンパク質にも反応することができるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図7A】図7Aは、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV18 E6組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV16またはHPV18組み換え型タンパク質にも特異的に反応することができるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図7B】図7Bは、図7Aにおいて示したモノクローナル抗体を用いた異なる子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を分析するウエスタンブロットの結果を示す図であり、HeLa癌細胞株において存在するHPV16 E6ウイルス性タンパク質だけでなくHPV E7ウイルス性タンパク質への結合を確認する。

10

【図8】図8は、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV16 E7組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV組み換え型タンパク質にも特異的に反応することができるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図9】図9は、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV18 E7組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV組み換え型タンパク質にも特異的に反応することができるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図10A】図10Aは、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV16 L1 N末端組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV組み換え型タンパク質にも特異的に反応することができるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

20

【図10B】図10Bは、EIAで分析したときの、HPV16 L1 N末端組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV組み換え型タンパク質にも特異的に反応することができる他のモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図11】図11は、本発明の他の実施形態に従ったEIAで分析したときの、HPV16 L1およびL1 N末端組み換え型タンパク質だけでなくいずれの他のHPV組み換え型タンパク質にも特異的に反応することができるモノクローナル抗体の特異性を示す図である。

【図12A】図12Aは、本発明の一つの実施形態に従った免疫組織細胞化学染色(IHC)分析における、抗E6モノクローナル抗体を用いたCIN2組織の形成異常細胞の染色画像を示す図である。

30

【図12B】図12Bは、本発明の他の実施形態に従った図12AのCIN2サンプルの形成異常組織から隣接した正常上皮形態の染色画像を示す図である。

【図12C】図12Cは、IHC分析において図12Aにおいて用いたのと同じ抗E6モノクローナル抗体によって染色したCIN3サンプルの形成異常内皮の染色画像を示す図であり、本発明の他の実施形態に従った抗E6モノクローナル抗体による核および形成異常細胞における特異的なIHC染色を実証する。

【図12D】図12Dは、IHC分析において図12Aにおいて用いたのと同じ抗E6モノクローナル抗体によって染色した他のCIN3サンプルの形成異常細胞の染色画像を示す図である。

40

【図13A】図13Aは、本発明の他の実施形態に従った免疫組織細胞化学染色(IHC)分析における、抗E7モノクローナル抗体を用いた組織マイクロアレイからの扁平上皮癌(SCC)組織の染色画像を示す図である。

【図13B】図13Bは、図13AのSCC組織に隣接した正常上皮(腫瘍組織から約15mm離れた)の染色画像を示す図である。

【図13C】図13Cは、IHC分析において図13Aにおいて用いたのと同じ抗E7モノクローナル抗体によって染色した異なるSCC組織サンプルの染色画像を示す図であり、抗E7モノクローナル抗体による腫瘍細胞における特異的なIHC染色を実証する。

【図13D】図13Dは、腫瘍細胞の細胞質を染色する図13Cからの腫瘍細胞の拡大した画像を示す図である。

50

【図14A】図14Aは、本発明の他の実施形態に従った免疫組織細胞化学（ICC）分析における、マウスモノクローナル抗E7抗体によって染色したCIN2子宮頸部のこすり取ったサンプルからの子宮頸部細胞の染色画像を示す図である。

【図14B】図14Bは、本発明の他の実施形態に従ったICC分析における、マウスモノクローナル抗E6抗体によって染色したCIN3子宮頸部のこすり取ったサンプルからの子宮頸部細胞の染色画像を示す図である。

【図14C】図14Cは、ICC分析において図14Bにおいて示した同じ抗E6抗体によって染色した腺癌線維腫（ADC）子宮頸部のこすり取ったサンプルからの子宮頸部細胞の画像を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0016】

本発明の実施形態は、HPVタンパク質に対する様々なモノクローナル抗体を提供し、高リスクおよび低リスクのHPVによる感染が1個のモノクローナル抗体によって検出できるようにする。本発明はまた、高リスクのHPV型のみを検出するHPV型特異性モノクローナル抗体も提供する。加えて、1個のHPVタンパク質に高く特異的なモノクローナル抗体も提供する。

【0017】

本発明の一つの態様は、モノクローナル抗体の生成方法を提供する。この方法は、様々な精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を獲得する工程および2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質上の共通のエピトープを認識し、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および生物学的および臨床的サンプルにおける対応するパピローマウイルス性タンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を獲得する工程を有する。

20

【0018】

加えて、2個以上のヒトパピローマウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞の陽性選択および非HPVタンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞の陰性選択を有する方法を用いることによって生成する。例えば、この方法は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応を示し、非HPVタンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択することによって、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、抗体生成ハイブリドーマ細胞が2個以上のヒトパピローマウイルス性タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するようにする工程を有する。2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質には、例えば、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV16 L1タンパク質、HPV18 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV18 L1タンパク質およびそれらの組み合わせがある。

30

【0019】

本発明の他の態様は、第1HPV型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2HPV型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、2個以上の異なるHPV型からのヒトパピローマウイルス性タンパク質上の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体を得る工程を有する。また、本発明の他の方法は、第1HPV型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2HPV型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、他の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質ではなく、第1および第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質のうち1個のみの特異的なエピトープを認識できるモノクローナル抗体を獲得する工程を有する。

40

【0020】

50

例えば、同じHPV型からの2個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合することができるモノクローナル抗体は、同じHPV型および/または異なるHPV型からの2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって本発明の方法によって生成する。一つの実施例において、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質であり、モノクローナル抗体を生成し、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質に対応する2個以上のHPV初期タンパク質に結合できるようにする。他の実施例において、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質であり、他のモノクローナル抗体を生成し、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質に対応する初期ウイルス性タンパク質および後期ウイルス性タンパク質に結合できるようにする。

10

20

30

40

50

【0021】

得られた例示的なモノクローナル抗体には、HPV16 E6およびHPV16 E7ウイルス性タンパク質の両方に結合することができるモノクローナル抗体の種類があり；HPV16 E6，HPV16 E7，およびHPV16 L1ウイルス性タンパク質の全てに結合することができるモノクローナル抗体の種類があり；HPV18 E6およびHPV18 E7ウイルス性タンパク質の両方に結合することができるモノクローナル抗体の種類がある。したがって、本発明の方法を用いて生成したモノクローナル抗体は、高リスクHPV型、低リスクHPV型、HPV-16，HPV-18，HPV-31，HPV-33，HPV-35，HPV-39，HPV-45，HPV-51，HPV-52，HPV-56，HPV-58，HPV-59およびHPV-68、HPV-68，HPV-6，HPV-11，HPV-42，HPV-43，HPV-44，HPV-53，HPV-54，HPV-55およびHPV-56およびそれらの組み合わせからなる群から選択した同じHPV型からの2個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合することができる。

【0022】

これらのモノクローナル抗体は、HPV感染およびHPVに関連する子宮頸癌および他の疾患を検出する1個以上の免疫分析に用いることができる。適切な免疫分析には、ELISA（抗原捕捉免疫測定法）、パピローマウイルス性タンパク質の抗原分析、パピローマウイルス性タンパク質に対する抗体の抗体分析、パピローマウイルス性免疫複合体の分析、タンパク質チップ分析、放射免疫沈降分析、迅速膜放射免疫沈降分析、迅速スティック免疫クロマトグラフィー、組織および/または子宮頸部細胞の免疫組織化学、およびフローサイトメトリによる免疫化学分析がある。

【0023】

本発明の他の態様は、異なるHPV型からの2個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合することができる方法およびモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体は、異なるHPV型からの2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応を示し非HPVタンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択することによって、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、抗体生成ハイブリドーマ細胞が2個以上のHPVウイルス性タンパク質に特異的に結合できるモノクローナル抗体を生成するようにして得る。例示的なモノクローナル抗体には、HPV16 E7およびHPV18 E7タンパク質に結合することができる種類のモノクローナル抗体；HPV16 E6およびHPV18 E7タンパク質に結合することができる他の種類のモノクローナル抗体；HPV16 L1およびHPV18 L1タンパク質に結合することができる他の種類のモノクローナル抗体があり、様々な免疫学的分析に用いることができる。

【0024】

本発明のさらに他の態様は、異なるHPV型からの初期HPVウイルス性タンパク質お

よび後期HPVウイルス性タンパク質に結合できるモノクローナル抗体を提供する。このモノクローナル抗体は、1個のHPV型からの精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および他のHPV型からの精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得られ、スクリーニング工程は、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質に陽性反応を示し、非HPVタンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマ細胞を選択し、抗体生成ハイブリドーマ細胞から生成したモノクローナル抗体が異なるHPV型からの初期HPVウイルス性タンパク質および後期HPVウイルス性タンパク質に結合することができるようにする。精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質には、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV E6タンパク質、HPV E7タンパク質およびそれらの組み合わせがあり、精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質には、HPV16 L1タンパク質、HPV18 L1タンパク質およびそれらの組み合わせがある。例示的なモノクローナル抗体には、HPV16 E6、HPV16 E7、HPV16 L1、HPV18 E6、HPV18 E7タンパク質の全てに結合することができる種類のモノクローナル抗体；HPV16 E6、HPV16 E7、HPV16 L1、HPV18 E6、HPV18 E7およびHPV18 L1タンパク質の全てに結合することができる他の種類のモノクローナル抗体がある。本発明の方法によって生成したこの種類のモノクローナル抗体は、1個以上の免疫学的分析においてこれらのウイルス性タンパク質のいずれかの存在を検出するのに用いることができる。

10

20

【0025】

本発明のさらに他の態様は、第1ウイルス性タンパク質とは異なる第2ウイルス性タンパク質ではなく第1HPVウイルス性タンパク質のみに結合することができるHPV型特異性モノクローナル抗体を提供する。このモノクローナル抗体は、第1HPV型からの第1精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陽性反応を示し第2HPV型からの第2精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に陰性反応を示す抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得ることができ、第1および第2ウイルス性タンパク質は、第1および第2HPV型の第1および第2精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に対応する。HPV型特異性モノクローナル抗体は、第1ウイルス性タンパク質の1個のウイルス性タンパク質のみにしか結合できない。第1ウイルス性タンパク質には、高リスクHPV型、低リスクHPV型、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59およびHPV-68、HPV-68、HPV-6、HPV-11、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-53、HPV-54、HPV-55およびHPV-56およびそれらの組み合わせ等のHPV型からのウイルス性タンパク質がある。例示的なモノクローナル抗体には、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV16 L1タンパク質、HPV18 E6タンパク質、HPV18 E7タンパク質およびHPV18 L1タンパク質からなる群から選択した1個のウイルス性タンパク質しか認識しないモノクローナル抗体がある。本発明の方法によって生成したこの種類のモノクローナル抗体は、1個以上の免疫学的分析における特異的なウイルス性タンパク質の存在を検出するのに用いる。

30

40

【0026】

一つの実施形態において、様々な組み換え型パピローマウイルス性タンパク質を、パピローマウイルス性タンパク質を発現する細胞を溶解後に、可溶化各分から精製して、可溶性精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質となるようにする。例えば、組み換え型タンパク質は、溶液において陰性の折り畳みとなるように精製する。他の実施例として、組み換え型タンパク質は、そのリン脂質または中性pHまたはPBS緩衝液に分類されるpH値で緩衝液と共に精製する。実施例として、様々な組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、例えば、中性pHでの緩衝溶液においてまたはPBS緩衝液における溶解によって、スピンカラムもしくは濃縮器による濃縮などによって、その陰性折り畳みと

50

なるように精製し、その溶解度を維持し高濃度を得る。HPV組み換え型タンパク質の精製方法の一つは、米国特許第11/559366号明細書「ヒトパピローマウイルス（HPV）の検出方法および子宮頸癌におけるその用途」において開示され、参照して組み込む。

【0027】

モノクローナル抗体を作成するHPVタンパク質のソースは、限定されていない；様々なHPV遺伝子および様々なHPV型/種からの様々なタンパク質がある。本発明のHPVウイルス性タンパク質および/または癌タンパク質には、限定することはないが、HPV E6タンパク質、HPV E7タンパク質、HPV L1タンパク質、HPV E2タンパク質、HPV E3タンパク質、HPV E4タンパク質、HPV E5タンパク質、HPV L2タンパク質がある。

10

【0028】

HPV型は限定しない。一般的に、HPVは、少なくとも3個の群に分けられる：(1) HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58などで、子宮頸癌および他の癌の癌タンパク質である；(2) 低リスクHPV型（-パピローマウイルスHPV-6, HPV-11, HPV-13, HPV-34, HPV-44, HPV-55, HPV-73, HPV-27；PCPV1, HPV-2a, HPV57などで、子宮頸癌および他の癌に発展するリスクが低い）；(3) 他の非発癌タンパク質 - パピローマウイルス（HPV-66, HPV-68, HPV-53, HPV-51, HPV-59, HPV-30, HPV-26, HPV-10, HPV-28, HPV-32, HPV-39, HPV-3, HPV-29, HPV-70など）。一人のヒト対象において多くのHPV感染が、これらのHPV群（高リスク、低リスクおよび/または非発癌性）のうち2個以上のHPVによって起こる。

20

【0029】

2個の問題が存在し、臨床HPV診断に利用できる抗体がない。第1に、臨床サンプルにおけるHPVタンパク質が非常に少量であることである。第2に、臨床サンプルにおけるHPV型は概して知られていないことである。したがって、当業者は失敗し、長年にわたって切実に必要であっても、様々な臨床HPV型を認識するHPV抗体の大量の生成を行うことができず、この必要性は満たされていない。診断試験における抗体の良い用途に対して、抗体は、免疫原上に存在するエピトープだけでなく、エピトープが分析のために準備した試験サンプルにおいて露呈した（すなわち、低温保存、切開および固定等の組織のいずれの予処理後に露呈した）エピトープも認識する。したがって、多量のハイブリドーマ培養上清をスクリーニングするように選択した方法は、診断に有効な抗体の選択を目的とする。組み換え型HPVタンパク質の精製および獲得において、およびHPV感染を検出する精製組み換え型タンパク質からの抗体の生成において既知の失敗があり、人々はその必要性を解決することができていない。本発明は、抗HPV抗体を生成し、抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングする免疫原として用いることができる精製組み換え型HPVタンパク質を提供し、生成した抗HPV抗体を臨床サンプルに用いることができるようにする。

30

【0030】

HPVタンパク質に対するモノクローナル抗体を生成する方法を本願明細書で提供し、1個以上の抗体を獲得し、各モノクローナル抗体は、様々なHPVタンパク質および/もしくはHPV型の中でHPVタンパク質の共通のエピトープまたは特定のエピトープを認識することができる。加えて、本願明細書で得られるモノクローナル抗体のいくつかは、HPV型特異性であるが、本願明細書で得られるモノクローナル抗体のいくつかは非HPV特異性である。非HPV特異性抗体は、臨床サンプルにおいて存在する一般的なHPV型を検出するのに有効である。その結果、これらのモノクローナル抗体は、1個以上のサンプルにおけるHPV感染を検出する分析において用いるのに適切である。これらの非HPV特異性抗体のエピトープマッピングは、これらのモノクローナル抗体を結合するHPV特異性タンパク質の共通のエピトープを特定し配置する。

40

50

【 0 0 3 1 】

一つの実施形態において、2個以上のHPVウイルス性タンパク質の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体は、2個以上の精製組み換え型タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得る。2個以上の精製HPV組み換え型タンパク質には、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV16 L1タンパク質、HPV18 E6タンパク質、HPV18 E7タンパク質、HPV18 L1タンパク質およびそれらの組み合わせ等の適切なHPVタンパク質のいずれかがあ

【 0 0 3 2 】

他の実施形態において、2個以上のHPVタンパク質は、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質に対応する。例えば、2個以上のHPVタンパク質がE6およびE7初期タンパク質であるとき、E6およびE7初期タンパク質の両方の共通のエピトープを認識するモノクローナル抗体は、HPV16および/もしくはHPV18、または他のHPV型からの2個以上の精製E6およびE7タンパク質をスクリーニングすることによって得る。他の実施形態において、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は2個以上の組み換え型HPV初期タンパク質であり、モノクローナル抗体が、2個以上の精製組み換え型初期タンパク質に対応するHPV初期タンパク質の共通のエピトープを認識できる。

【 0 0 3 3 】

一つの実施例は、精製HPV16 E6組み換え型タンパク質および精製HPV16 E7組み換え型タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって、HPV16 E6およびHPV16 E7の両方の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体である。他の実施例は、精製HPV18 E6組み換え型タンパク質および精製HPV18 E7組み換え型タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって、HPV18 E6およびHPV18 E7の両方の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体である。

【 0 0 3 4 】

他の実施形態において、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質には、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質があり、モノクローナル抗体は、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質に対応する初期および後期ウイルス性タンパク質の共通のエピトープを認識できる。精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質は、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV18 E6タンパク質、HPV18 E7タンパク質およびそれらの組み合わせ等の、パピローマウイルス型のいずれかからの初期パピローマウイルス性タンパク質のいずれかである。精製組み換え型パピローマウイルス性後期タンパク質Hは、PV16 L1タンパク質、HPV18 L1タンパク質およびそれらの組み合わせ等のいずれかの後期パピローマウイルス性タンパク質である。例えば、モノクローナル抗体は、HPV16 E6、HPV16 E7、HPV16 L1、HPV18 E6、HPV18 E7タンパク質でスクリーニングすることによって得て、モノクローナル抗体は、HPV16 E6、HPV16 E7、HPV16 L1タンパク質上の共通のエピトープを認識できる。

【 0 0 3 5 】

さらに他の実施形態において、2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質は、少なくとも2個の異なるパピローマウイルス型からの2個以上の組み換え型パピローマウイルス性タンパク質である。例えば、モノクローナル抗体は、第1HPV型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2HPV型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得る。パピローマウイルス型は、高リスクHPV型、低リスクHPV型、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、H

10

20

30

40

50

P V - 3 5 , H P V - 3 9 , H P V - 4 5 , H P V - 5 1 , H P V - 5 2 , H P V - 5 6 , H P V - 5 8 , H P V - 5 9 および H P V - 6 8 、 H P V - 6 8 , H P V - 6 , H P V - 1 1 , H P V - 4 2 , H P V - 4 3 , H P V - 4 4 , H P V - 5 3 , H P V - 5 4 , H P V - 5 5 および H P V - 5 6 等のいずれかのパピロームウイルス型である。第 1 および第 2 精製組み換え型ヒトパピロームウイルス性タンパク質は、例えば、H P V 1 6 E 6 組み換え型タンパク質、H P V 1 6 E 7 組み換え型タンパク質、H P V 1 6 L 1 組み換え型タンパク質、H P V 1 8 E 6 組み換え型タンパク質、H P V 1 8 E 7 組み換え型タンパク質、H P V 1 8 L 1 組み換え型タンパク質およびそれらの組み合わせである。

【 0 0 3 6 】

したがって、一つの実施例は、2 個の異なる H P V 型、H P V 1 6 および H P V 1 8 の両方からの E 6 タンパク質の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体であり、精製 H P V 1 6 E 6 組み換え型タンパク質および精製 H P V 1 8 E 6 組み換え型タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得る。他の実施例は、H P V 1 6 E 7 および H P V 1 8 E 7 の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体である。さらに他の実施例は、H P V 1 6 E 6 、 H P V 1 6 E 7 、 H P V 1 6 L 1 、 H P V 1 8 E 6 および H P V 1 8 E 7 タンパク質の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体である。

10

【 0 0 3 7 】

さらに他の実施形態において、他の H P V タンパク質でなく一つの H P V タンパク質のみの特定のエピトープを認識できるモノクローナル抗体は、第 1 H P V 型からの第 1 精製組み換え型ヒトパピロームウイルス性タンパク質および第 2 H P V 型からの第 2 精製組み換え型ヒトパピロームウイルス性タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって核と岸、1 個または他のウイルス性タンパク質は、第 1 および第 2 H P V 型の第 1 および第 2 精製組み換え型パピロームウイルス性タンパク質に対応する。

20

【 0 0 3 8 】

一つの実施例は、精製組み換え型 H P V 1 6 E 6 タンパク質および精製組み換え型 H P V 1 8 E 6 タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得たモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体は、H P V 1 6 E 6 の特定のエピトープを認識し、H P V 1 8 E 6 タンパク質を認識または相互作用しない。他の実施例は、精製組み換え型 H P V 1 6 E 6 タンパク質および精製組み換え型 H P V 1 8 E 6 タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得たモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体は、H P V 1 8 E 6 の特定のエピトープを認識し、H P V 1 6 E 6 タンパク質を認識または相互作用しない。

30

【 0 0 3 9 】

他の実施例は、精製組み換え型 H P V 1 6 E 7 タンパク質および精製組み換え型 H P V 1 8 E 7 タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得たモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体は、H P V 1 6 E 7 の特定のエピトープを認識し、H P V 1 8 E 7 タンパク質を認識または相互作用しない。他の実施例は、精製組み換え型 H P V 1 6 E 7 タンパク質および精製組み換え型 H P V 1 8 E 7 タンパク質を有する抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得たモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体は、H P V 1 6 E 7 の特定のエピトープを認識し、H P V 1 8 E 7 タンパク質を認識または相互作用しない。

40

【 0 0 4 0 】

他の実施形態において、H P V タンパク質、E 6 、 E 7 または L 1 に対する様々なモノクローナル抗体（抗 H P V E 6 , 抗 H P V E 7 , 抗 H P V L 1 ）は、抗体を引き上げた免疫原に関連する H P V 型を特異的に検出するモノクローナル抗体および非 H P V 型特異性モノクローナル抗体がある。本発明の抗体には、限定することはないが、抗 E 6 , 抗 E 7 および抗 L 1 などがあり、1 個以上の免疫学的分析において用いる。例えば、モノ

50

クローナル抗体は、様々な生物学的サンプル、細胞株、および/または様々な重症度の内皮病変（CIN2，CIN3，LSIL，HSIL，ASCIS）および異なる子宮頸癌、扁平上皮癌（SCC，共通の癌型）および腺癌（ADC，腺癌型）の臨床サンプルの試験に用いることができる。

【0041】

一つの実施形態において、パピロームウイルス感染したヒト対象のスクリーニング方法は、ヒト対象から臨床サンプルを獲得する工程と、様々なHPV組み換え型タンパク質およびHPVタンパク質に特異的な研究室で作成した抗体を用いてヒト対象からの臨床サンプルで1個以上の免疫学的分析を行い、ヒト対象におけるHPV抗体およびHPVタンパク質の存在からHPV感染を検出およびスクリーニングする工程を有する。他の実施形態において、ヒト対象におけるHPVタンパク質は、HPV組み換え型タンパク質に対する抗体を用いて検出し、限定することはないが、様々なHPV初期および後期タンパク質に対する様々なポリクローナルおよびモノクローナル抗体がある。

10

【0042】

本願明細書で開発した抗体は、高品質であり、または、高感度およびHPV感染をスクリーニングし子宮頸癌の検出に特異的な免疫学的分析をにおいて有効な、HPV初期および後期遺伝子によってコードした正確に精製組み換え型タンパク質である。モノクローナル抗体は、ELISA（抗原捕捉免疫測定法）、パピロームウイルス性タンパク質の抗原分析、パピロームウイルス性タンパク質に対する抗体の抗体分析、パピロームウイルス性免疫複合体の分析、タンパク質チップ分析、放射免疫沈降分析、迅速膜放射免疫沈降分析、迅速スティック免疫クロマトグラフィー、組織および/または子宮頸部細胞の免疫組織化学、およびフローサイトメトリによる免疫化学分析からなる群から選択した1個以上の免疫学的分析に用いることができる。一つの実施形態において、1個以上の免疫学的分析は、最小またはさらなる装置を必要としない非侵襲的である。

20

【0043】

免疫学的分析を行う基本技術は、"Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989; "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989および他の本および当該技術において既知のマニュアルにおいてわかる。関連する免疫学的分析、組織および/もしくは子宮頸部細胞に対する免疫化学分析、および/またはフローサイトメトリによる免疫染色分析も、2006年11月13日に開示された米国特許第11/559366号明細書「ヒトパピロームウイルス（HPV）の検出方法および子宮頸癌におけるその用途」；2008年4月14日に開示された米国特許第12/082740号明細書「HPV検出のためのタンパク質チップ」；2008年6月13日に開示された米国特許第61/131991号明細書「HPV検出のための抗体および分析」；2008年9月22日に開示された米国特許第61/192912号明細書「HPVに関連する子宮頸癌の初期段階および後期段階の検出、スクリーニングおよび診断に有効なHPVタンパク質に対する新規のモノクローナル抗体」；本明細書で開示している（NEOD/0005.01）「初期および後期HPV感染の*in situ*検出」；本明細書で開示している（NEOD/0005.02）「初期および後期HPV感染の*in situ*検出」；本明細書で開示している（NEOD/0005.02）「初期および後期HPV感染の*in situ*検出」においてわかる。上述の参考文献は全て参照して組み込む。

30

40

【0044】

一つの実施形態において、本発明はまた、一般的なHPV感染症および様々なHPV遺伝子型、高リスクHPVおよび低リスクHPVによる感染を検出するのに有効な、様々な方法、検出分析およびキット、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ポリペプチド、組み換え型タンパク質および核酸も提供する。加えて、HPVタンパク質の存在を検出する分析またはサンプルフォーマットは限定されず、子宮頸部組織、子宮頸部細胞、子宮頸部のこすり取ったもの、血清、体液などに用いることができる。有効なスクリーニング

50

または診断分析は、IHC、ICC、フローサイトメトリ、ビーズに結合した抗体、迅速試験、タンパク質チップ、ドットプロット、スロット、および従来のELISA分析である。HPVタンパク質は、病理学者による分類後IHC染色によって示すように上皮組織において存在する本発明の抗体によって検出できる。

【0045】

本発明において説明する抗体は、様々なソースの生物学的サンプルにおいて存在するHPVタンパク質を検出するツールを提供する。実施例として、本願明細書に記載する抗体は、マイクロタイタープレート上にコーティングする捕捉抗体として用いることができ、および/またはELISA(抗原捕捉免疫測定)のサンドウィッチフォーマットとして検出抗体として用いることができる。HPVタンパク質および/またはHPV型の検出によって、抗体は、特定のHPVタンパク質もしくはHPV型、またはそれらの組み合わせに対するモノクローナル抗体の本願明細書に記載する特異性に基づいた用途に対して選択する。本願明細書に記載するモノクローナル抗体の選択した特異性からの検出抗体は、ビオチン、アルカリリン酸塩、HRP、読み取るための色測定、化学発光または蛍光基質に基づいた蛍光試薬などの標識と直接結合することができる。検出抗体はまた、ビオチン、アルカリリン酸塩、HRP、蛍光試薬などの標識に結合した2次抗体によって本願明細書に記載したポリクローナル抗体から選択する。捕捉および検出抗体としてのサンドウィッチELISAに対して用いるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の組み合わせは、結合を検出するシグナルを増幅する二次抗体を組み込むことによって分析感度を上げる。直接的EIA(酵素免疫測定)に対して、試験する細胞、サンプルまたは培養細胞を収集し溶解して、検体としての細胞溶解物を生成した。細胞溶解物におけるタンパク質を定量化し、各ウェルに対して各サンプルをコーティングするために同量のタンパク質を用いてマイクロタイタープレートにコートし、その後、本願明細書に記載する特異性を有する抗体を検出した。

10

20

【0046】

様々なHPV遺伝子型からのHPV DNA、遺伝子、初期ウイルス性タンパク質、後期ウイルス性タンパク質、発癌タンパク質および/またはカプシドタンパク質の検出は、"Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989; "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,および他の本およびマニュアルに従って、*in vitro*および*in vivo*方法および検出分析によって行い、HPV感染の一般的な臨床スクリーニングにおいて非常に有効である。

30

【0047】

加えて、免疫学的分析によるHPV抗体および/または発癌タンパク質の検出は、HPV感染に対する一般的な臨床スクリーニングおよび子宮頸癌に対する初期診断において用いることができ、1個の迅速試験または多重試験において行うことができる。

【0048】

異なる濃度のHPVタンパク質および宿主タンパク質の比較検出は、本発明の抗体を用いた同一のまたは異なる免疫学的分析において行うことができる。また、子宮頸部のHSVに関連する癌の診断において用いることができ、HPV感染によって誘起した内皮細胞の異常に関連する場合、前癌状態および癌状態のHPVに関連する内皮細胞病変、およびHPVに関連する子宮頸癌および腺癌に発展するリスクがある場合も用いることができる。本願明細書に記載する方法は、独立して用いることができる、または、従来の細胞パニコロースメア試験または組織学試験に付属するスクリーニングツールとして用いることができ、その結果を経過観察する患者の管理と比較することができる。

40

【0049】

本発明の抗体は、HPV感染によって発生した病期を検出する免疫学的分析において用いることができる。これらの病期は、例えば、初期HPV感染、後期HPV感染、初期子宮頸部細胞病変、後期子宮頸部細胞病変、軽度扁平上皮内病変(LSIL)、重度扁平上

50

皮内病変 (H S I L)、異型扁平上皮細胞 (A S C U S)、子宮頸部上皮内癌段階 1, 2, 3 (それぞれ C I N 1, C I N 2, C I N 3)、発展した子宮頸癌、腺癌 (A D C) または扁平上皮細胞癌 (S C C) である。

【実施例】

【 0 0 5 0 】

1. 抗血清および抗 H P V 抗体を生成し、モノクローナル抗体に対してハイブリドーマ細胞をスクリーニングするために免疫原として用いる H P V 組み換え型タンパク質の発現、精製および準備

H P V 組み換え型タンパク質は、限定することはないが、E 2, E 6, E 7, L 1, L 2 等の初期遺伝子および/または後期遺伝子の H P V タンパク質である、いずれかの種類の H P V タンパク質であり、様々な H P V 型からでよい。全長 E 6, E 7 および/または L 1 ポリペプチド配列は、タンパク質精製間の望ましくない凝集化、タンパク質の不安定性、低度の発現、精製タンパク質の低い免疫原反応のために獲得および精製が非常に難しいと考えられている。例えば、多くの初期 E 6 発癌タンパク質が、多くのシステインアミノ酸を有し、これによって E 6 発癌タンパク質の正しいトポグラフィ (地図) は、多くのジスルフィド結合特性の形成を必要とする。加えて、初期 E 6 および E 7 タンパク質の小ペプチドを用いた特定の免疫学的分析の結果、非常に低い分析特異性および感度となり、臨床的 *in vitro* 診断のツールとして望ましくない。したがって、本発明は、部分配列または全長配列の H P V 発癌タンパク質を有する組み換え型ハイブリッドタンパク質等の組み換え型タンパク質を提供する。

10

20

【 0 0 5 1 】

1) H P V 1 6 E 6 および H P V 1 8 E 6 遺伝子によってコードした様々な組み換え型タンパク質のクローン化および生成

例示的な H P V 型である H P V - 1 6 からの例示的な発癌性 E 6 初期遺伝子はクローンであった。本願明細書でクローン化した H P V 1 6 E 6 遺伝子は、全 H P V - 1 6 E 6 遺伝子の 1 5 7 アミノ酸コーディング領域を有し、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅によって得られた 4 7 4 塩基対 (b . p .) D N A フラグメントである。独立した D N A フラグメントの D N A 配列は、遺伝子バンクのデータベースからの配列と比較することによって確認した。組み換え型 H P V - 1 8 E 6 タンパク質も得た。全てのクローン化手順は、"Molecular Cloning", A Laboratory Manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 において開示されたプロトコールに従って行う。加えて、H P V 1 8 E 6 遺伝子もクローン化し、D N A 配列を確認した。

30

【 0 0 5 2 】

2) H P V 1 6 E 7 および H P V 1 8 E 7 遺伝子によってコードした様々な組み換え型タンパク質のクローン化および生成

例示的な H P V 型である H P V - 1 6 からの例示的な発癌性 E 7 初期遺伝子はクローンであった。本願明細書でクローン化した H P V 1 6 E 7 遺伝子は、全 H P V - 1 6 E 7 遺伝子の 9 9 アミノ酸コーディング領域を有し、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅によって得られた 2 9 4 塩基対 (b . p .) D N A フラグメントである。独立した D N A フラグメントの D N A 配列は、遺伝子バンクのデータベースからの配列と比較することによって確認した。組み換え型 H P V - 1 8 E 7 タンパク質も得た。加えて、異なる H P V 型からの E 7 D N A フラグメントも異なる臨床サンプルまたはソースからクローン化した。

40

【 0 0 5 3 】

3) H P V 1 6 L 1 および H P V 1 8 L 1 遺伝子によってコードした様々な組み換え型タンパク質のクローン化および生成

例示的な H P V 型である H P V - 1 6 からの例示的な発癌性 E 7 後期遺伝子はクローンであった。本願明細書でクローン化した H P V 1 6 E 7 遺伝子は、全 H P V - 1 6 L 1 遺伝子の 5 3 1 アミノ酸コーディング領域を有し、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅によって得られた 1 5 9 6 塩基対 (b . p .) D N A フラグメントである。独立した D

50

NAフラグメントのDNA配列は、遺伝子バンクのデータベースからの配列と比較することによって確認した。組み換え型HPV-18 E7タンパク質も得た。加えて、異なるHPV型からのL1 DNAフラグメントも異なる臨床サンプルまたはソースからクローン化した。

【0054】

HPV16 L1タンパク質の組み換え型N-末端フラグメントもHisタグした発現システムから得た。HPV-16 L1 N-末端組み換え型タンパク質の分子量は、約34kDである。L1 C-末端フラグメントも得た。組み換え型HPV-18 L1タンパク質も得て、抗血清、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体に対する免疫原として用いた。

【0055】

本願明細書に記載する1個以上の組み換え型タンパク質は、例えば、当該技術において既知の、大腸菌、酵母、バキュロウイルス、および/または哺乳動物細胞培養等における細菌発現システム、ウイルス発現システム、酵母発現システム、哺乳動物発現システム等の様々な適切なシステムにおいて発現する。ポリペプチドは、他の方法によって得ることができるが、本発明の実施形態は、それらの天然形である1個以上の組み換え型タンパク質を提供し、免疫学的分析におけるHPV感染したヒト対象の組織からの抗体に結合を確認するのに望ましい。例えば、GST, MBP, またはHisタグしたHPV16 E6, HPV16 E7, HPV18 E7, HPV16 L1およびHPV18 L1組み換え型タンパク質は、IPTG駆動誘導を用いて大腸菌BL21(DE3)において発現した。タンパク質の発現を誘導後、タグHPV組み換え型タンパク質は、培養した細胞の溶解後の可溶画分から得て、約0.1~1mg/mL以上の最終濃度まで精製した。組み換え型HPVタンパク質の純度は、PAGE分析を基にして90%以上であると推測した。組み換え型HPVタンパク質は、臨床サンプルにおけるHPV抗体の存在を検出し、ポリクローナル抗血清およびモノクローナル抗体を生成する免疫原としても用いた。

【0056】

本願明細書に記載する様々な発現ベクターにおける様々な組み換え型パピローマウイルスタンパク質を得る細胞培養液を、その後最大1リットルもしくは10リットル、または100リットル以上まで増やし、多量の精製する可溶組み換え型タンパク質を得た。細胞溶解後の可溶画分は、適切な発現システムで様々なクロマトグラフィーに通して、HPV組み換え型タンパク質に沿って発現したタグに結合させた。その後、タグHPV組み換え型タンパク質をカラムから溶出し、100mLまたは10mLから1mLまで濃縮した。精製可溶組み換え型HPVタンパク質をさらに濃縮し、中性pHでの緩衝液またはPBS緩衝液で透析し、HPVタンパク質に対する抗血清を生成する免疫原として用いた。このように、可溶組み換え型HPVタンパク質を、可溶画分から精製し、in vivoの性質のそのままの折り畳み状態に近いように折り畳んだ。

【0057】

高品質な精製組み換え型HPVタンパク質の獲得は、HPV感染を検出する共通のエピトープまたは特定のエピトープを認識する様々な種類のモノクローナル抗体の生成において重要である。精製組み換え型HPVタンパク質は、HPV感染臨床サンプルからのHPV抗体への結合を確認するために試験した。したがって、この精製組み換え型HPVタンパク質は、抗血清を上げる免疫原として用いるのに適切であり、in vivoのHPVウイルス性タンパク質を認識できる抗体を生成する。

【0058】

2. 抗HPVポリクローナル抗体生成

大腸菌において発現した組み換え型HPV E6, E7またはL1を精製、濃縮およびPBSで透析し、免疫原として用いた。免疫付与を標準的なプロトコールにしたがって行った。得られた各血清をELISA分析によって試験し、その後定期的なブースティングおよび出血させた。適切な滴定量からの生成出血を収集した；処理した血清をタンパク質Aカラムまたは親和カラムを介して免疫グロブリン(1g)精製を行うのに用いた。精製

10

20

30

40

50

1 g GをHPV免疫分析に対する抗HPV抗体として用いた。

【0059】

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および抗血清を獲得、精製および試験して、HPV感染、細胞病変、炎症または癌疾患発達の発病に関係なくHPV感染を検出した。他の研究者は、抗HPVモノクローナル抗体を開発しようと試みたが、モノクローナル抗体の生成に十分なHPVタンパク質の生成に失敗したため失敗してきた；彼らは免疫原が免疫原性でなかったため高い特異性を有するモノクローナル抗体の生成に失敗した；または、初期段階HPV感染した臨床サンプルにおいて存在するHPVタンパク質の天然形を認識できない抗体を生成した。変異ペプチドに対して上昇するいくつかの抗体の未、後期段階子宮頸がんを認識できるが、それらの抗体が野生型HPV天然タンパク質またはい

10

【0060】

本願明細書で記載する抗体の臨床的用途は、適切な臨床サンプルを用いて、ELISA分析、免疫細胞化学分析、免疫組織化学分析等のHPV免疫学的分析によって評価した。本発明の方法から得た新規のモノクローナル抗体および抗血清は、臨床サンプルにおいて存在するHPVウイルス性タンパク質に相互作用および結合することができ、子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)等の初期段階細胞病変および後期段階HPVに関連した子宮頸癌を有することを確認する。本願明細書で記載するモノクローナル抗体および抗血清は、HPVに関連する発病および初期および後期の両方における子宮頸癌の発展を検出およびスクリー

20

【0061】

3. HPVモノクローナル抗体の開発

大腸菌において発現した組み換え型HPV E6, E7またはL1を精製、濃縮およびPBSで透析し、免疫原として用いた。マウスの免疫付与を標準的なプロトコールにしたがって行った。得られた各血清の滴度をELISA分析によって試験し、その後定期的なブースティングおよび出血させた。マウスの血清の滴度は最適となり、腫瘍細胞を有するマウスの脾臓細胞の融合を標準的なプロトコールにしたがって行った。融合細胞、例えばハイブリドーマ細胞のクローン化をさらに培養した。

30

【0062】

1) ハイブリドーマのスクリーニング

本発明において記載する、panを有するハイブリドーマ細胞を生成し、様々なHPVタンパク質に特異的に結合する抗HPV抗体生成ハイブリドーマ細胞を得るため、ハイブリドーマクローンを、元の免疫原だけでなく陽性スクリーニングのさらなるHPVタンパク質および陰性スクリーニングの無関係のタンパク質等の様々なタンパク質でスクリーニングした。例えば2個以上の精製HPV組み換え型タンパク質を、各ハイブリドーマクローンに対してスクリーニングして、抗体生成ハイブリドーマ細胞をスクリーニングおよび獲得し、こうして得られた各抗体生成ハイブリドーマ細胞株の特異性を試験および理解するために用いた。

40

【0063】

ハイブリドーマスクリーニングの実施例として、抗体生成ハイブリドーマ細胞を2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質でスクリーニングして、モノクローナル抗体が2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質に反応できるようにした。2個以上の精製組み換え型パピローマウイルス性タンパク質には、限定することはないが、HPV16 E6タンパク質、HPV16 E7タンパク質、HPV16 L1タンパク質、HPV18 E6タンパク質、HPV18 E7タンパク質、HPV18 L1タンパク質および様々なHPV型からの他のHPV初期および後期タンパク質がある。

【0064】

50

抗体生成ハイブリドーマ細胞は、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質の全てに陽性反応を示し、B S A , h i s₆ タグ、G S T タンパク質、マルチース結合タンパク質 (M B P)、組み換え型タンパク質において用いる他のタグまたはタンパク質、他の容易に利用できる非 H P V タンパク質等の非 H S V タンパク質に陰性反応を示すようにスクリーニングする。このように、このハイブリドーマスクリーニングから生成したモノクローナル抗体は、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質に対応する、2個以上の H P V ウイルス性タンパク質全てに結合することができる (例えば、臨床サンプルにおいて存在する H P V ウイルス性タンパク質)。

【 0 0 6 5 】

2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質の一つの実施例は、H P V 初期タンパク質であり、モノクローナル抗体は、2個以上のヒトパピローマウイルス性初期タンパク質に反応することができる。例えば、このようにスクリーニングおよび獲得した一つのハイブリドーマ細胞株は、H P V 1 6 E 6 および H P V 1 6 E 7 の両方の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体を生成する。このようにスクリーニングおよび獲得した他のハイブリドーマ細胞株は、H P V 1 8 E 6 および H P V 1 8 E 7 の両方の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体を生成する。

【 0 0 6 6 】

2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質の他の実施例には、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性後期タンパク質があり、生成したモノクローナル抗体は、精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質および精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性後期タンパク質の共通のエピトープを認識できる。精製組み換え型パピローマウイルス性初期タンパク質は、H P V 1 6 E 6 タンパク質、H P V 1 6 E 7 タンパク質、H P V 1 8 E 6 タンパク質、H P V 1 8 E 7 タンパク質および他の H P V 組み換え型初期タンパク質であり、精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性後期タンパク質は、H P V 1 6 L 1 タンパク質、H P V 1 8 L 1 タンパク質、および他の H P V 組み換え型後期タンパク質である。例えば、このようにスクリーニングおよび獲得したハイブリドーマ細胞株は、H P V 1 6 E 7 および H P V 1 8 E 6 タンパク質の共通のエピトープを認識するモノクローナル抗体 ; H P V 1 6 E 6 , H P V 1 6 E 7、H P V 1 6 L 1 , H P V 1 8 E 6 , H P V 1 8 E 7 タンパク質の共通のエピトープを認識できるモノクローナル抗体を生成する。多くの実施形態を本発明の図面において提供する。

【 0 0 6 7 】

抗体生成ハイブリドーマ細胞はまた、第1 H P V 型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2 H P V 型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質でスクリーニングし、モノクローナル抗体が2個以上の異なる H P V 型からのヒトパピローマウイルス性タンパク質の共通のエピトープを反応できるようにする。第1および第2 H P V 型は、H P V 1 6 , H P V 1 8 および他の H P V 型である。2個以上の異なる H P V 型は、例えば、高リスク H P V 型、低リスク H P V 型、H P V - 1 6 , H P V - 1 8 , H P V - 3 1 , H P V - 3 3 , H P V - 3 5 , H P V - 3 9 , H P V - 4 5 , H P V - 5 1 , H P V - 5 2 , H P V - 5 6 , H P V - 5 8 , H P V - 5 9 および H P V - 6 8、H P V - 6 8 , H P V - 6 , H P V - 1 1 , H P V - 4 2 , H P V - 4 3 , H P V - 4 4 , H P V - 5 3 , H P V - 5 4 , H P V - 5 5 および H P V - 5 6 である。例として、第1および第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質は、組み換え型 H P V 1 6 E 6 タンパク質、組み換え型 H P V 1 6 E 7 タンパク質、組み換え型 H P V 1 6 L 1 タンパク質、組み換え型 H P V 1 8 E 6 タンパク質、組み換え型 H P V 1 8 E 7 タンパク質および組み換え型 H P V 1 8 L 1 タンパク質である。

【 0 0 6 8 】

ハイブリドーマスクリーニングの他の実施例として、抗体生成ハイブリドーマ細胞を、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質のいくつかに陽性反応を

10

20

30

40

50

示し、2個以上の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質のいくつかおよび/または非HPVタンパク質に陰性反応を示すタンパク質でスクリーニングする。このように、このハイブリドーマスクリーニングから生成したモノクローナル抗体は、他のHPVウイルス性タンパク質ではなくいくつかのHPVウイルス性タンパク質に結合することができる。

【0069】

例えば、モノクローナル抗体は、第1HPV型からの第1精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質および第2HPV型からの第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質でスクリーニングすることによって獲得し、モノクローナル抗体は、他の精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質ではなく第1および第2精製組み換え型ヒトパピローマウイルス性タンパク質の一つの特定のエピトープに反応する。得られた特異的なモノクローナル抗体には、他のHPVタンパク質ではなくHPV16 E6タンパク質にのみ結合することができるモノクローナル抗体；他のHPVタンパク質ではなくHPV16 E7タンパク質にのみ結合することができるモノクローナル抗体；他のHPVタンパク質ではなくHPV16 L1タンパク質にのみ結合することができるモノクローナル抗体；他のHPVタンパク質ではなくHPV18 E6タンパク質にのみ結合することができるモノクローナル抗体；他のHPVタンパク質ではなくHPV18 E7タンパク質にのみ結合することができるモノクローナル抗体がある。

10

【0070】

2) ハイブリドーマ細胞株ストック：免疫学的分析（例えば、ELISA, EIAおよび他の分析）によって判断した所定の陽性反応および所定の陰性反応を示すハイブリドーマ細胞株クローンを選択して単一細胞にクローン化した。各単一細胞クローンをその後、組織培養によって成長した。細胞数はmL当たり百万に到達し、細胞を凍結して-80°Cまたは強力ストックとして液体窒素においた。

20

【0071】

3) 腹水生成：各ハイブリドーマ細胞株を組織培養において成長させ、マウスに腹水生成させるように注射した。腹水を収集して、タンパク質Gカラムによって免疫グロブリン精製に対して処理した。各ハイブリドーマ細胞株からの精製免疫グロブリンをイソタイプして、HPV免疫学的分析に用いた。

30

【0072】

4. 各抗HPV抗体の特異性

1個以上の免疫学的分析を用いて、2個以上のHPV組み換え型タンパク質でハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることによって得たモノクローナル抗体の特異性を試験した。EIA（酵素免疫測定）および/またはウエスタンブロットを、本願明細書に記載するHPV抗体の特異性を試験する分析フォーマットとして用いた。様々な精製組み換え型HPVタンパク質には、抗HPV抗体を得るのに用いる元のスクリーニングタンパク質およびスクリーニングに用いない他のタンパク質があり、EIA上で得られた抗HPV抗体の特異性を試験するマイクロタイタープレート上にコーティングするのに用いた。（HPV感染しているまたはしていない）子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物も、ウエスタンブロットによる抗HPV抗体の特異性を試験するのに用いた。HPV抗体のHPV感染した細胞株からのタンパク質との結合および反応性を確認するため、ウエスタンブロットは、HPV感染した細胞株において存在するタンパク質に対応する特異的なタンパク質結合を証明するのに非常に有効である。これらのウエスタンブロットタンパク質結合は、SDS-PAGEゲル状のそれらの期待した分子量で組み換え型HPVタンパク質と比較することができる。HeLa細胞株（HPV陽性）、SiHa細胞株（HPV16陽性）およびC33A細胞株（HPV感染なし）等の子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を用いて、ウエスタンブロットで本発明の抗HPVモノクローナル抗体によってHPV E6, E7またはL1の検出を行うのに用いた。

40

【0073】

それらの天然形の様々な組み換え型タンパク質をマイクロタイタープレートの底部にコ

50

ートして、E I A分析を行い、本発明の方法によって生成した各抗体の特異性を試験する。同じHPV型からの2個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を得る。図1Aおよび図1Bは、ハイブリドーマ細胞の2個の異なるクローンを示し、各クローンは、HPV16 E6およびHPV16 E7の両方の共通のエピトープを認識するモノクローナル抗体を生成することができる。図1Aおよび図1Bにおいて、E I Aの陽性反応は、組み換え型HPV16 E6およびHPV16 E7のみ観察され、組み換え型HPV E6, HPV18 E7, HPV L1 N-末端、HPV16 L1および6x-Hisタンパク質では陰性反応を示すまたは反応が観察されない。これらのデータは、この種類のモノクローナル抗体がHPV16 E6およびHPV E7に特異的に結合するが、HPV16 L1またはHPV18 E7には結合しないことを実証する。

10

【0074】

同じHPV型からの初期HPVウイルス性タンパク質および後期HPVウイルス性タンパク質に結合できるモノクローナル抗体を得る。図2Aは、E I Aで、組み換え型HPV E6, HPV E7およびHPV L1タンパク質の全てに結合でき、HPV18 E6, HPV18 E7および6x-Hisタンパク質に陰性反応を示すモノクローナル抗体の特異性を示す。これらのデータは、この種類のモノクローナル抗体がHPV16 E6およびL1タンパク質の天然系に強く反応し、HPV16 E7の天然系には弱く反応するが、HPV18 E6またはHPV18 E7タンパク質の天然系には反応しないことを示す。これらのデータは、この種類のモノクローナル抗体が、HPV16 E6, H

20

【0075】

図2Bは、組み換え型HPV E6, HPV E7およびHPV L1タンパク質に反応できるモノクローナル抗体のウエスタンブロット分析の結果を示す。本願明細書で記載する抗体を用いてウエスタンブロットによって検出した組み換え型タンパク質は、HPV E6(約18~20kDa)およびHPV L1(約55kDa)タンパク質の検出を行う。期待した分子量を示した各組み換え型タンパク質は、本願明細書で記載するモノクローナル抗体が、ウエスタンブロットのとき、変性したHPV16 E6およびHPV18 E6に強く反応し、変性したHPV L1タンパク質に弱く反応し、HPV16 E7およびHPV18 E7には検出可能な反応性を示さないことを示す。図2Aおよび図2Bにおける結果を比較すると、これらのデータは、この抗HPVモノクローナル抗体が天然形のHPV16 E6、HPV16 E7およびHPV16 L1タンパク質および変性形のHPV18 E6組み換え型タンパク質によって認識できるHPV共通エピトープを有することを示す。

30

【0076】

図2Cは、図2Bにおいて用いたのと同じモノクローナル抗体と反応する様々な子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を用いたウエスタンブロットの結果を示す。各細胞株からの子宮頸癌細胞株の細胞溶解物および変性形の組み換え型タンパク質の両方を比較してここに示す。このモノクローナル抗体のHPV E6, HPV E7およびHPV L1タンパク質との特異性は、モノクローナル抗体がHPV感染した子宮頸癌細胞株において存在するHPVウイルス性タンパク質を認識できるが、HPV感染していない細胞株のは認識できないことから確認できる。17kDaの標準的な分子量マーカーの周囲でモノクローナル抗体によって検出した二重結合は、HeLa(HPV18感染)およびSiHa(HPV16感染)細胞株における子宮頸癌細胞株からのHPV E6タンパク質(約18kDa)およびHPV E7(約15kDa)タンパク質の検出を行う。期待した分子量を有する組み換え型タンパク質レーン上の結合は、モノクローナル抗体が、ウエスタンブロットのとき、変性したHPV16 E6およびHPV18 E6に強く反応し、変性したHPV L1組み換え型タンパク質に弱く反応し、HPV16 E7およびHPV18 E7には検出可能な反応性を示さないことを示す。

40

50

【 0 0 7 7 】

異なるHPV型からの初期HPVウイルス性タンパク質および後期HPVウイルス性タンパク質に結合できるモノクローナル抗体も得る。図3Aは、EIAで、HPV16およびHPV18型からの組み換え型E6、E7およびL1タンパク質に反応できるモノクローナル抗体の特異性を示す。これらのデータは、この種類のモノクローナル抗体がHPV16の組み換え型E6、E7およびL1タンパク質およびHPV18の組み換え型E6およびE7タンパク質の全てに特異的に反応するが、his-タグペプチドには反応しない（組み換え型タンパク質が発現および精製に対して6x-Hisに溶解しても）ことを示す。これらのデータは、この抗体が、組み換え型HPV16 E6、HPV16 E7、HPV16 L1、HPV18 E6およびHPV18 E7タンパク質の全てに反応することができる能力によって示すように、異なるHPV型のHPV16およびHPV18によって共有された共通のエピトープを認識することを示す。

10

【 0 0 7 8 】

図3Bは、図3Aにおいて用いたモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示す。このモノクローナル抗体のこれらの組み換え型タンパク質（すなわち、HPV16およびHPV18の組み換え型E6、E7およびL1タンパク質）に対する陽性反応は、モノクローナル抗体が、E6（約18kDa）、E7（約15kDa）およびL1（約55kDa）タンパク質を認識できることを示す。ウエスタンブロット分析の各組み換え型タンパク質レーンから結果できた結合は、期待した分子量を示し、このモノクローナル抗体が、ウエスタンブロットのとき、HPV16およびHPV18からの変性したE6およびE7タンパク質に強く反応し、変性したL1タンパク質に弱く反応することを示す。図3Aおよび図3Bの結果は、このモノクローナル抗体が、HPV共通のエピトープを認識し、天然形および変性形のHPV16 E6、HPV16 E7、HPV16 L1、HPV18 E7およびHPV18 E6タンパク質と反応できることを示す。

20

【 0 0 7 9 】

図3Cは、図3Aおよび図3Bにおいて用いたのと同じモノクローナル抗体と反応する様々な子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を用いたウエスタンブロットの結果を示す。細胞溶解物および変性形の組み換え型タンパク質の両方を試験してここに示す。17kDaの標準的な分子量マーカーの周囲でモノクローナル抗体によって検出した二重結合は、HeLa（HPV18）およびSiHa（HPV16）細胞株における子宮頸癌細胞株からのHPV E6タンパク質（約18kDa）およびHPV E7（約15kDa）タンパク質の検出を行うが、C33A（非HPV感染）細胞株の検出は行わない。期待した分子量を有する組み換え型タンパク質レーン上の結合は、モノクローナル抗体が、ウエスタンブロットのとき、変性したHPV16 E6、HPV18 E6、HPV18 E7組み換え型タンパク質に強く反応し、変性したHPV L1組み換え型タンパク質に弱く反応し、HPV16 E7には検出可能な結合を示さないことを示す。

30

【 0 0 8 0 】

異なるHPV型からの2個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合できるモノクローナル抗体も得る。例えば、HPV16およびHPV18の組み換え型E6タンパク質に反応できるモノクローナル抗体を得る。図4Aは、EIAで、HPV16 E6およびHPV18 E6タンパク質の共通のエピトープを認識でき反応できるモノクローナル抗体の特異性を示す。天然形の組み換え型タンパク質を、マイクロタイタープレート上にコーティングする。これらのデータは、モノクローナル抗体が天然形の組み換え型HPV16 E6およびHPV18 E6タンパク質に強く反応するが、天然形の組み換え型HPV E7およびHPV L1タンパク質に反応性を示さないことを示す。

40

【 0 0 8 1 】

図4Bは、HPV感染した子宮頸癌細胞株において存在するHPV16およびHPV18 E6ウイルス性タンパク質に特異的に結合する、図4Aにおいて用いたのと同じモノクローナル抗体と反応する様々な子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を用いたウエスタンブロットの結果を示す。17kDaの標準的な分子量マーカーの周囲でモノクローナル抗体

50

によって検出した一重結合は、HeLa (HPV18)における子宮頸癌細胞株からのHPV E6タンパク質(約18kDa)タンパク質の検出を行うが、C33A(非HPV感染)細胞株の検出は行わない。期待した分子量を有する組み換え型タンパク質レーン上の結合は、モノクローナル抗体が、変性したHPV18 E6組み換え型タンパク質に強く反応することを示す。

【0082】

異なるHPVからの1個以上のHPVウイルス性タンパク質に結合できる他の例示的なモノクローナル抗体は、HPV16 E6およびHPV18 E7タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体である。図5は、EIA分析したときのこのモノクローナル抗体の特異性を示す。これらのデータは、本願明細書に記載するモノクローナル抗体が、天然形の組み換え型HPV16 E7およびHPV18 E7タンパク質に強く反応するが、天然形のHPV E6および組み換え型HPV L1には反応を示さないことを示す。これらのデータは、この抗体がHPV型に関わらず、E7のみの共通のエピトープを認識することを示す。

10

【0083】

第1HPVウイルス性タンパク質だけ結合でき、第1HPVウイルス性タンパク質とは異なる第2HPVウイルス性タンパク質には結合できないモノクローナル抗体も得る。図6は、EIAで、組み換え型HPV16 E6に反応でき、他の組み換え型HPVタンパク質には反応できないモノクローナル抗体の特異性を示す。HPV16 E6のみに反応でき、HPV18 E6または他の組み換え型HPVタンパク質に反応できない特異的なエピトープを有するこのモノクローナル抗体が見られる。これらのデータは、本願明細書に記載するモノクローナル抗体が天然形のHPV16 E6タンパク質に強く反応するが、天然形の組み換え型HPV E7またはL1タンパク質には反応しないことを示す。これらのデータは、この抗体が、HPV16 E6タンパク質のみに反応でき、HPV16 E6特異性エピトープを認識することを示す。

20

【0084】

他の例として、図7は、EIAで、組み換え型HPV E6タンパク質に反応できるが、他の組み換え型HPVタンパク質には反応できないモノクローナル抗体の特異性を示す。このモノクローナル抗体は、HPV18 E6タンパク質のみに特異性を有し、HPV16 E6または他の組み換え型タンパク質には交差反応性を示さない。これらのデータは、HPV18 E6タンパク質のみに反応できる抗体がHPV18 E6特異的なエピトープを認識することを示す。

30

【0085】

図7Bは、図7Aにおいて用いたのと同じモノクローナル抗体と反応する様々な子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物を用いたウエスタンブロットの結果を示す。17kDaの標準的な分子量マーカーの周囲でモノクローナル抗体によって検出した一重結合は、HeLa (HPV18)子宮頸癌細胞株におけるHPV E6タンパク質(約18kDa)の検出を行うが、C33A(非HPV感染)細胞株の検出は行わない。期待した分子量を有する組み換え型タンパク質レーン上の結合は、このモノクローナル抗体も、変性したHPV18 E6組み換え型タンパク質に強く反応することを示す。

40

【0086】

他の実施例として、図8は、EIAで、組み換え型HPV16 E7に反応できるが、他の組み換え型HPVタンパク質には反応できないモノクローナル抗体の特異性を示す。EIAで、HPV18 E7タンパク質または他の組み換え型タンパク質には交差反応性がない。これらのデータは、本願明細書に記載するモノクローナル抗体が、天然形の組み換え型HPV16 E7タンパク質に強く反応するが、天然形の組み換え型HPV E6またはL1タンパク質には検出可能な結合をしないことを示す。これらのデータは、HPV16 E7タンパク質のみに反応できるこの抗体がHPV16 E7エピトープを認識することを示す。

【0087】

50

他の実施例として、第1HPVウイルス性タンパク質のみに結合できるが、第1HPVウイルス性タンパク質とは異なる第2HPVウイルス性タンパク質には結合できないモノクローナル抗体を示し、図9は、EIAで、組み換え型HPV18 E7に反応できるが、他の組み換え型HPVタンパク質には反応できないモノクローナル抗体の特異性を示す。これらのデータは、本願明細書に記載するモノクローナル抗体が、天然形のHPV18 E7タンパク質に強く反応するが、天然形の組み換え型HPV E6またはL1タンパク質には反応しないことを示す。これらのデータは、HPV18 E7タンパク質のみに反応できるこの抗体が、HPV18 E7特異性エピトープを認識することを示す。

【0088】

他の実施例として、図10Aおよび図10Bは、EIAで、組み換え型HPV16 L1 N-末端タンパク質のみに反応できるが、他の組み換え型HPVタンパク質には反応できない2個のモノクローナル抗体クローンの特異性を示す。EIAで、HPV16 H1または他の組み換え型タンパク質には交差反応性がない。これらのデータは、本願明細書に記載するモノクローナル抗体が、天然形の組み換え型HPV16 L1-N末端タンパク質に強く反応するが、天然形の組み換え型HPV E6またはE7タンパク質には反応をしないことを示す。これらのデータは、HPV16 L1-N末端タンパク質のみに反応できるこの抗体がHPV16 L1 N-末端エピトープを認識することを示す。

10

【0089】

他の実施例として、図11は、EIAで、組み換え型HPV16 L1およびHPV16 L1-N末端タンパク質に反応できるが、他の組み換え型HPVタンパク質には反応できないモノクローナル抗体の特異性を示す。このモノクローナル抗体は、HPV16 L1およびHPV16 L1 N-末端タンパク質上に存在する特異的なエピトープを認識する。他のHPV初期タンパク質との交差反応性は見られなかった。これらのデータは、本願明細書に記載するモノクローナル抗体が、天然形の組み換え型HPV16 L1およびHPV16 L1-N末端タンパク質に強く反応するが、HPV16またはHPV18からの天然形の組み換え型HPV E6またはE7タンパク質に反応をしないことを示す。これらのデータは、HPV16 L1およびHPV16 L1 N-末端タンパク質のみに反応できるこの抗体がHPV16 L1 N-末端特異性エピトープを認識することを示す。

20

【0090】

本発明において記載する抗体は、様々な免疫学的分析において用いることができる。免疫学的分析の一つの実施例は、2個以上の抗HPV抗体を用いるサンドウィッチELISA分析である。サンドウィッチELISA分析を行うとき、まず、一次抗HPV抗体をマイクロタイタープレート上にコートし、HPVウイルス性タンパク質または組み換え型HPVタンパク質を有するサンプルを試験して、マイクロタイタープレートの各ウェルに加え、一次抗HPV抗体と反応させ、マイクロタイタープレートの底部表面上のHPVタンパク質を捕捉する。第3に、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)または他の検出剤を結合させた二次抗HPV抗体を加える。抗体-タンパク質複合体の検出は、通常、HRPに対してはTMB基質等の検出剤に対する基質を加えることによって行い、例えばELISAリーダー等の検出装置によって、検出剤を付けた抗体-タンパク質複合体の存在を報告する(これによって、HPVタンパク質との抗HPV抗体の結合活性に影響を与える)。サンドウィッチELISA分析は、一次および二次抗HPV抗体によるHPVタンパク質の特異的結合を提供し、これによって、2個の抗HPV抗体の特異性を特定または確認する。本発明において、様々な抗体を、抗体特異性を示すためにコーティングする抗体および検出抗体として用いた。

30

40

【0091】

【表 1】

HPV E6タンパク質を検出するサンドウィッチELISA分析

コーティング抗体	抗HPV16& 18 E6	抗HPV16& 18 E6	抗HPV18 E6	抗HPV18 E6
試験タンパク質	組み換え型HP V18 E6	組み換え型HP V16 E6	組み換え型HP 18 E6	組み換え型 HPV16 E6
検出抗体	抗HPV 18 E6	抗HPV 18 E6	抗HPV16 &18 E6	抗HPV16 &18 E6
ELISA結果 (OD450)	1.5	0.05	1.45	0.05

10

【0092】

実施例として、表1は、HPV18 E6タンパク質の存在を検出するためのELISA（酵素免疫測定）の実験設定および結果を示す（抗原試験）。この結果は、HPV18 E6組み換え型タンパク質は、コーティングおよび検出抗体がHPV18 E6に反応できるとき検出できるが、コーティング抗体がHPV16 E6に結合できるが検出抗体がHPV18 E6のみに特異的に反応するにも関わらず、HPV16 E6組み換え型タンパク質は検出できないことを示す。同様の結果は、HPV16 E6およびHPV18 E6の両方に結合できる検出抗体によってコーティングした特異的抗HPV18 E6を用いたときに得られた。データは、HPV18 E6組み換え型タンパク質をサンドウィッチ分析における試験タンパク質として用いるときに抗体の特異性がHPV18 E6を認識するが、サンドウィッチ分析の抗原としての組み換え型HPV16 E6タンパク質には反応性を示さないことを示す。本願明細書に記載する分析フォーマットは、限定することはないが、子宮頸癌細胞からの細胞溶解物、子宮頸部をかき取ったサンプル、組織、体液、血清などの生物学的サンプルにおいて存在するHPV18 E6タンパク質を検出するのに用いた。この特異的なサンドウィッチ分析は、HPV18に特異的な型を提供し、この分析において検出可能なHPV16 E6の結合を排除する。

20

【0093】

【表 2】

HPV E6を検出するサンドウィッチELISA分析

コーティング抗体	抗HPV18 E7	抗HPV18 E7
試験タンパク質	組み換え型HPV18 E7	組み換え型HPV16 E7
検出抗体	抗HPV 18 E7	抗HPV 18 E
ELISA結果 (OD450)	1.25	0.04

40

【0094】

本発明において記載する抗体を示す他の実施例として、HPV E7タンパク質を用いることができ、表2は、コーティングおよび検出抗体に対してHPV18 E7に対するモノクローナル抗体（HPV18 E7を認識する）を用いてHPV18 E7組み換え型タンパク質の存在を検出するELISAの結果を示す。データは、抗体の特異性が、サンドウィッチ分析の抗原としてHPV18 E7を用いてHPV18 E7を認識するが、サンドウィッチ分析の抗原としてHPV16 E7を用いると反応しない。本願明細書に記載するこの分析フォーマットは、限定することはないが、子宮頸癌細胞からの細胞溶解物、子宮頸部をかき取ったサンプル、組織、体液、血清などの生物学的サンプルにおいて存在するHPV E7タンパク質を検出するのに用いた。このサンドウィッチ分析は、H

50

HPV18に対するE7特異性を提供し、HPV感染のスクリーニングおよびHPV E7発癌タンパク質の検出に有効である。

5. 抗HPV抗体の用途

【0095】

本発明において記載するHPV抗体は、一般的なHPV感染および様々な特異的なHPV遺伝子型、高リスクHPVおよび低リスクHPVによる感染に対する様々な免疫学的分析において用いることができる。HPVタンパク質の存在の検出において用いるサンプルは限定されず、子宮頸部組織、子宮頸部かき取り、血清、体液などから得ることができる。子宮頸癌もしくはHPV感染のスクリーニングまたは診断に有効な免疫学的分析は、IHC分析、ICC分析、フローサイトメトリ分析、ビーズに結合した抗体を用いる分析、迅速試験、タンパク質チップ分析、ドットプロットを有する免疫学的分析、スロットを用いる免疫学的分析、および従来のELISA分析がある。スクリーニング試験として、HPV抗体は、有資格の細胞学者によって行われたICCによって証明されるように、子宮頸癌スクリーニングにおいて一般集団からの子宮頸部かき取りの内皮細胞においてin situ存在するHPVタンパク質を検出するのに用いることができる。確認試験として、HPV抗体はまた、有資格の病理学者によって行われたIHC染色によって証明されるように、内皮組織においてin situ存在するHPVタンパク質を検出するのに用いることができる。

10

【0096】

1) 精製抗HPV抗体の生物学的サンプルにおいて見つかるHPVタンパク質との反応性
HPV抗体のHPVタンパク質との反応活性を確認するため、精製HPV組み換え型タンパク質および/または生物学的サンプルからの細胞溶解物を含むHPVをELISAまたは直接EIAで試験する。生物学的サンプルには、限定することはないが、培養細胞からの細胞または臨床サンプルがある。

20

【0097】

【表3】

子宮頸癌細胞株におけるE6, E7およびL1のEIA検出

OD	抗 HPV16 E6, HPV18 E6 抗体	抗 HPV18 E6 抗体	抗 HPV18 E7 抗体	抗 HPV16 E7 抗体	抗 HPV16 L1 抗体
Caski (HPV16*)	0.392	0.48	0.442	0.464	0.355
SiHa (HPV16*)	1.165	1.314	1.162	1.202	1.115
CxCa (HPV16*)	1.126	1.047	0.802	0.825	0.724
Hela (HPV18*)	0.779	0.762	0.734	0.654	0.652
HEC-1A (非 HPV)	0.173	0.206	0.219	0.186	0.173

30

40

【0098】

実施例として、表3において示すデータのように、HPV E6、HPV E7またはHPV L1タンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、陰性対照としてHEC-1Aを用いるとき、直接EIAにおける様々な子宮頸癌細胞株からの細胞溶解物と特異的に反応できる。Caski, SiHa, Cxca, Hela等の子宮頸癌細胞株、およびHEC-1A(非HPV感染)等の子宮内膜癌細胞からの細胞溶解物を用いて、表3において示すようにそれぞれ、HPV E6, HPV E7およびHPV L1に特異的なHPVモノクローナル抗体によるHPV E6, E7, またはL1の検出を行うのに用いた。

【0099】

50

本願明細書で試験し記載する培養細胞には、限定することはないが、C a s k i (H P V 1 6 陽性) , S i n a (H P V 1 6 陽性) , C x c a , H e l a (H P V 1 8 陽性) 等の子宮頸癌細胞および H E C - 1 A (非 H P V 感染) 等の子宮内膜癌細胞株がある。直接 E I A に対して、細胞を回収、遠心、洗浄および溶解して、検体として細胞溶解物を生成した。細胞溶解物におけるタンパク質を、定量化し、各ウェルにおける各サンプルをコーティングするための同量のタンパク質を用いてマイクロタイタープレートにコーティングした。プレートを遮断し、示したように各 H P V モノクローナル抗体およびその後 H R P 結合した抗マウス I g G によって検出した。T M B 基質を加え、その後、標準的な反応停止溶液を加えた。O D ₄₅₀ を E L I S A プレートリーダーによって行った。

【 0 1 0 0 】

2) 精製抗 H P V 抗体の H P V タンパク質との反応性を臨床サンプルにおいて見つけた。

本願明細書で試験し記載する臨床サンプルは、限定することはないが、子宮頸部かき取り、体液または血清サンプルである。子宮頸部かき取りからの臨床生検も、E I A で H P V E 6 , E 7 または L 1 タンパク質の検出をするために得た。

【 0 1 0 1 】

液体の溶液、培養液 (H P V D N A 試験サンプルに対して用いた) 、またはパップスメアにおいて子宮頸部かき取りを含む様々なサンプルソースからの細胞溶解物は、本発明において記載する様々な H P V モノクローナル抗体を用いて E I A フォーマット上で臨床サンプルからの H P V E 6 , E 7 または L 1 の検出を行う。本願明細書で記載する直接 E I A を行うため、生検を処理、遠心分離、洗浄および溶解して、検体として細胞溶解物を生成した。細胞溶解物におけるタンパク質を定量化し、各ウェルにおける各サンプルをコーティングするための同量のタンパク質を用いてマイクロタイタープレートにコーティングした。プレートを遮断し、示したように各 H P V モノクローナル抗体およびその後 H R P 結合した抗マウス I g G によって検出した。T M B 基質を加え、その後、標準的な反応停止溶液を加えた。O D ₄₅₀ を E L I S A プレートリーダーによって行った。

【 0 1 0 2 】

10

20

【表 4】

子宮頸部かき取りサンプルにおけるE 6, E 7およびL 1のE I A検出

サンプルD _x	抗HPV18 E 6抗体	抗HPV16 E 7抗体	抗HPV L 1抗体
扁平上皮細胞癌 (SCC)	+++	+++	+++
扁平上皮細胞癌 (SCC)	+++	+++	+++
重度HPV DNA試験陽性	—	—	—
重度HPV DNA試験陽性	+	+	+
重度HPV DNA試験陽性	—	—	—
パップスメア 正常、PCR陰性	—	—	—
パップスメア 正常、PCR陰性	—	—	—
パップスメア 正常、PCR陰性	—	—	—

10

20

【0103】

表4において示す結果は、各モノクローナル抗体が、分析の陰性対照としてパップスメア正常（HPVネガ）を用いて、SCCサンプルからそれぞれHPV E 6, E 7またはL 1タンパク質を検出することを示す。高度HPV DNA位置からのサンプルに対して、E I Aで3個のうち1個がE 6, E 7およびL 1で陽性である。これらのデータは、SCC溶解物からのE 6, E 7またはL 1タンパク質は本願明細書に記載するモノクローナル抗体を用いてE I Aによって検出できるが、高度HPV DNA位置のサンプル（CIN 1/2）は、検出可能なHPV E 6, E 7またはL 1タンパク質を含むまたは含まないことを示す。この研究において用いた高度HPV DNA試験はhcであり、FDAしかHPV DNA試験を承認しなかった。それらのHPV DNA陽性であるがHPV E I A陰性であるサンプルに対して、HPV DNA分析の陽性、またはHPV発癌タンパク質を発現しないそれらのHPV DNA検出の陽性を偽ることができる。これらのデータは、本願明細書に記載するHPV E I A分析が子宮頸癌のスクリーニングのさらなる臨床的妥当性を提供することを示す。

30

【0104】

3) 免疫組織化学（IHC）による精製抗HPV抗体の*in situ* HPVタンパク質との反応性

4ミクロンに切断したパラフィン組織をスライドガラスガラス上に置き、60°Cで一晩焼いた。脱パラフィン水和物の切片を脱マスクし、その後標準的なIHC染色手順に従った。本発明において記載するHPVタンパク質精製モノクローナル抗体を希釈して、一次抗体として用いた。染色手順は、二次抗体溶液、洗浄後、各切片に対して適切な試薬を入れた。切片ができたらすぐ、精製水にスライドガラスを浸し、ヘマトキシリン、脱水物で切片を対比染色し、カバースリップを載せた。

40

【0105】

実施例として、様々な段階のCINからの様々な子宮頸部組織を準備して、本願明細書

50

で記載するラビットポリクローナル抗HPV E7抗体を用いてIHC分析を行った。他の実施例として、多くの子宮頸部生検サンプルを、様々なHPV型(HPV DNA遺伝子型によって確認)からのHPVタンパク質を検出するモノクローナル抗体を用いて組織マイクロアレイフォーマットとして共に免疫組織化学的分析において試験した。HPVウイルス性タンパク質および/または発癌タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて、本発明は、1個のHPV感染または複数のHPV感染のいずれかを有する臨床サンプルにおけるHPV L1ウイルス性タンパク質およびE6, E7発癌タンパク質の存在を検出する抗体を提供する。本願明細書に記載する1個の抗HPVモノクローナル抗体は、少なくとも癌に関連するHPV型(高リスクHPV型または低リスクHPV型のいずれか)であるHPV-6, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-52などによって1個のHPV感染を検出できる。1個の抗HPVモノクローナル抗体は、高リスク、低リスク、および非発癌性 - パピローマウイルスを含む、HPV-16, HPV-18, HPV-52, HPV-58, HPV-44, HPV-51, HPV-39, HPV-59などで; PCPV1, HPV-2a, HPV57などの組み合わせ等の2個以上のHPV型によるHPV感染を検出できる。

10

20

30

40

50

【0106】

実施例として、本発明において記載するHPV抗体は、臨床用途において適用できる。IHC分析の結果は、マウスモノクローナル抗HPV E7抗体を用いた、様々な段階の子宮頸部組織からの*in situ*に存在するHPV E7タンパク質の検出を行う。他の実施例として、本願明細書に記載する抗体はまた、様々な段階のCINからの子宮頸部組織を用いてICC分析において用いることができる。他の実施例として、マウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いるIHC染色の結果は、様々な段階のCINから*in situ*において存在するHPV E6タンパク質の検出を示す。これらの結果は、形成不全細胞において過剰に発現したHPVE6およびHPV E7発癌タンパク質が、特異的なHPV抗体と用いたIHC染色によって特異的に検出できることを示す。

【0107】

実施例として、図12A~12Dは、マウスモノクローナル抗HPV E6抗体によって行ったCIN組織のIHC染色を示す。結果は、E6発癌タンパク質の発現は、CIN前癌段階において初期に検出できることを示す。黒色矢印は、形成不全細胞におけるE6タンパク質の特異的な染色を示すが、白色透明矢印は、染色されていない正常細胞を示す。拡大した画像は、形成不全細胞の核において初期に発現したE6タンパク質の位置を示す。

【0108】

図12Aは、抗E6モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色(IHC)によって染色したCIN組織の形成不全細胞の画像である。図12Bは、図12AのCIN2サンプルの形成不全細胞に隣接した正常上皮細胞の画像である。図12C~Dは、同じ抗E6モノクローナル抗体を用いたIHCによって染色した2個のCIN3サンプルの形成不全上皮細胞の画像である。これらのデータは、E6モノクローナル抗体によるIHC染色が形成不全細胞において核および細胞質において特異的であることを示す。

【0109】

他の実施例として、図13A~13Dは、マウスモノクローナル抗HPV E7抗体によって行った扁平上皮細胞癌のIHC染色を示す。結果は、E7発癌タンパク質は、SCC組織の腫瘍細胞において検出できることを示す。黒色矢印は、形成不全細胞におけるE7タンパク質の特異的な染色を示すが、白色透明矢印は、染色されていない正常細胞を示す。拡大した画像は、正常上皮または基質細胞においてではなく、腫瘍細胞の細胞質において発現したE6タンパク質の位置を示す。これらのデータは、E7モノクローナル抗体によるIHC染色が腫瘍細胞の細胞質において特異的であることを示す。図13Aは、抗E7モノクローナル抗体を用いたIHCによって染色した扁平上皮細胞癌(SCC)組織の画像である。図13Bは、図13AからのSCC対象の正常な上皮(腫瘍組織から15mm離れた)の画像である。図13Cは、同じ抗E7モノクローナル抗体を用いたIHC

によって染色した他のSCCサンプルの画像である。図13Dは、図13Cからの細胞質において染色した腫瘍細胞の拡大画像である。

4) 免疫化学 (ICC) による精製抗HPV抗体の *in situ* のHPVタンパク質との反応性

【0110】

液体ベースの溶液によって回収した子宮頸部のかき取りを製造装置に従って処理した。準備した細胞を2群に分け、1個を従来のパップスメア用で、もう一方は、免疫染色用である。スライドガラス上の子宮頸部細胞の単層を細胞スピンまたは薄処理技術によって処理した。その後、細胞を固定して免疫染色プロトコールにしたがって染色した。染色した細胞を顕微鏡で可視化した。

10

【0111】

実施例として、図14A~14Cは、抗HPV抗体を用いた免疫化学分析を示す。図14Aは、薄準備によって準備し、マウスモノクローナル抗HPV E7抗体を用いてICCによって染色したCIN2子宮頸部かき取りサンプルからの子宮頸部細胞の画像である。図14Bは、薄準備によって準備し、マウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いてICCによって染色したCIN2子宮頸部かき取りサンプルからの子宮頸部細胞の画像である。図14Cは、薄準備によって準備し図14Bにおいて示したのと同じ抗E6抗体を用いてICCによって染色した腺癌 (ADC) 子宮頸部かき取りサンプルからの子宮頸部細胞の画像を示す。

20

【0112】

本願明細書に記載するように、抗体およびHPV初期および/または後期遺伝子由来の精製組み換え型タンパク質を用いた1個以上の免疫学的分析は、HPV感染が起こったかどうかを示す信頼のおける指標として機能する。加えて、HPVに関連する悪性腫瘍または前癌細胞形質転換を分析できる。本発明の最も有効な態様のうち一つは、子宮頸癌、扁平上皮細胞癌および腺癌の両方および、空細胞症；過角化症；上皮内または上皮癌または上皮内病変を含む前癌状態；重度の形成不全；および浸潤癌または悪性癌等の発癌性HPV感染に関連するいずれかの上皮細胞の非正常の診断である。

30

【0113】

重度のCIN病変において、E6およびE7は、宿主ベースの上皮細胞において強く発現し、これらの複製能力宿主細胞の細胞周期制御を大きく妨げる。HPV発癌タンパク質の発現は、宿主細胞におけるG1-S Phaseを妨げる。HPV E6およびE7タンパク質は、E7によるpRBの不活性およびE6によるp53の分解等、過剰の細胞相互作用を標的とする。高濃度のHPV E7タンパク質はpRBを不活性にし、E2F-Rb結合を妨げる。通常、pRBのE2Fへの結合は、E2F駆動細胞周期活性を遮断する。細胞の複製において、E2Fは、RBのリン酸化によって制御される。リン酸化は、通常いくつかのキナーゼ阻害剤 (INKs) によって制御されるサイクリン依存キナーゼ (CDK4, CDK6) によって仲介される。

40

【0114】

Rb/E2F抑制の損失および遊離E2Fによる強活性の結果として、宿主細胞タンパク質p16INK4aの発現が過剰に発現する。加えて、Cdk4/6のp16INK4a仲介抑制は、pRb宿主細胞タンパク質上に下流効果を与えないため、S-相遺伝子が連続的に活性化される。E7依存E2F放出はpRbのリン酸化によって仲介されるため、逆調節p16INK4a発現は活性化細胞周期に効果を示さない。物理学的条件下でp16INK4aは、細胞が老化組織におけるテロメアの短縮化等の遺伝子ストレス状態となる時発現する。また、アポトーシスはp53のHPV E6仲介分解によって無効になる。サイクリン依存キナーゼ (CDK) 阻害剤p16INK4aの過剰の発現は、非制御HPV癌遺伝子発現の直接的な結果である。

40

【0115】

加えて、増殖に重要な宿主細胞タンパク質および宿主細胞ゲノム複製は、HPV感染の結果として過剰に発現する。これらの宿主細胞タンパク質には、ki67 (MIB-1)

50

、MYC細胞癌遺伝子、サイクリンタンパク質（例えばサイクリンA、B、Eなど）、CDKN2A/p16INK4a、テロメラーゼ（例えばTERC）、複製複合タンパク質（例えばMCM5、CDC6、トポイソメラーゼII（TOP2A）、MCM2、ミンクロモソン維持タンパク質2、4、5などがある。

【0116】

本願明細書で与える1個以上の免疫学的分析は、簡単な装置でまたはさらなる装置なしに易しい手順を用いて、短い時間で行うことを目指す。様々な免疫学的分析の結果と比較して、ヒト対象に対する細胞学および病理学的データを用いた核酸ハイブリダイゼーション分析および人口学的情報は、HPV感染および/または子宮頸癌の診断における正確性を評価する。

10

【0117】

ヒトパピローマウイルスに感染したヒト対象のスクリーニング方法の他の実施例は、ヒト対象から臨床サンプルを獲得する工程と、臨床サンプル上で核酸ハイブリダイゼーション分析を行う工程と、ヒト対象からの臨床サンプルにおいてパピローマウイルスゲノムの存在を検出する工程と、初期パピローマウイルス性タンパク質の初期組み換え型タンパク質を用いて、臨床サンプルにおける初期パピローマウイルス性タンパク質に対する抗体の存在または初期パピローマウイルス性タンパク質の存在を検出する工程と、後期パピローマウイルス性タンパク質の後期組み換え型タンパク質を用いて、臨床サンプルにおける後期パピローマウイルス性タンパク質に対する抗体の存在または後期パピローマウイルス性タンパク質の存在を検出する工程を有する。

20

【0118】

本願明細書で記載するような1個以上の診断的免疫学的分析はまた、本願明細書で記載して得られるような1個以上の組み換え型タンパク質に対して特異的なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および/または抗血清を得る工程と、HPVに関連するタンパク質および/または抗原を含みそうな臨床サンプルを取る工程と、それを獲得した1個以上の組み換え型タンパク質に対して特異的なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および/または抗血清と反応させる工程と、適切な検出システムによっていずれかの抗体-抗原複合体の存在を分析する工程を有する。適切な検出システムは、各免疫学的分析において二次抗体に対して特異な発色、化学発光、蛍光基質などを用いる。

【0119】

HPV感染の初期診断は、子宮頸癌の予防および治療に重要である。子宮頸がんを予防する方法は、過去もしくは現在のHPV感染および/または前癌病変を有する対象に加えて世界中で幅広い範囲で改良したHPV試験/スクリーニングを必要とする。重要なことに、12~15年間の女性におけるHPVの感染は侵襲性癌に発達する前に必要であることがわかっている。したがって、前癌を治療する化学療法または放射線に頼るよりも、HPV感染に対するバイオマーカーを分析して初期に女性を前もってスクリーニングし、初期にHPV感染を治療し、子宮頸癌への進行を予防することができるのが重要である。

30

【 図 1 A 】

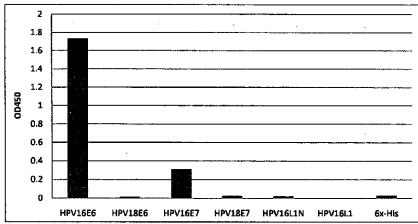


Figure 1A

【 図 1 B 】

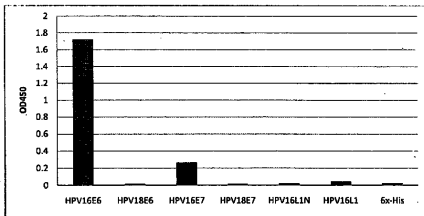


Figure 1B

【 図 2 A 】

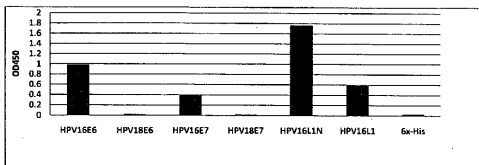


Figure 2A

【 図 3 B 】



Figure 3B

【 図 3 C 】



Figure 3C

【 図 4 A 】

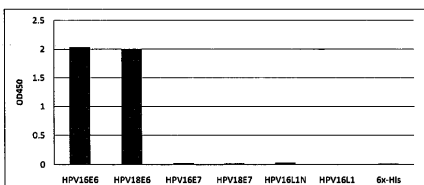


Figure 4A

【 図 2 B 】

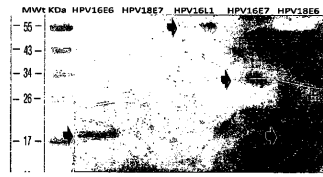


Figure 2B

【 図 2 C 】

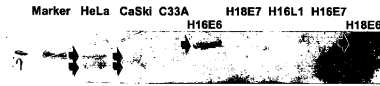


Figure 2C

【 図 3 A 】

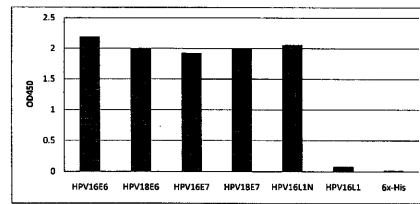


Figure 3A

【 図 4 B 】

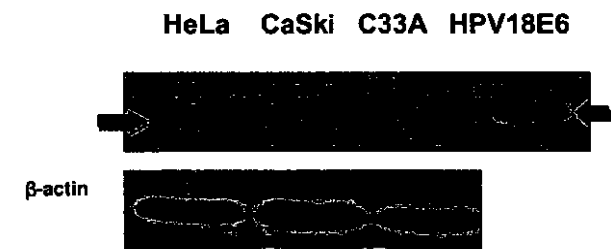


Figure 4B

【 図 5 】

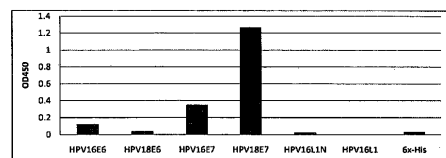


Figure 5

【 図 6 】

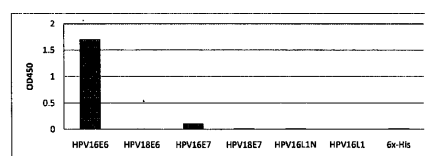


Figure 6

【 7 A 】

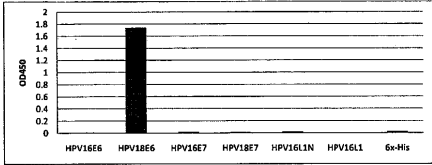


Figure 7A

【 9 】

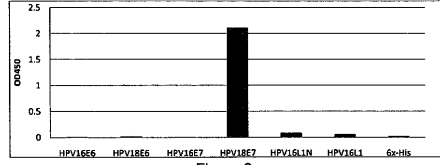


Figure 9

【 7 B 】

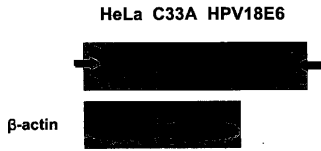


Figure 7B

【 10 A 】

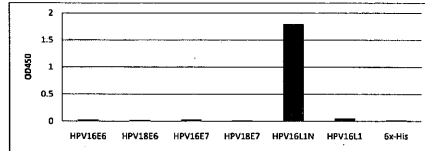


Figure 10A

【 8 】

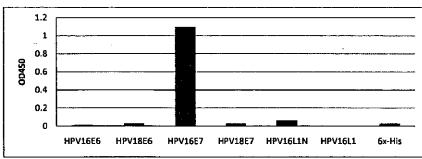


Figure 8

【 10 B 】

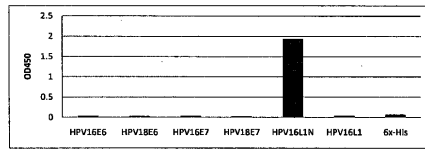


Figure 10B

【 11 】

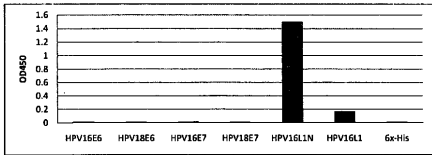


Figure 11

【 12 B 】

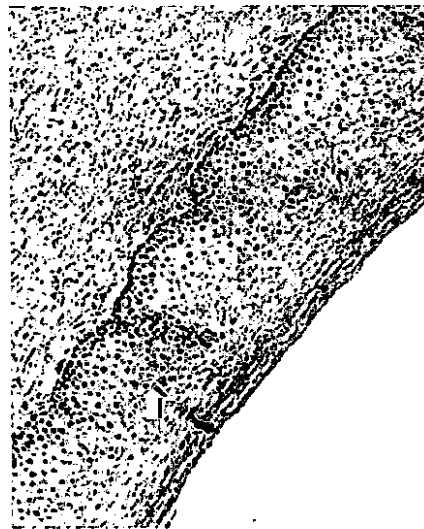


Figure 12B

【 12 A 】



Figure 12A

【 図 1 2 C 】

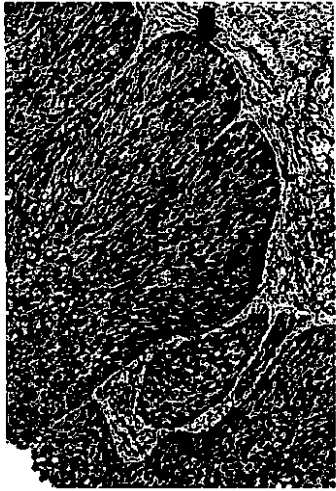


Figure 12C

【 図 1 2 D 】



Figure 12D

【 図 1 3 A 】



Figure 13A

【 図 1 3 B 】

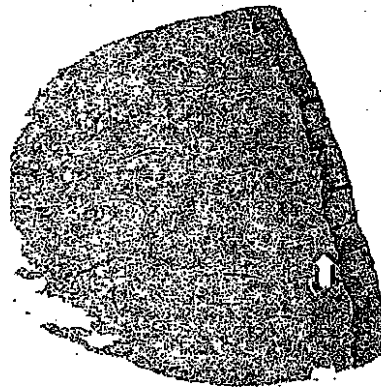


Figure 13B

【 図 1 3 C 】

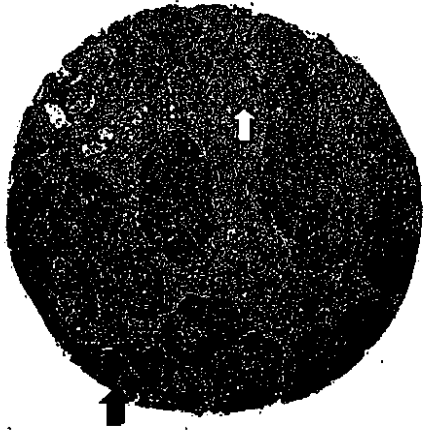


Figure 13C

【 図 1 3 D 】



Figure 13D

【 図 1 4 A 】



Figure 14A

【 図 1 4 B 】



Figure 14B

【 図 1 4 C 】



Figure 14C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/03538

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-22 are drawn to a method of producing a monoclonal antibody with binding specificity to two or more human papillomavirus viral proteins or a monoclonal with binding specificity to two or more human papillomavirus viral proteins.

Group II: Claims 23-26 are drawn to a monoclonal antibody capable of binding to only a first HPV viral protein, but not a second HPV viral protein different from the first HPV viral protein.

.....continued on extra sheet.....

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-22

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/03538

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

The groups listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The technical feature that links the listed Groups is a monoclonal antibody capable of binding to only a first HPV viral protein. However, this does not represent an improvement over the prior art of Ohmoto et al (US 5,183,755 A) who teach such a monoclonal antibody (abstract).

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/08 (2006.01) C 0 7 K 16/08

(31) 優先権主張番号 61/192,912

(32) 優先日 平成20年9月22日(2008.9.22)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA01 HA15
4B064 AG27 CA20 DA13
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 FA72 FA74

专利名称(译)	新型抗HPV蛋白单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2011523860A	公开(公告)日	2011-08-25
申请号	JP2011513505	申请日	2009-06-12
申请(专利权)人(译)	陈Schullin		
[标]发明人	チェンシュリン		
发明人	チェン シュリン		
IPC分类号	C12P21/08 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/574 C12N15/02 C07K16/08		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K16/084 C12Q1/708 G01N33/571 G01N2333/025 G01N2469/10		
FI分类号	C12P21/08 G01N33/531.A G01N33/577.B G01N33/574.C C12N15/00.C C07K16/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	杉村健二 铃木 一寿		
优先权	12/456054 2009-06-10 US 61/131991 2008-06-13 US 12/456053 2009-06-10 US 61/192912 2008-09-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的实施方案提供了用于检测HPV感染和HPV相关癌症诊断的方法，单克隆抗体，多克隆抗体，测定和试剂盒，包括各种HPV基因型，早期和/或晚期HPV相关或HPV特异性癌症的感染。获得识别特定HPV蛋白或HPV类型的特定表位的各种特异性或泛单克隆抗体，或各种HPV蛋白或HPV类型的共同表位。本发明还提供一种或多种固体表面以涂覆测试细胞裂解物。而且，抗HPV抗体可以包被在本发明的固体表面上以捕获HPV蛋白并检测HPV感染。

HPV E6タンパク質を検出するサンドウィッチELISA分析

コーティング抗体	抗HPV16&18 E6	抗HPV16&18 E6	抗HPV18 E6	抗HPV18 E6
試験タンパク質	組み換え型HPV18 E6	組み換え型HPV16 E6	組み換え型HPV18 E6	組み換え型HPV16 E6
検出抗体	抗HPV18 E6	抗HPV18 E6	抗HPV16 & 18 E6	抗HPV16 & 18 E6
ELISA結果 (OD450)	1.5	0.05	1.45	0.05