

(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2005-524076

(P2005-524076A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 1 1 D
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/569	L

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2004-501646 (P2004-501646)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成15年4月25日 (2003. 4. 25)		メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月16日 (2004. 12. 16)		MERCK & COMPANY INC OPERATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/012913		アメリカ合衆国, ニュージャージー, ロー ウエイ, イースト リンカーン アヴェニ ュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02003/093511	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年11月13日 (2003. 11. 13)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/376, 721	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成14年4月30日 (2002. 4. 30)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR , CA, JP, US		弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルス多重アッセイ

## (57) 【要約】

本発明は粒子フローサイトメトリー分析を利用して複数のHPV型に対する抗体の存在を同時に測定するイムノアッセイに関する。既知の型特異的蛍光標識中和モノクローナル抗体を特定HPV-VLP上のコンホメーション感受性中和エピトープとの結合に関して試験サンプル内の抗体と競合させる競合フォーマットで試験サンプル中の中和抗体の存在及び/又は力価を測定する。本発明はHPV-VLPと結合したマイクロスフェアを含むマイクロスフェアコンプレックスも提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体からのサンプル中で少なくとも 1 種のヒトパピローマウイルス (HPV) 型上の中和エピトープに対する抗体を検出する競合イムノアッセイであって、

(a) (i) 固有仕分化特性、および

(ii) 固有 HPV ウイルス様粒子 (VLP) 型に結合したマイクロスフェアと、VLP と結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体とを含むマイクロスフェアコンプレックスを各々含む少なくとも 1 個のマイクロスフェアセットを提供する段階；

(b) サンプル内の任意の抗体が VLP と結合できるように少なくとも 1 個のマイクロスフェアセットを該サンプルと接触させる段階；並びに

(c) 各マイクロスフェアセットについて、

(i) VLP と結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体の量；又は

(ii) VLP と結合しない検出可能に標識したモノクローナル抗体の量のいずれかを測定する段階、

を含む前記競合イムノアッセイ。

## 【請求項 2】

段階 (a) が複数のマイクロスフェアセットを提供する請求項 1 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 3】

マイクロスフェアセットの固有仕分化特性が固有スペクトル特性である請求項 2 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 4】

マイクロスフェアセットの固有仕分化特性が固有寸法である請求項 2 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 5】

被験体からのサンプル中の複数の HPV 型の各々に特異的な抗体力価を定量する段階を更に含む請求項 3 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 6】

型特異的 HPV VLP を複数のマイクロスフェアセットの各々と結合させる段階を更に含む請求項 5 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 7】

複数の HPV 型が HPV 6、HPV 11、HPV 16、HPV 18、HPV 31、HPV 33、HPV 35、HPV 39、HPV 45、HPV 51、HPV 52、HPV 55、HPV 56、HPV 58、HPV 59、及び HPV 68 から構成される群から選択される請求項 2 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 8】

複数の HPV 型が HPV 6、HPV 11、HPV 16 及び HPV 18 から構成される請求項 7 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 9】

サンプルが血清から構成される請求項 3 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 10】

検出可能に標識したモノクローナル抗体の結合が阻害されるか否かを調べ、抗体力価を定量するために UMINEX 100 アナライザーを使用する請求項 5 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 11】

検出可能に標識したモノクローナル抗体の結合が阻害されるか否かを調べ、抗体力価を定量するためにフローサイトメーターを使用する請求項 5 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 12】

モノクローナル抗体をフィコエリトリンで標識する請求項 3 に記載の競合イムノアッセイ。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

検出抗体が H 6 . B 1 0 . 5、H 1 1 . B 2、H 1 6 . V 5、及び H 1 8 . J 4 から構成される請求項 8 に記載の競合イムノアッセイ。

## 【請求項 14】

ヒトパピローマウイルス (HPV) ウイルス様粒子 (VLP) と結合したマイクロスフェアを含むマイクロスフェアコンプレックス。

## 【請求項 15】

VLP と結合した検出可能に標識したモノクローナル抗体を更に含む請求項 14 に記載のマイクロスフェアコンプレックス。

## 【請求項 16】

モノクローナル抗体がフィコエリトリンで検出可能に標識されている請求項 15 に記載のマイクロスフェアコンプレックス。

## 【請求項 17】

HPV VLP 型が HPV 6、HPV 11、HPV 16 及び HPV 18 から構成される群から選択される請求項 15 に記載のマイクロスフェアコンプレックス。

## 【請求項 18】

被験体からの血清サンプル中でヒトパピローマウイルス (HPV) 6、11、16 及び 18 型上の中和エピトープに対する抗体を検出する競合イムノアッセイであって、

(a) (i) 固有スペクトル特性、および

(ii) 固有 HPV VLP 型に結合したマイクロスフェアと、VLP と結合しフィコエリトリンレポーター分子で標識したモノクローナル抗体とを含むマイクロスフェアコンプレックスを各々含む 4 個の蛍光マイクロスフェアセットを提供する段階、ここで第 1 のマイクロスフェアセットを HPV 6 VLP と結合し、第 2 のマイクロスフェアセットを HPV 11 VLP と結合し、第 3 のマイクロスフェアセットを HPV 16 VLP と結合し、第 4 のマイクロスフェアセットを HPV 18 VLP と結合する；

(b) サンプル内の任意の抗体が VLP と結合できるように 4 個のマイクロスフェアセットを該血清サンプルと接触させる段階；並びに

(c) 各マイクロスフェアセットについて、

(i) VLP と結合するフィコエリトリン標識化モノクローナル抗体の量；又は

(ii) VLP と結合しないフィコエリトリン標識化モノクローナル抗体の量のいずれかを測定し、検出抗体の結合が阻害された場合には、HPV 6、11、16 又は 18 に特異的な抗体が該血清サンプル中に存在すると判定する段階、

を含む前記競合イムノアッセイ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は一般にはヒトパピローマウイルス (HPV) の分野、特に臨床試料中の HPV 抗体の存在の検出方法に関する。より具体的には、本発明は複数の HPV 型に特異的な抗体を同時に検出及び定量する多重競合イムノアッセイに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

80 種を上回るヒトパピローマウイルス (HPV) 型が記載されており、その多くは良性増殖性疣贅から悪性癌腫に至る多様な生物学的表現型に結び付けられる (McMurray ら, Int. J. Exp. Pathol. 82 (1) : 15 - 33 (2001) 参照)。HPV 6 と HPV 11 は最も一般に良性疣贅に関連する型であり、HPV 16 と HPV 18 は悪性病変に関連することが最も多いハイリスク型である。子宮頸癌の 90% 以上が HPV 16、HPV 18 又は低有病率の発癌性 HPV 31、33、45、52 及び 58 型の感染に結び付けられている (Schiffman ら, J. Natl. Cancer Inst. 85 (12) : 958 - 64 (1993))。HPV DNA が子宮頸癌の 90% 以上で検出されるという知見は HPV が子宮頸癌の原因であるという強力な疫学的証

10

20

30

40

50

抛となる (Boschら, J. Natl. Cancer Inst. 87(11):796-802(1995) 参照)。

#### 【0003】

HPVに対する有効なワクチンは子宮頸部異形成及び癌腫の発生とそれに関連する疾病率及び死亡率を抑制することが必要である。低リスクと高リスクの両方のHPV型に対するワクチンが現在臨床試験中である。臨床試験中で数種のHPV型に対するHPV型特異的抗体の存在を測定できることは見込みのあるワクチンの効力をモニターするためと自然誌感染研究の両方に有用であろう。

#### 【0004】

HPVに対する中和抗体の定量方法としては、*in vivo* 中和アッセイ、*in vitro* 擬似中和アッセイ、競合ラジオイムノアッセイ (cRIA)、及び酵素結合イムノソルベント法 (ELISA) 等の数種の方法が開発されている。しかし、これらの技術は各々大規模ワクチン臨床試験及び自然誌研究用として多数の患者血清の試験を阻む1種以上の制約がある。

#### 【0005】

最も一般的な中和HPV抗体力価の測定技術は無胸腺マウス異種移植システムである (Bryanら, J. Med. Virol. 53(3):185-88(1997); Kreiderら, Nature 317(6038):639-41(1998))。このアッセイでは、個体からの血清を感染性HPVと混合し、包皮組織に加えた後、無胸腺マウスの腎臓被膜下に移植する。移植片の組織学的変化とHPV DNAを *in situ* ハイブリダイゼーションによりモニターする。このような組織学的変化が出現するには数カ月を要するので、この方法は高スループット分析には適していない。

#### 【0006】

無胸腺マウス異種移植システムで多数の血清を試験するのは技術的に困難であるので、中和抗体力価と非中和抗体力価を測定するための数種の相補的アッセイが開発されている。これらのアッセイとしては、*in vitro* 擬似中和アッセイ (Bryanら, 前出; Rodenら, J. Virol. 70(9):5875-83(1996))、競合RIA (Palckerら, Vaccine 19(27):3733-43(2001)) 及びウイルス様粒子 (VLP) に基づくELISA (Wideroffら, J. Infect. Dis. 172(6):1425-30(1995)) が挙げられる。擬似中和アッセイはHPV-VLP ELISAの20~30倍弱い感度であり (Nardelli-Haeffligerら, J. Virol., 73(11):9609-13(1999))、競合RIA (Palckerら, 前出) と比較すると100倍まで弱いことが報告されている。他方、ELISAに基づくアッセイは一度に1種類の分析物しか検出できないので、数種のHPV型に対する抗体力価の検出と定量が望ましい多数の臨床試料の分析には非実用的である。

#### 【0007】

最近、粒子フローサイトメトリーアッセイを使用して複数の分析物を同時に測定する方法が開発されている。このアプローチは種々の抗原に特異的な抗体を含む多数の型の可溶性分析物を測定し、種々の受容体の細胞表面発現を定量するために使用されている (Vignali, J. Immunol. Methods 243:243-255(2000) 参照)。Schlottmanらは肺炎コンジュゲートワクチンに対する抗体応答を測定するために肺炎球菌ワクチン試験でこの方法を使用した (Martins, Clin Diagn Lab Immunol: 9(1):41-45(2002))。Bellisarioらは新生児乾燥血斑検体でHIV-1抗原p24、gp160及びgp120に対する抗体を同時に測定するための粒子フローサイトメトリーアッセイを開発した (Early Human Devel. 64:21-25(2001))。これらの研究はいずれも所望分析物を試料中で直接検出する単純捕獲型アッセイを利用していた。

#### 【0008】

上記イムノアッセイが開発されているが、中和エピトープに対するHPV型特異的抗体

を測定するためのアッセイとして、感度と再現性が高く、当分野で開示されている方法よりも必要な人的投入時間数の少ないアッセイが開発されるならば有利であろう。連続実験を必要とする単一血清学的アッセイよりも数種のHPV型に対するHPV型特異的抗体を同時に測定するイムノアッセイが好ましい。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は粒子フローサイトメトリー分析を利用して複数のHPV型に対する抗体の存在を検出するイムノアッセイに関する。既知の型特異的な検出可能に標識した中和モノクローナル抗体を、HPV VLP上のコンホメーション感受性中和エピトープとの結合に關して試験サンプル内の抗体と競合させる競合フォーマットで、中和抗体の存在及び/又は力価を測定する。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

より具体的には、本発明は被験体からのサンプル中で少なくとも1種のヒトパピローマウイルス（HPV）型上の中和エピトープに対する抗体を検出する競合イムノアッセイであって、(a) (i) 固有仕分化特性、および(ii) 固有HPVウイルス様粒子（VLP）型に結合したマイクロスフェアと、VLPと結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体とを含むマイクロスフェアコンプレックスを各々含む少なくとも1個のマイクロスフェアセットを提供する段階；(b) サンプル内の任意の抗体がVLPと結合できるように少なくとも1個のマイクロスフェアセットを該サンプルと接触させる段階；並びに(c) 各マイクロスフェアセットについて、(i) VLPと結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体の量；又は(ii) VLPと結合しない検出可能に標識したモノクローナル抗体の量のいずれかを測定する段階、を含む競合イムノアッセイに関する。

20

【0011】

本発明は更に被験体からのサンプル中の複数のHPV型に対する中和抗体を検出する競合イムノアッセイであって、Luminex Laboratory MultiAnalyte Profiling Technology (LabMAP (登録商標), Luminex Corp., Austin, TX) をLUMINEX 100 (登録商標) デスクトップアラナイザーと併用して、単一血清サンプルからの複数のHPV型に対する抗体を同時に測定する競合イムノアッセイに関する。本発明の1好適態様では、複数の別個の蛍光Luminexマイクロスフェアに結合した酵母由来VLPを使用する。型特異的HPV-VLP抗体(Ab) 応答はLUMINEX 100 (登録商標) で夫々の別個の赤及び赤外蛍光色素スペクトル特性により識別される特定Luminexマイクロスフェアと関連付けられる(Fultonら, Clin. Chem. 43(9): 1749-56 (1997))。既知のHPV型特異的フィコエリトリン(PE)で標識した中和検出抗体を、VLP上のコンホメーション感受性中和エピトープとの結合に關して患者血清抗体と競合させる、競合フォーマットで中和抗体力価を測定する。本発明の方法はヒト血清中でHPV型特異的抗体を高い確度と精度で同時に測定する。

30

【0012】

本発明は更に被験体からの血清サンプル中でヒトパピローマウイルス（HPV）6、11、16及び18型上の中和エピトープに対する抗体を検出する競合イムノアッセイであって、(a) (i) 固有スペクトル特性、および(ii) 固有HPV VLP型に結合したマイクロスフェアと、VLPと結合しフィコエリトリンレポーター分子で標識したモノクローナル抗体とを含むマイクロスフェアコンプレックスを各々含む4個の蛍光マイクロスフェアセットを提供する段階、ここで第1のマイクロスフェアセットをHPV6 VLPと結合し、第2のマイクロスフェアセットをHPV11 VLPと結合し、第3のマイクロスフェアセットをHPV16 VLPと結合し、第4のマイクロスフェアセットをHPV18 VLPと結合する；(b) サンプル内の任意の抗体がVLPと結合できるように4個のマイクロスフェアセットを該血清サンプルと接触させる段階；並びに(c) 各マイクロスフェアセッ

40

50

トについて、(i) VLPと結合するフィコエリトリン標識化モノクローナル抗体の量；又は(ii) VLPと結合しないフィコエリトリン標識化モノクローナル抗体の量のいずれかを測定し、検出抗体の結合が阻害された場合には、HPV6、11、16又は18に特異的な抗体が該血清サンプル中に存在すると判定する段階、を含む競合イムノアッセイに関する。

【0013】

本発明は更にHPVウイルス様粒子(VLP)と結合したミクロスフェアを含むミクロスフェアコンプレックスに関する。本発明の1好適態様において、ミクロスフェアコンプレックスは更にVLPと結合した検出可能に標識したモノクローナル抗体を含む。

【0014】

本明細書及び特許請求の範囲において使用する単数形は、そうでないことが文脈から明白に読み取れる場合を除いて複数形も含む。

【0015】

本明細書及び特許請求の範囲では以下の定義と略語を適用する。

【0016】

「複数」とは2以上を意味する。

【0017】

「HPV」とはヒトパピローマウイルスを意味する。「HPV」は現在公知であるか今後記載されるかを問わずにHPVの任意サブタイプを表すために使用する一般用語である。

【0018】

「ミクロスフェア」とは本発明の方法で使用する特定HPV-VLPと共有結合又は他の方法で結合することが可能な小粒子を意味する。ミクロスフェア、粒子、微粒子、ビーズ又はマイクロビーズなる用語は同義に使用し、等価の意味を有する。

【0019】

「ミクロスフェアセット」とはセットの一部として同定させ、別のミクロスフェアセットを含むミクロスフェアからの区別を規定する「固有仕分化特性」を共有する複数のミクロスフェアを意味する。「固有仕分化特性」は例えばフローサイトメーターにより検出することができ、ミクロスフェアセットを相互に区別する基礎として寄与する。典型的な「固有仕分化特性」はビーズの寸法である。ビーズ寸法を固有仕分化特性として選択する場合には、特定ミクロスフェアセット内の全ビーズは比較的同一寸法でなければならず、この特定ミクロスフェアセット以外の全ビーズは別の寸法でなければならない。

【0020】

あるいは、ミクロスフェアセットを異なる割合の2種以上の蛍光色素で標識し、発光波長と蛍光強度を固有仕分化特性として機能させてもよい。例えば、実施例3では、HPV VLP6、11、16及び18をLuminex Corp. (Austin, TX) 製品である固有ミクロスフェアセットと各々結合した。識別可能な固有ミクロスフェアセットを開発するに当たり、Luminexは2種の蛍光色素の割合を変化させることによりビーズ集団を内部的に色コード化した。固有ミクロスフェアセットを使用してサンプル中の種々の分析物、即ち抗体を検出すると、固有仕分化特性を検出することが可能な計器により分析物を分離することができる。例えば、蛍光標識ミクロスフェアセットの場合には、あるミクロスフェアセットからのビーズを別のセットに属するビーズから仕分け又は分離し、フローサイトメーターにより定量することができる。

【0021】

本発明の方法では、各ミクロスフェアセットは「固有HPV VLP型」に結合した複数のミクロスフェアを含み、即ち、各ミクロスフェアセットは別のミクロスフェアセットに連結するHPV VLP型とは異なる特定HPV VLP型に連結する複数のミクロスフェアを含む。しかしながら、単一ミクロスフェアセットは単一HPV VLP型を含む。

【0022】

10

20

30

40

50

「マイクロフェアコンプレックス」は本明細書では「VLP-マイクロフェア」及び「VLP-マイクロフェアコンプレックス」と同義に使用し、HPV VLPに結合したマイクロフェアを意味する。例えば、実施例3に示すように、マイクロフェアコンプレックスはLabMAP（登録商標）技術と併用するものとしてLuminexから市販されているLuminexビーズ138をHPV16由来VLPと結合したものを利用できる。あるいは、当業者は当分野で公知であるか又は今後同定される任意ビーズ又はマイクロ粒子を任意HPV型に由来するHPV VLPと結合したものも利用できる。マイクロフェアコンプレックスは更にVLPと結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体も含むことができる。

【0023】

1又は複数の「VLP」は1又は複数のウイルス様粒子を意味する。ウイルス様粒子はヒト及び動物のパピローマウイルスの主要キャプシド蛋白質であるL1が酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞又は細菌で発現されるときに自己アセンブリすることができる（Schiller and Roden, in Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses; Lacey, ed. Leeds, UK: Leeds Medical Information, pp101-12 (1996) 参照）。L1及びL2キャプシド蛋白質の組合せを発現させることにより、形態的に区別できないHPV VLPを生産することもできる。VLPはT=7で二十面体構造のL1の72個の五量体から構成される（Bakerら, Biophys. J. 60(6):1445-56 (1991)）。

【0024】

VLPは真正ビリオンと形態的に類似しており、動物に投与すると、高い中和抗体力価を誘導することができる。ウサギ（Breitburdら, J. Virol. 69(6):3959-63 (1995)）とイヌ（Suzichら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(25):11553-57 (1995)）をVLPで免疫すると、いずれも中和抗体を誘導し、実験パピローマウイルス感染から防御できることが示されている。他方、VLPは潜在発癌ウイルスゲノムを含まず、単一遺伝子から自己アセンブリすることができるので、HPVワクチン開発において生きたウイルスに代わる安全な代用品である（Schiller and Hidesheim, J. Clin. Virol. 19:67-74 (2000) 参照）。

【0025】

「PE」とは蛍光ラベルであるフィコエリトリンを意味する。

【0026】

「CV」又は「%CV」とは変動係数を意味する。

【0027】

「MFI」とは蛍光強度中央値を意味する。

【0028】

「Ab」と「mAb」は夫々「抗体」と「モノクローナル抗体」を意味する。

【0029】

「検出抗体」又は「検出Ab」とは本発明の競合アッセイで使用されるマイクロフェアコンプレックスと結合した検出可能に標識したHPV型特異的抗体を意味する。検出抗体はマイクロフェアコンプレックスの一部を構成する型特異的VLPと結合する。本発明の競合イムノアッセイは、検出抗体と夫々のVLP上のコンホメーション感受性中和エピトープとの結合を置き換えることが可能な患者サンプル中のポリクローナルAbの力価を測定する。結合したHPV特異的検出Abからの蛍光シグナルは患者の中和Ab力価に反比例する。

【0030】

「レポーター分子」は「蛍光タグ」、「蛍光レポーター分子」、「レポーター蛍光色素」、又は「検出可能なタグ」としても知られ、特定抗体と結合するか、その存在を証明するか、又はその定量を可能にする蛍光剤を意味する。レポーター分子は例えばフィコエリ

10

20

30

40

50

トリンとすることができる。

【0031】

本明細書で使用する「CL1」及び「CL2」は夫々分類1及び分類2を意味する。本発明の1つの例示的態様では、CL1は658nmでのLuminesxマイクロスフェアからの発光スペクトルを意味し、CL2は712nmでの発光スペクトルを意味する。Luminesx計器は2種の分類の波長を測定し、どちらのマイクロスフェアが分析されているかを判定する。

【0032】

「cRIA」は競合ラジオイムノアッセイを意味する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

全ワクチンプログラムの共通の目的は臨床的に関連する防御相関を同定することである。具体的には、臨床的疾患からの防御に関連することが示されている実験パラメーターを同定する必要がある。多くの感染性疾患では、中和抗体(Ab)アッセイを使用して予防ワクチンの免疫原性を評価する。

【0034】

従って、本発明は被験体からのサンプル中で少なくとも1種のヒトパピローマウイルス(HPV)型上の中和エピトープに対する抗体を検出する競合イムノアッセイであって、(a)(i)固有仕分化特性、および(ii)固有HPVウイルス様粒子(VLP)型に結合したマイクロスフェアと、VLPと結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体とを含むマイクロスフェアコンプレックスを各々含む少なくとも1個のマイクロスフェアセットを提供する段階；(b)サンプル内の任意の抗体がVLPと結合できるように少なくとも1個のマイクロスフェアセットを該サンプルと接触させる段階；並びに(c)各マイクロスフェアセットについて、(i)VLPと結合する検出可能に標識したモノクローナル抗体の量；又は(ii)VLPと結合しない検出可能に標識したモノクローナル抗体の量のいずれかを測定する段階、を含む競合イムノアッセイに関する。

【0035】

本発明の方法では、HPV型特異的VLPに対する検出可能に標識したモノクローナル抗体の結合が阻害されるか又は結合量が低下した場合に、このHPV型に特異的なHPV型特異的中和エピトープに対する抗体が被験体のサンプル中に存在すると判定する。結合したHPV特異的検出mAbからの蛍光シグナルは被験体の中和抗体力価に反比例する。

【0036】

本発明の方法は少なくとも1個のマイクロスフェアセットを用いて実施することができる。当業者は患者又は被験体サンプル中のスクリーニングすべきHPV型特異的抗体の数に応じてマイクロスフェアセットの数を変えることができる。サンプル内の複数のHPV型に対する抗体を同時に検出するためには複数のマイクロスフェアセットを使用することが好ましい。

【0037】

「同時に」又は「一度に」とは、サンプル中に存在する異なるHPV型を示す複数のHPV型特異的抗体の存在及び/又は力価を単一実験プロトコールで検出できることを意味する。換言するならば、当業者はアッセイプレートの単一ウェルで1組の試薬で、2種以上のHPV型に対するHPV抗体の存在及び/又は量を測定することができる。例えば、本発明の方法によると、当業者は96ウェルプレートの単一ウェルで適当な試薬と試験サンプルと興味あるHPV型を検出するように設計されたマイクロスフェアセットを混合することにより、試験サンプル中のHPV6、11、16及び18型抗体の存在を同時に検出することができる。このような場合には、アッセイプレートで試験サンプルの4個の別個のアリコート又は4個の別個のウェルを使用する必要なしに、単一実験でHPV6、11、16及び18型に関する結果を得ることができる。従って、本発明の方法によると、当業者は従来技術の方法で必要だった連続実験の必要なしに、サンプル中の2種以上のHPV型に対する抗体をスクリーニングできるという利点がある。

10

20

30

40

50

## 【0038】

本発明の1好適態様では、上記競合イムノアッセイは被験体からのサンプル中の複数のHPV型の各々に特異的な抗体力価を定量する段階を更に含む。

## 【0039】

本発明の別の態様では、競合イムノアッセイは型特異的HPV VLPを複数の蛍光マイクロスフェアセットの各々に結合する段階を更に含む。

## 【0040】

本発明の方法は上述のように、単一サンプル中の複数の興味あるHPV型を同時に検出できるという利点がある。本明細書に開示するアッセイでHPV型の任意の組合せを検出できるという融通性に加え、本発明の方法はウイルス負荷測定やサイトカインアッセイ等の他のアッセイを同一試験に追加することもできる。本発明によると、更に当業者は所望により単一試験サンプルで複数のHPV型に対する抗体を同時に容易に定量することができる。

10

## 【0041】

VLPの捕獲アッセイは中和エピトープ及び非中和エピトープの両者に対する抗体と潜在的に酵母由来蛋白質に対する他の抗体の組合せを測定するので、本発明の多重競合イムノアッセイは単一捕獲アッセイフォーマットを利用する従来技術の方法の改良である。本発明の方法のように競合イムノアッセイを使用すると、より高い特異性と再現性を確保することができる。競合フォーマットでは、高濃度のサンプルを試験して低力価HPV型特異的抗体を試験することもできる。

20

## 【0042】

更に、本発明の新規方法は従来技術の方法よりも小容量のサンプルでサンプルのHPV抗体状態を正確且つ迅速に試験することができる。本発明の方法の1典型的態様では、被験体からの僅か50µlの血清を使用して数種のHPV型に対する抗体の存在を測定した(実施例4参照)。単一サンプルで多数のHPVアッセイを同時に実施することができるので、本発明の方法は労力、高価な試薬(例えば小児血清)及び消耗品を節約することができる。更に、本発明は特異性を確保するために各サンプルで内部対照を使用することができる。本発明は更に実験者に安全な非放射性物質で抗体を検出できるという利点もある。

## 【0043】

本発明で使用するHPV型は任意複数の興味あるHPV型とすることができ、文献に記載されているか又は今後同定される任意HPV型を含む。例えば、HPV型としては限定されないが、HPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV55、HPV56、HPV58、HPV59、及びHPV68が挙げられる。

30

## 【0044】

本発明の方法は開発中のワクチン候補に含まれるHPV型と興味あるHPV型を相関させて見込のあるHPVワクチンの効力をモニターするように適合させることができる。このような場合には、興味あるHPV型は発癌又は他の望ましくない表現型に関連する型とすることができる。従って、本発明の1典型的態様はHPV6、HPV11、HPV16及びHPV18を含む複数のHPV型を提供する。

40

## 【0045】

この点で、本発明は更に被験体からの血清サンプル中でヒトパピローマウイルス(HPV)6、11、16及び18型上の中和エピトープに対する抗体を検出する競合イムノアッセイであって、(a)(i)固有スペクトル特性、および(ii)固有HPV VLP型に結合したマイクロスフェアと、VLPと結合しフィコエリトリンレポーター分子で標識したモノクローナル抗体とを含むマイクロスフェアコンプレックスを各々含む4個の蛍光マイクロスフェアセットを提供する段階、ここで第1のマイクロスフェアセットをHPV6 VLPと結合し、第2のマイクロスフェアセットをHPV11 VLPと結合し、第3のマイクロスフェアセットをHPV16 VLPと結合し、第4のマイクロスフェアセットをHPV

50

18 VLPと結合する；(b) サンプル内の任意の抗体がVLPと結合できるように4個のマイクロスフェアセットを該血清サンプルと接触させる段階；並びに(c) 各マイクロスフェアセットについて、(i) VLPと結合するフィコエリトリン標識化モノクローナル抗体の量；又は(ii) VLPと結合しないフィコエリトリン標識化モノクローナル抗体の量のいずれかを測定し、検出抗体の結合が阻害された場合には、HPV6、11、16又は18に特異的な抗体が該血清サンプル中に存在すると判定する段階、を含む競合イムノアッセイに関する。

**【0046】**

本発明で使用するHPV VLPは適当な宿主細胞(例えば哺乳動物及び昆虫宿主細胞)で*in vivo*産生させてもよいし、組換えL1蛋白質の精製により自然に形成されるものでもよい。本発明の1典型的態様では、VLPは酵母*Saccharomyces cerevisiae*のライゼートから精製される。

10

**【0047】**

本発明は被験体からのサンプル中のHPV型特異的抗体の存在の測定方法に関する。当業者に自明の通り、HPV型に対する中和抗体を含み得る興味ある被験体からの任意体液を本発明の目的でサンプル源として使用することができた。例えば、本発明の方法で使用されるサンプルとしては限定されないが、血清、血漿、全血、脳脊髄液、骨髓吸引物、リンパ節懸濁液又は尿が挙げられる。本発明の1好適態様では、サンプルは被験体からの血清から構成される。

**【0048】**

本発明で使用されるマイクロスフェアは粒子フローサイトメトリー分析で使用するためにHPV VLPを結合させることが可能な任意の粒子又はビーズとすることができ、Luminex Corp. (Austin, TX)、及びBecton Dickinson (San Jose, CA)等の数社から市販されている。マイクロスフェアは粒径範囲0.01~100µmが好ましく、約1µm~約20µmがより好ましい。

20

**【0049】**

単一マイクロスフェアセット内のマイクロスフェアはほぼ同一寸法であることが好ましい。異なるマイクロスフェアセットからのビーズは同一寸法でもよいし、寸法を変えてその寸法を識別パラメーター又は固有仕分化特性として本発明の方法で使用してもよい。ほぼ同一寸法のマイクロスフェアを含むマイクロスフェアセットはフローサイトメーターにより検出可能な別のパラメーター(例えば固有スペクトル特性)に基づき区別することができる。

30

**【0050】**

前記マイクロスフェアは検出計器による検出のためにVLPを結合することができる任意材料から構成することができる。例えば、マイクロスフェアを構成するのに許容可能な材料としては限定されないが、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリアクリルアミド、ポリアクロレイン、ポリブタジエン、ポリジメチルシロキサン、ポリイソブレン、ポリウレタン、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピリジン、ポリビニルベンジルクロリド、ポリビニルトルエン、ポリ塩化ビニリデン、ポリジビニルベンゼン、ポリメタクリル酸メチル、又はその組合せが挙げられる。本発明の1好適態様では、マイクロスフェアはポリスチレンから構成される。

40

**【0051】**

マイクロスフェアは本発明のVLP等の分析用反応体を結合するのに有用な追加的な官能基を場合により含むことができる。前記官能基としては限定されないが、カルボキシレート、エステル、アルコール、カルバミド、アルデヒド、アミン、酸化硫黄、酸化窒素、又はハロゲン化物が挙げられる。前記官能基を含むマイクロスフェアは市販されている。例えば、Luminex Corporationは同社のLabMAP(登録商標)技術で使用するためのカルボキシル化マイクロスフェアを市販している。マイクロスフェアをカルボキシル化すると、簡単な化学技術を使用してVLPと共有結合できる。

**【0052】**

フローサイトメーター又は他の検出計器により検出及び/又は定量することが可能な任

50

意特徴又はパラメーターを、検出計器による粒子仕分け又は選別する基礎とすることができる。前記パラメーターはVLP-マイクロフェアセットを相互に区別するための手段となり、従って、同一サンプル内のHPV VLP集団を別々に検出及び定量することができる。本発明の1好適態様では、マイクロフェアセットを規定する「固有仕分化特性」は固有スペクトル特性である。

**【0053】**

本発明の方法では任意の興味あるHPV VLP上のコンホメーション感受性中和エピトープと結合することが可能な任意モノクローナル抗体を検出抗体として使用することができる。in vivo中和アッセイ及びin vitro擬似中和アッセイにより示されるようにHPVウイルスを中和する数種のモノクローナル抗体が既に文献に記載されている(例えばChristensenら, *Virology* 224(2):477-86(1996)参照)。

10

**【0054】**

更に、当業者に自明の通り、本発明で使用されるモノクローナル抗体はHPV VLP、ポリペプチド、蛋白質又はその部分を抗原として使用する当分野で公知の方法により生産することができる。例えば、モノクローナル抗体は本明細書中に参考として援用されているHarlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory(1988))に記載されているように生産することができる。抗原として使用されるHPVポリペプチドは天然源から単離することもできるし、(市販合成器を使用して)合成することもできる。HPV VLPを抗原として使用して本発明で使用されるモノクローナル抗体を生産することが好ましい。

20

**【0055】**

本発明の1好適態様では、夫々HPV6、HPV11、HPV16及びHPV18に特異的なH6.B10.5、H11.B2、H16.V5、及びH18.J4モノクローナル抗体を検出抗体として使用する(Christensenら, *Virology* 224(2):477-86(1996); Christensenら, *J. Virol.* 64(11):5678-81(1990); Christensenら, *Virology* 223(1):174-84(1996);及びYeagerら, *Virology* 278(2):570-77(2000)参照)。

30

**【0056】**

本発明の方法で使用されるモノクローナル検出抗体はフローサイトメーター又は他の検出計器により検出することが可能な任意分子(以下、「レポーター分子」と言う)で標識することができる。従って、前記計器により検出可能な範囲内で発光するレポーター分子を選択する必要がある。本発明で使用される計器はレポーター分子の必要な発光波長を指令する既知励起波長を有する励起手段(例えばレーザー)を含む。例えば、LUMINEX 100(登録商標)(Luminex Corp., Austin, TX)検出計器は532nmの励起波長を有するアルゴンレーザーを含む。この励起波長に基づき、本発明で使用するためにLUMINEX 100(登録商標)を使用することを選択した当業者は575nm又はその付近で発光するレポーター分子を選択する必要がある。従って、励起手段を変えることにより、より多様なレポーター分子を使用できる。

40

**【0057】**

本発明の1好適態様では、モノクローナル抗体を蛍光レポーター分子で標識する。当業者に自明の通り、本発明の方法で使用されるHPV型特異的mAbを標識するためのレポーター分子としては、検出計器により検出及び/又は定量することが可能な任意の蛍光分子を使用することができる。上述のように、検出計器の励起手段と検出手段に応じて利用可能なレポーター分子の選択を指令する。レポーター分子としては限定されないが、イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)、フィコエリトリン(PE)、サイトフルオロタンジェリン、Alexa(登録商標)532及びAlexa(登録商標)546(Molecular Probes, Eugene, OR)、シアニン3(Cy3)、シアニン

50

5 (Cy5)、シアニン5.5 (Cy5.5; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、リサミン・ローダミンB、イソチオシアン酸テトラメチルローダミン (TRITC)、スルホローダミンB、BODIPY-TMR-X (Molecular Probes)、PBXL-1 (Martek Biosciences, Columbia, MD)、テキサスレッド-アビジン (Molecular Probes)、ストレプトアビジン、C-フィコシアニン、R-フィコシアニンII、アロフィコシアニン (APC) (例えばAPC-B)、ペリジニククロフィル蛋白質 (PerCP)、カスケードブルー、クマリンが挙げられる。本発明の方法に関連して利用可能な他の蛍光レポーターは当分野で周知である (例えば、参考として本明細書中に援用されている Shapiro, H.M., Practical Flow Cytometry, Third edition. New York: Wiley-Liss, 1995 参照)。

10

**【0058】**

本明細書に開示する新規方法の1好適態様では、HPV型特異的検出mAbを蛍光レポーター分子フィコエリトリン (PE) で標識する。

**【0059】**

本発明は更に複数の天然HPV VLP型に対するHPV型特異的抗体力価を評価するためにLuminex Laboratory Multiple Analyte Profiling LabMAP (登録商標) 技術 (Luminex Corp., Austin, TX) を使用する定量的競合イムノアッセイに関する。この競合イムノアッセイは、患者血清中のHPV型特異的抗体が、蛍光標識化HPV型特異的中和検出mAbの結合を阻害するプロセスに基づく。結合したHPV特異的検出mAbからの蛍光シグナルは、患者の中和抗体力価に反比例する。結果は、夫々のVLP上のコンホメーション感受性型特異的中和エピトープとmAbの結合を阻止することが可能なAbの力価を反映する。

20

**【0060】**

LabMAP (登録商標) (Luminex Corp.; Austin, TX) システムはポリスチレン、ジビニルベンゼン及びメタクリル酸から構成される粒径5.6 µmのマイクロスフェアを使用する。LabMAP (登録商標) ミクロスフェアは蛋白質、多糖又は核酸と共有結合できるようにカルボキシル化されている。本発明で使用する場合には、LabMAPマイクロスフェアをHPV VLPと共有結合する。LabMAPマイクロスフェアは100個のスペクトル指向性マイクロスフェアセットが得られるように、Luminex Corp. (Austin, TX) から市販されている異なる割合の赤及び赤外発光蛍光色素を内部に含む。

30

**【0061】**

当業者に自明の通り、本発明の方法ではLabMAP (登録商標) システム以外にスペクトル指向性マイクロスフェアセットを含む他のシステムも使用することができる。このようなシステムはマイクロスフェアセットを規定するために固有の割合の2種以上の蛍光色素を使用して開発することができる。スペクトル指向性ビーズセットの開発方法は当分野で公知である。例えばWO99/19515、及び米国特許第5,723,218号参照。更に、蛍光ビーズは多数の業者から市販されており、限定されないが、Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, IN)、DynaL Particles AS (Oslo, ノルウェー)、及びPolymer Laboratories (Amherst, MA) から購入できる。

40

**【0062】**

本発明の1態様では、別個のスペクトル特性を有する異なるマイクロスフェアに関連する蛍光シグナルを分析することにより、複数のHPV型に対するHPV型特異的抗体応答を同時に検出する。マイクロスフェアセットの固有スペクトル指向性により、異なるマイクロスフェアセットを相互に区別することができる。

**【0063】**

50

特異的蛍光レポーターに結合したmAbにより発光される蛍光はフローサイトメーター、又は複数のマイクロスフェアセットを規定する固有特性を区別すると共に蛍光検出抗体の蛍光を検出することが可能な他の検出計器により検出することができる。ビーズ表面のHPV VLPを定量するために本発明の方法と組合して蛍光レポーター分子を使用する場合には、検出計器は検出抗体に結合したレポーター分子を励起する手段を含む必要がある。当業者が固有スペクトル特性により区別されるマイクロスフェアセットを使用するように選択する場合には、検出計器はスペクトル特性を区別する手段を含む必要がある。例えば、固有スペクトル特性に基づき区別されるマイクロスフェアセットは異なる割合の2種以上の蛍光色素から構成する必要がある。このような場合には、検出計器はマイクロスフェア内に蛍光色素を励起するための手段を含む必要がある。蛍光色素を励起するための手段としては限定されないが、アルゴン及びクリプトンイオンレーザー、ヘリウム-ネオンレーザー、ヘリウムカドミウムレーザー、ダイオードレーザー及びソリッドステートレーザー（例えばネオジム-YAGレーザー）が挙げられる。

10

#### 【0064】

本発明の典型的検出計器はフローサイトメーターである。フローサイトメトリーは生物学的粒子の特徴を測定するために使用されるレーザーに基づく技術である。フローサイトメトリーの基本原理は励起源からの光が移動中の粒子にぶつかるにつれて光が散乱され、蛍光が発生されるというものである。この技術の本発明の方法と組合せて使用すると、ビーズのスペクトル特性に基づいてマイクロスフェアセットを区別することができる。更に、被験体サンプル内の複数の興味あるHPV型に特異的なHPV特異的抗体の存在を検出及び定量することができる。

20

#### 【0065】

ビーズセットを区別し、検出抗体に結合した検出可能なタグとして使用される蛍光レポーター分子により発光される蛍光を測定するための自動フローサイトメーターは当分野で公知であり、この特定アッセイで使用するように応用することができる。本発明の方法で使用されるフローサイトメーターは数社から市販されており、The Luminex Corporation (Austin, TX; 例えばLUMINEX 100 (登録商標))、Becton Dickinson (San Jose, CA; 例えばFACScanサイトメーター)、Beckman Coulter (Fullerton, CA) 及びPartec GmbH (Munster, ドイツ) が挙げられる。

30

#### 【0066】

本発明の方法の1好適態様では、LUMINEX 100 (登録商標) ベンチトップ型アナライザーを使用してデータを獲得する (Luminex Corp.; Austin, TX)。この計器は分析ソフトウェアを従来のフローサイトメトリーと組合せたものであり、Luminex Corpにより提供されるLabMAP (登録商標) 技術で使用するよう特別に設計されている。Luminex計器流体工学はフローセルを通して単一ファイルにマイクロスフェアを送り、マイクロスフェアを赤レーザーと緑レーザーにより励起する。赤レーザーはマイクロスフェアの内側の蛍光色素を励起し、緑レーザーはレポーター蛍光色素を励起し、ビーズ表面のアッセイを定量する。

40

#### 【0067】

光ダイオードと光電子増倍管はマイクロスフェアから蛍光シグナルを受取る。Luminexアナライザーは波形をデジタル化し、シグナルをデジタルシグナルプロセッサに送ると、デジタルシグナルプロセッサは蛍光シグナルを蛍光強度単位に変換する。LabMAP (登録商標) 技術をLuminexアナライザーと併用すると、同一ウェル内で100個までの異なるアッセイを同時に検出することができる。

#### 【0068】

本発明のアッセイは洗浄段階を加えても加えなくても実施することができる。洗浄段階はVLP-マイクロスフェア、患者サンプル及び標識化検出抗体を2~18時間インキュベーションした後に実施され、PBS/1%BSA 250 µlで3回洗浄するのが一般的で

50

ある。洗浄段階を含むアッセイよりも無洗浄型粒子フローサイトメトリーアッセイのほうが迅速に実施できるという利点があるが、感度と精度は下がる。他方、無洗浄アッセイで血清濃度が高いと、LUMINEX 100（登録商標）等の検出計器が詰まり、VLP-マイクロスフェアの多くがその指定校正ゲートの外側になり、読出時間が1時間を超える可能性がある。従って、本発明の1好適態様では、多重競合イムノアッセイは洗浄段階を含む。

#### 【0069】

本発明は複数の異なるHPVサブタイプに特異的な中和エピトープに対する抗体を同時に検出する方法を提供し、単一HPV型の抗体を検出するように設計された個々のアッセイを連続実施するよりも臨床又は試験サンプルを分析するのに必要な時間の長さを実質的に短縮するものである。従って、本発明の方法は複数のHPVサブタイプに特異的な抗体を臨床試料から高スループットでスクリーニングするように応用可能である。前記方法は例えば96ウェルプレートLuminesxアッセイフォーマットを使用することにより、高い特異性と確度を維持しながら多数のサンプルを同時にスクリーニングすることができる。有利な態様では、96ウェルフォーマットで自動化を使用すると、HPV抗体の存在について臨床サンプルを分析するために必要な人的投入時間数を更に減らすことができる。本発明の方法は例えばTecan Genesis液体ハンドラー（TECAN Group Ltd., Durham, NC）を使用することにより自動化することができる。このシステムは時間の節約と共に、実験者が潜在的に感染性の血清に誤って接触しないようにするという二重の利点がある。

10

20

#### 【0070】

本発明は更に、HPVウイルス様粒子に結合したマイクロスフェアを含むVLP-マイクロスフェアコンプレックスに関する。本発明の1好適態様では、VLP-マイクロスフェアコンプレックスは更に蛍光レポーター分子で検出可能に標識されたVLPに結合したモノクローナル抗体を含む。

#### 【0071】

本発明の1好適態様では、マイクロスフェアコンプレックスのHPV VLP型はHPV 6、HPV 11、HPV 16及びHPV 18から構成される群から選択される。

#### 【0072】

本明細書に引用する全刊行物は、本発明に関連して使用可能な本明細書に開示する方法と材料を記載及び開示する目的で参考として援用されている。本明細書の如何なる記載も本発明が先発明により前記開示以前の日付を享受する資格がないと認めるものとして解釈すべきではない。

30

#### 【0073】

以上、添付図面を参考に本発明の好適態様を説明したが、当然のことながら本発明は上記の厳密な態様に限定されず、当業者は特許請求の範囲に記載する発明の範囲又は精神から逸脱しない範囲で種々の変更及び応用が可能である。

#### 【0074】

以下、実施例により本発明を説明するが、これらの実施例により発明を限定するものではない。

40

#### 【実施例1】

#### 【0075】

ウイルス様粒子（VLP）

参考として本明細書に援用されているHofmannら, *Virology* 209 (2) : 506 - 18 (1995); Hofmannら, *J. Gen. Virol.* 77 (pt 3) (1) : 465 - 68; Neeperら, *Gene* 180 (1-2) : 1 - 6 (1996); 及びRossiら, *Hum. Gene Ther.* 11 (8) : 1165 - 76 (2000) に従来記載されている技術とCookら, *Protein Expr. Purif.* 17 (3) : 477 - 484 (1999) の変法に従い、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でL1遺伝子の発現により形成したHPV 6

50

、11、16及び18型のVLPを、*Saccharomyces cerevisiae*のライゼートから精製した。

【実施例2】

【0076】

抗体

以下の抗体を、アッセイ用に入手した：HPV-6に特異的なH6.B10.5；HPV-11に特異的なmAb8740又はH11.B2（Chemicon International, Inc., Temecula, CA）；HPV-16に特異的なH16.V5；及びHPV-18に特異的なH18.J4（Christensenら, *Virology* 224(2)：477-86(1996)；Christensenら, *J. Virol.* 64(11)：5678-81(1990)；及びChristensenら, *Virology* 223(1)：174-84(1996)参照）。これらの抗体は各々、HPV型特異的であって中和エピトープと結合することが従来示されている（Yeagerら, *Virology* 278(2)：570-77(2000)）。H6.B10.5、H11.B2、H16.V5、及びH18.J4抗体をフィコエリトリン（PE）（Chromaprobe, Inc., Aptos, CA）で標識した。アッセイで使用するために、これらの4種のPE標識mAbを各mAbの終濃度がH6.B10.5は2.5 µg/ml、H11.B2は1.0 µg/ml、H16.V5は1.0 µg/ml、H18.J4は1.25 µg/mlとなるように組合せた。

10

【実施例3】

【0077】

HPV VLPのLuminexマイクロスフェアへの共有結合

HPV VLPワクチンは、ヒトと動物の両方で型特異的中和抗体を誘導することが示されている。しかし、変性VLPは中和抗体を誘導することができず、有効な免疫応答を誘導するにはVLP上のコンホメーション感受性エピトープが重要であることが示された。更に、VLPのコンホメーション保全性は還元条件、pH及びイオン条件に鋭敏である（McCarthyら, *J. Virol.* 72(1)：32-41(1998)参照）。

20

【0078】

本発明者らはカルボジイミド仲介型の結合反応手順を使用した（Starosら, *Anal. Biochem.* 156(1)：220-22(1986)参照）。カルボジイミド反応によるHPV VLPのLuminexマイクロスフェアへの共有結合がVLPのコンホメーション保全性を変化させるか否かを調べるために、1%BSAの存在下又は不在下で種々の緩衝液に4で保存したVLP-マイクロスフェアの安定性をモニターした。各種VLPに対する結合検出mAbの、蛍光強度中央値（MFI）の32回反復測定値の変動係数（%CV）を各種保存条件で6か月間測定した。

30

【0079】

Luminexマイクロスフェアは、蛋白質と共有結合するためにカルボキシル官能基を有する粒径約5000nmの蛍光ポリスチレンビーズである。VLPを夫々のマイクロスフェアと結合する前にまずカルボキシル化Luminexマイクロスフェアの活性化を行った。マイクロスフェアを4で暗所にてマイクロスフェア $1.25 \times 10^7$ 個/mlの濃度で保存した。マイクロスフェアを室温まで上げ、2分間音波処理してマイクロスフェアを均等に分配し、1.5mlバイアル（VWR, West Chester, PA）にマイクロスフェア $2.5 \times 10^6$ 個/バイアルを分注した。マイクロスフェアをペレット化し、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.2）400 µlに再懸濁した。NHS（N-ヒドロキシルホスクシンイミド）の50mg/ml溶液50 µlとEDC（塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）の50mg/ml溶液50 µlを加えることにより、マイクロスフェアの表面のカルボキシル化部位を活性化した。試験管を2分間音波処理し、ホイルを巻き、20分間室温でインキュベーションした。活性化段階後、マイクロスフェアをリン酸緩衝食塩水（PBS）（pH7.4）500 µlで1回洗浄した後、VLPを加えた。

40

50

## 【0080】

マイクロスフェアのカルボキシル部位を活性化した後、HPV-VLPと夫々のマイクロスフェアの結合を実施した。6、11、16及び18型のHPV-VLPをPBSで濃度12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで希釈した。VLP(12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )500 $\mu\text{l}$ を活性化マイクロスフェアに加え、低速設定で10~20秒間ボルテックスし、マイクロスフェアを再懸濁させた。VLPは以下のマイクロスフェアに結合した：VLP-6はマイクロスフェア#132、VLP-11はマイクロスフェア#153、VLP-16はマイクロスフェア#138、VLP-18はマイクロスフェア#118に結合した。各種マイクロスフェアは、各種マイクロスフェアセット間のスペクトル分解が良好であるという理由から選択した。

## 【0081】

VLPの添加後、バイアルにホイルを巻き、室温で2時間ローターにて振盪した。この段階は、マイクロスフェア上の空いているカルボン酸部位とアミド結合を形成することにより、VLPをマイクロスフェアと共有結合させる。マイクロスフェアと結合したVLPを0.05% Tween 20含有PBS 1mLで1回洗浄し、ヒスチジン緩衝液(20mMヒスチジン, 0.5M NaCl, pH6.2)、カラムA緩衝液(50mM MOPS, 0.5M NaCl, pH7.0)又は1%BSA含有もしくは非含有PBSに再懸濁し、マイクロスフェア上にまだ空いているカルボキシル部位がある場合にはブロックした。VLP-マイクロスフェア(マイクロスフェア1.0 $\times 10^6$ 個/mL)を1mLずつ遮光バイアルに4で保存した。

## 【0082】

これらの試験の結果、VLPのコンホメーションは結合反応により測定可能な影響を受けず、VLP-Luminesxマイクロスフェアは代表的VLP-16について示すように、1%BSA含有緩衝液に4で保存した場合に少なくとも5か月間安定であることが判明した(図3)。これらの結果から、*Saccharomyces cerevisiae*から発現させたL1-VLPは、L1の型特異的中和エピトープに影響を与えることなしにLuminesxマイクロスフェアと安全に結合できることが実証された。

## 【実施例4】

## 【0083】

競合LuminesxアッセイによるHPV型特異的抗体定量

競合イムノアッセイを実施するために、4種のHPV-VLP型の各々のVLP-マイクロスフェアを等容量ずつプールし、終濃度がビーズ8.0 $\times 10^5$ 個/mLとなるまでヒスチジン緩衝液で希釈した。VLP-マイクロスフェアを、96ウェル黒色不透明マイクロタイタープレート(Costar, Coming, NY)の各ウェルに容量25 $\mu\text{l}$ ずつ加えた(VLP-マイクロスフェア合計20,000個,各HPV型のVLP-マイクロスフェア5,000個)。HPV-VLP-6、-11、又は-18VLPのいずれかで免疫しておいた個々のアフリカミドリザルからの血清と、VLP-16で免疫しておいたチンパンジーからの血清をプールすることによりHPVストック標準血清を作製した。4種の各種血清は、擬似中和アッセイで予め力価を測定しておいた(Yaegerら, *Virology* 278(2):570-77(2000))。各種HPV型のプール血清のストック濃度はHPV-6では250mMU/mLとし、HPV-11、HPV-16及びHPV-18では1000mMU/mLとした。力価200mMU/mLは、HPV感染のin vivo無胸腺ヌードマウス移植モデルでHPV11を中和することが示されている(Brownら, *J. Infect. Dis.* 184(9):1183-86(2001))。

## 【0084】

個々のHPVイムノアッセイを多重化できるか否かを調べるために、本発明者らは単一フォーマットと多重フォーマットのイムノアッセイで、4種のHPV標準血清を単独又はプールとしてまとめて試験した。12点標準曲線(単一(単独)フォーマットと多重フォーマットの両方で2回ずつ試験)を作成するために、ストック標準をHPV陰性正常ヒト血清で11回2倍系列希釈した。標準曲線用として各ウェルに血清を50 $\mu\text{l}$ ずつ加えた

10

20

30

40

50

。陰性対照を4重に加え、高低対照を2重に加え、患者サンプル32個を2重に加えた。プレートにホイルを被せ、血清とVLP-マイクロスフェアを室温で15分間インキュベーションした。PE標識した型特異的mAbの組合せをプレートの各ウェルに容量25 $\mu$ lずつに加え、その後、マルチチャンネルピペットを使用して血清、VLP-マイクロスフェア、及びmAb-PEを3回混合した。プレートをホイルカバーで再び密閉し、室温で一晩インキュベーションした。

#### 【0085】

インキュベーション後、予めPBSで湿しておいたフィルタープレート(Millipore, Bedford, MA)に全サンプルを移した。血清サンプルをPBS緩衝液200 $\mu$ lで3回洗浄し、Luminex100(登録商標)で分析するためにVLP-マイクロスフェアをPBS+1%BSA200 $\mu$ lに再懸濁した。マイクロスフェアマルチマーを排除するようにゲートを設定した多重捕捉モードで、XYプレートハンドラープラットフォームを使用してLuminex100計器でサンプルを分析した。計器分析時間はサンプル当たり約30秒とした。

10

#### 【0086】

上述のように、HPV Ab応答を検出するために使用した4種のmAbはHPV型特異的エピトープと結合し、他の型とは交差反応しない。4種の標準をまとめてプールする効果は、HPV-11、HPV-16及びHPV-18標準曲線に最小の影響しかなかった(図4B、4C及び4D参照)。他方、アッセイの多重化はHPV-6標準曲線に僅かな影響があった(図4A参照)。理論に拘束する意図はないが、HPV-6曲線に見られるこの効果は、HPV-11血清のHPV-6 VLPへの交差反応による可能性が最も高いと思われた。VLP-11で免疫した動物又は個体からの高力価血清サンプルは、HPV-6を中和することができる(Yeagerら, *Virology* 278(2): 570-77(2000))ので、この交差反応性は予想外であった。

20

#### 【0087】

多重アッセイにおける各種標準曲線に関する定量の分析限界をHPV-6(1.2~54.8mMU/mL)、HPV-11(9.8~365.6mMU/mL)、HPV-16(4.5~476.5mMU/mL)及びHPV-18(11.3~203.0mMU/mL)について測定すると、cRIAで測定した定量限界に比肩し得るものであった(実施例7及び図8参照)。

30

#### 【0088】

低、中及び高力価の血清サンプル8個ずつを使用してHPV-Luminexイムノアッセイの精度を測定した(データは示さず)。試験内精度はCVで表すとHPV-6が4.3~4.5%、HPV-11が3.6~7.4%、HPV-16が7.4~22.0%、HPV-18が2.1~23.9%であった。HPV6標準曲線には多重化の影響が少なかったが、本発明のHPV-Luminexアッセイは競合HPV型特異的RIAと良好な相関を示した(ピアソン相関係数0.751~0.837, 実施例7参照)。分析するマイクロスフェア数を変えてもMFI値に影響がなかったことも付記しておく(データは示さず)。

#### 【実施例5】

40

#### 【0089】

##### アッセイ希釈剤と洗浄の効果

数種の異なるアッセイ希釈剤がイムノアッセイに及ぼす効果と濾過-洗浄段階を操作に加える効果も試験した。血清又はPBS1%BSAマトリックスのいずれかでアッセイを実施すると、同様の結果が得られ(図5)、高力価サンプルでは患者血清をPBS1%BSAサンプル希釈剤に希釈できることが示唆された。濾過-洗浄段階を加えても標準曲線に有意な影響はなかった(図5)が、読出時間は80~100分/プレートから30~40分/プレートまで有意に改善された。血清NHSマトリックスで最適化アッセイを実施し、サンプルをフィルタープレートに移し、PBS1%BSAで3回洗浄後にLuminex100(登録商標)に配置した。

50

## 【実施例 6】

## 【0090】

## データ分析

4パラメーターロジスティック曲線フィット(O'Connellら, American Statistical Association, Proceedings of the Biopharm Section, p.180-85(1992))を使用して、mAb-PE結合の相対阻害を標準曲線と比較した。標準曲線に使用した免疫参照血清は、ミリメルク単位(mMU/mL)で表した任意値を割当てた。無胸腺マウス異種移植アッセイでHPV-11に関する中和Ab力価>200mMU/mLは、ビリオン $\sim 10^8$ 個を中和することが示されている(Bryanら, J. Med. Virol. 53(3):185-88(1997))。蛍光強度中央値(MFI)単位のデータをMicrosoft Excelスプレッドシート(Microsoft, Redmond, WA)で処理した。誤差線は2重の測定の標準偏差を表す。Luminex Ab力価の結果をHPV-cRIAで得られたAb力価と比較する場合にはピアソン相関係数を使用した。

10

## 【実施例 7】

## 【0091】

## HPV競合ラジオイムノアッセイ(cRIA)

現在使用されている個々のcRIAアッセイに対するLuminexアッセイの確度を調べるために、両方のアッセイフォーマットでサンプル45個のパネルを2回試験した。全4種のHPV型に対する陰性サンプル15個、低力価サンプル15個、中力価サンプル10個及び高力価サンプル5個を両アッセイフォーマットで2重に試験し、2回のアッセイの相対合致率を測定した。

20

## 【0092】

HPV型特異的競合RIAを使用して、天然HPV-6、HPV-11、HPV-16及びHPV-18 VLPに対するHPV型特異的抗体力価を従来に記載に従って評価した(Palkerら, Vaccine 19(27):3733-43(2001))。要約すると、HPV L1 VLP抗原100ng/mL(HPV-6, HPV-11)、50ng/mL(HPV-16)及び175ng/mL(HPV-18)を固相ポリスチレンビーズ(鏡面仕上げ1/4インチ, Precision Plastic Ball Co., Franklin Park, IL)に1時間室温で温和な攪拌下にコーティングした(ビーズ5個/mL)。ビーズを50mM MOPS, 0.5M NaCl, pH7.0で洗浄し、後期使用時まで4°CでMOPS緩衝液に浸漬保存した。等容量の免疫血清(100 $\mu$ l)と、1%BSA, 0.1%Tween 20及び0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBSで12,500倍(H6.B10.5)、160,000倍(H11.B2)、800,000倍(H16.V5)又は200,000倍(H18.J4)に希釈したmAb血清を、20ウェルAbbotアッセイプレートの1個のウェルで混合した。HPV VLPをコーティングしたビーズを各ウェルに1個ずつ加え、室温で一晩インキュベーションし、脱イオン水で洗浄し、 $^{125}$ I標識ヤギ抗マウスIgG(NEN Life Sciences, Boston, MA)と共に37°Cで2.5時間インキュベーションし、脱イオン水で洗浄し、ガンマカウンター(Wallac, Turku, フィンランド)でカウントした。4パラメーターロジスティック曲線フィットを使用してmAb結合の相対阻害を標準参照血清と比較した。使用した参照血清は、ミリメルク単位(mMU/mL)で表した任意値を割当てた。

30

40

## 【0093】

HPV6、11、16及び18型に対する抗体に陰性、低陽性及び陽性の代表的サンプル4個の1組はHPV-Luminexアッセイで蛍光強度中央値(MFI)(図6A)と血清力価計算値(図6B)の間に逆関係を示す。HPV-16のcRIAとLuminexアッセイについてミリメルク単位/mL(mMU/mL)で表した代表的平均力価を図7に示す。両アッセイフォーマットで測定した対数力価を比較すると、どちらのアッセ

50

イも良好な合致率を示すことが判明した。具体的に言うと、両アッセイフォーマットのピアソン相関係数 ( $R^2$ ) は全て 0.75 を上回り (HPV-6, 0.837; HPV-11, 0.751; HPV-16, 0.768; HPV-18, 0.775)、両アッセイフォーマット間の良好な一致が示された。更に、HPV Luminex アッセイは cRIA に比較した場合には疑陽性率 0% 及び疑陰性率 0% であった。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1A】典型的な HPV-Luminex 多重競合イムノアッセイを示す。パネル A は HPV-Luminex イムノアッセイのアッセイデザインの模式図である。このイムノアッセイは、患者血清中の HPV 型特異的抗体がフィコエリトリンで標識した HPV 型特異的検出モノクローナル抗体 (mAb) の結合を阻止する能力を定量的に測定する。結合した HPV 特異的検出 mAb からの蛍光シグナルは、夫々の VLP 上の HPV 型特異的中和エピトープに対する患者の抗体力価に反比例する。パネル B は PE 標識 mAb が患者血清中の型特異的 HPV Ab により結合阻害された場合の HPV VLP ミクロスフェアコンプレックスの模式図を示す。

10

【図1B】典型的な HPV-Luminex 多重競合イムノアッセイを示す。パネル A は HPV-Luminex イムノアッセイのアッセイデザインの模式図である。このイムノアッセイは、患者血清中の HPV 型特異的抗体がフィコエリトリンで標識した HPV 型特異的検出モノクローナル抗体 (mAb) の結合を阻止する能力を定量的に測定する。結合した HPV 特異的検出 mAb からの蛍光シグナルは、夫々の VLP 上の HPV 型特異的中和エピトープに対する患者の抗体力価に反比例する。パネル B は PE 標識 mAb が患者血清中の型特異的 HPV Ab により結合阻害された場合の HPV VLP ミクロスフェアコンプレックスの模式図を示す。

20

【図2】別個の Luminex ミクロスフェアに対する HPV-VLP 型の指定を示す (実施例 3 参照)。分類 1 (CL1) 658 nm 及び分類 2 (CL2) 712 nm の離散スペクトル特性を有する特定 Luminex ミクロスフェア集団に各 HPV-VLP を結合させ、自動ゲーティングにより分離させた (楕円はゲートを示す)。VLP-6 はミクロスフェア 132 に結合し、VLP-11 はミクロスフェア 153、VLP-16 はミクロスフェア 138、VLP-18 はミクロスフェア 118 に結合した。

【図3】Luminex ミクロスフェアに結合した HPV-VLP-16 の安定性を示す。Luminex ミクロスフェアに結合した HPV 6、11、16 及び 18 型 VLP の安定性を 6 か月間試験した。VLP-ミクロスフェアを 4 で暗所にて 1% BSA の存在下又は不在下に PBS (菱形で示す)、カラム A 緩衝液 (三角で示す) 又はヒスチジン緩衝液 (正方形で示す) のいずれかに保存した。夫々白記号は BSA の不在下の保存を示し、黒記号は 1% BSA の存在下の保存を示す。ミクロスフェア 138 に結合した VLP-16 の代表的データを示す。32 個の反復サンプルの MFI を平均し、%CV を決定した。%CV は 1% BSA を含有する緩衝液に保存した全 4 種の HPV-VLP 型で 10% 未満であった。

30

【図4A】HPV 6、11、16 及び 18 型の単独及び多重標準曲線を示す。HPV-VLP-6 (パネル A)、HPV-VLP-11 (パネル B)、及び HPV-VLP-18 (パネル D) の各種アフリカミドリザル血清と HPV-VLP-16 のチンパンジー血清 (パネル C) について標準参照血清の 12 点希釈系列の代表的標準曲線を示す。単独曲線は 1 種のみ VLP-ミクロスフェア型が存在するアッセイで試験した単一標準血清からの結果を示し (三角で示す)、多重曲線は単一ウェルに全 4 種の VLP-ミクロスフェアが存在する 4 価標準を示す (円で示す)。誤差線は 2 重サンプルの標準偏差を示す。

40

【図4B】HPV 6、11、16 及び 18 型の単独及び多重標準曲線を示す。HPV-VLP-6 (パネル A)、HPV-VLP-11 (パネル B)、及び HPV-VLP-18 (パネル D) の各種アフリカミドリザル血清と HPV-VLP-16 のチンパンジー血清 (パネル C) について標準参照血清の 12 点希釈系列の代表的標準曲線を示す。単独曲線は 1 種のみ VLP-ミクロスフェア型が存在するアッセイで試験した単一標準血清から

50

の結果を示し（三角で示す）、多重曲線は単一ウェルに全4種のVLP-マイクロスフェアが存在する4価標準を示す（円で示す）。誤差線は2重サンプルの標準偏差を示す。

【図4C】HPV6、11、16及び18型の単独及び多重標準曲線を示す。HPV-VLP-6（パネルA）、HPV-VLP-11（パネルB）、及びHPV-VLP-18（パネルD）の各種アフリカミドリザル血清とHPV-VLP-16のチンパンジー血清（パネルC）について標準参照血清の12点希釈系列の代表的標準曲線を示す。単独曲線は1種のみVLP-マイクロスフェア型が存在するアッセイで試験した単一標準血清からの結果を示し（三角で示す）、多重曲線は単一ウェルに全4種のVLP-マイクロスフェアが存在する4価標準を示す（円で示す）。誤差線は2重サンプルの標準偏差を示す。

【図4D】HPV6、11、16及び18型の単独及び多重標準曲線を示す。HPV-VLP-6（パネルA）、HPV-VLP-11（パネルB）、及びHPV-VLP-18（パネルD）の各種アフリカミドリザル血清とHPV-VLP-16のチンパンジー血清（パネルC）について標準参照血清の12点希釈系列の代表的標準曲線を示す。単独曲線は1種のみVLP-マイクロスフェア型が存在するアッセイで試験した単一標準血清からの結果を示し（三角で示す）、多重曲線は単一ウェルに全4種のVLP-マイクロスフェアが存在する4価標準を示す（円で示す）。誤差線は2重サンプルの標準偏差を示す。

10

【図5】HPV-Luminexアッセイに及ぼす血清と各種アッセイ緩衝液の効果を示す（実施例5参照）。VLP-11で免疫したアフリカミドリザルからの標準参照血清を種々のアッセイ希釈剤緩衝液中で分析した。ストック参照標準をHPV陰性正常ヒト血清（NHS）で2倍系列希釈し、12点標準曲線を作成した。フィルタープレート中でPBS/1%BSAにより3回リンスする洗浄段階を加える（三角で示す）か又は加えず（正方形で示す）に、標準参照血清をPBS/1%BSA（円で示す）又はHPV陰性NHS中で分析した。誤差線は2重サンプルの標準偏差を示す。

20

【図6A】HPV型特異的中和抗体力価の計算値を示す。パネルAは4種の代表的HPV陰性、低陽性及び血清陽性サンプルの中央蛍光値（MFI）を示す。各代表的HPV型で得られた結果を異なる色の棒グラフで示し、グレーの棒はHPV6を示し、縞の棒はHPV11を示し、黒の棒はHPV16を示し、白の棒はHPV18を示す。パネルBは（A）に示したと同一の4種の代表的サンプルのミリメルク単位/mL（mMU/mL）値で表した抗体力価を示す。誤差線は2重サンプルの標準偏差を示す。

【図6B】HPV型特異的中和抗体力価の計算値を示す。パネルAは4種の代表的HPV陰性、低陽性及び血清陽性サンプルの中央蛍光値（MFI）を示す。各代表的HPV型で得られた結果を異なる色の棒グラフで示し、グレーの棒はHPV6を示し、縞の棒はHPV11を示し、黒の棒はHPV16を示し、白の棒はHPV18を示す。パネルBは（A）に示したと同一の4種の代表的サンプルのミリメルク単位/mL（mMU/mL）値で表した抗体力価を示す。誤差線は2重サンプルの標準偏差を示す。

30

【図7】HPV-16のcRIAアッセイで測定した力価と、多重競合Luminexイムノアッセイからの力価の比較を示す（実施例7参照）。45個のサンプルのHPV型特異的抗体力価（mMU/mL）をcRIAとLuminexイムノアッセイにより測定した。HPV陰性血清サンプル15個、低力価血清サンプル15個、中力価血清サンプル10個及び高力価血清サンプル5個の抗体力価を測定した。cRIAとLuminexアッセイはいずれも2重に実施し、アッセイ内精度とアッセイ間確度について2重試験の平均を比較した。HPV-16のcRIAとLuminexアッセイの平均mMU/mL値を示す。

40

【図8】HPV-6、11、16及び18型アッセイについて競合RIAとLuminex多重イムノアッセイに関する検出及び定量の限界の比較をミリメルク単位/mLで示す。

。

【 図 1 A 】

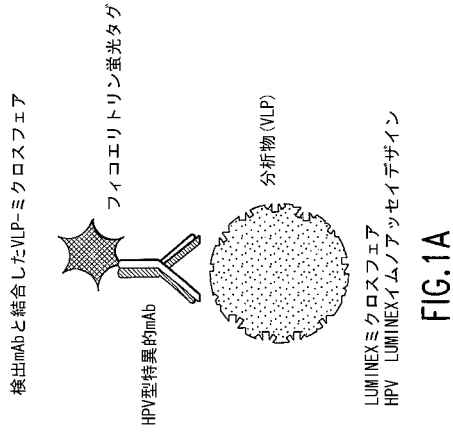


FIG.1A

【 図 1 B 】

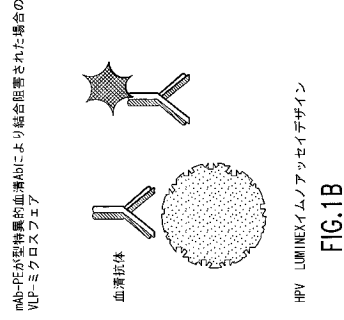


FIG.1B

【 図 2 】

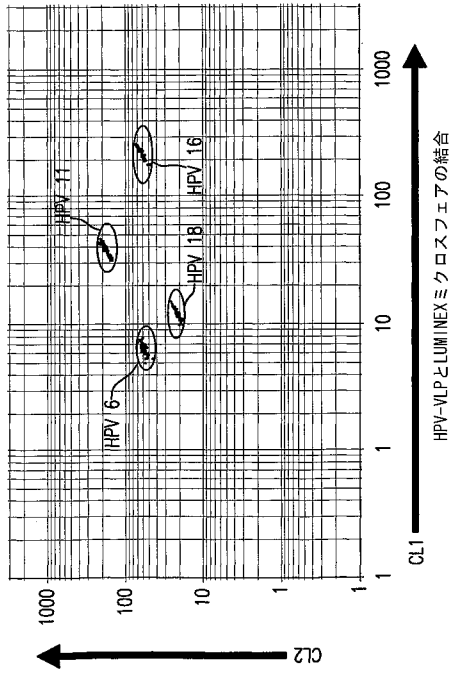


FIG.2

【 図 3 】

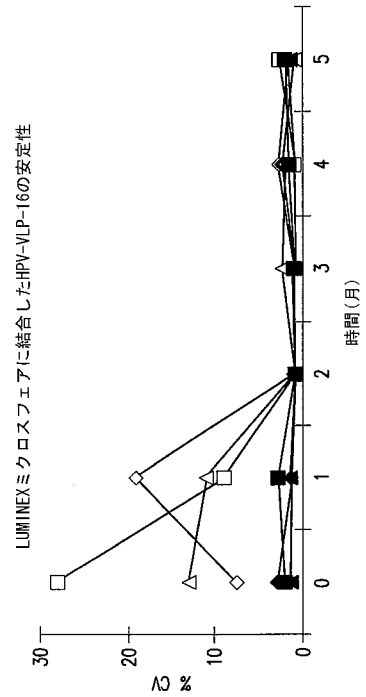
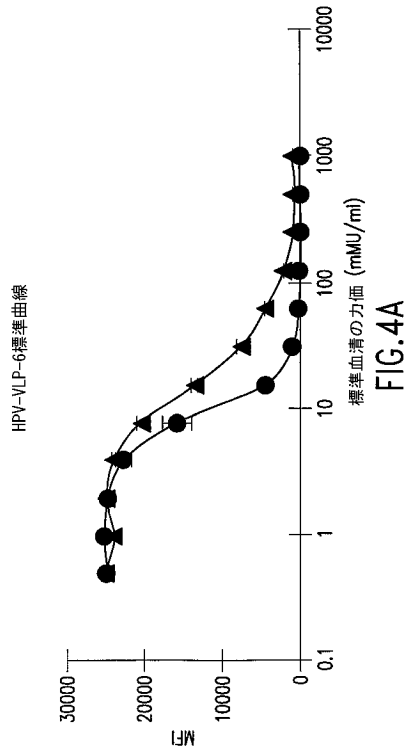
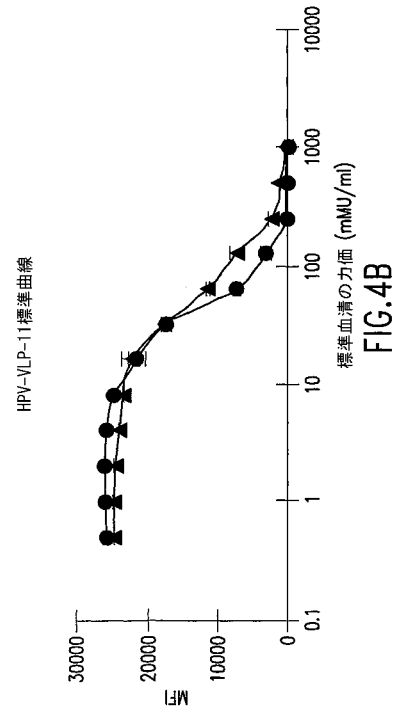


FIG.3

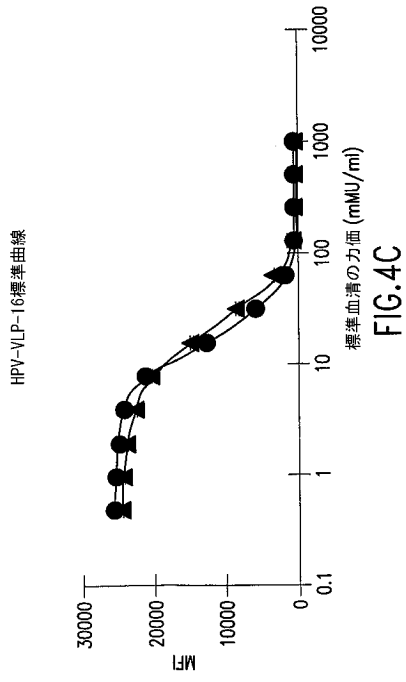
【 図 4 A 】



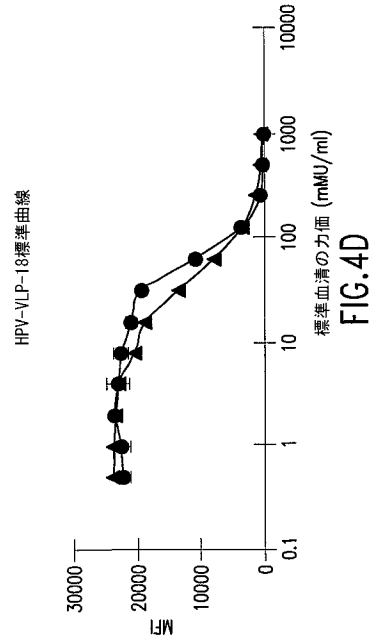
【 図 4 B 】



【 図 4 C 】

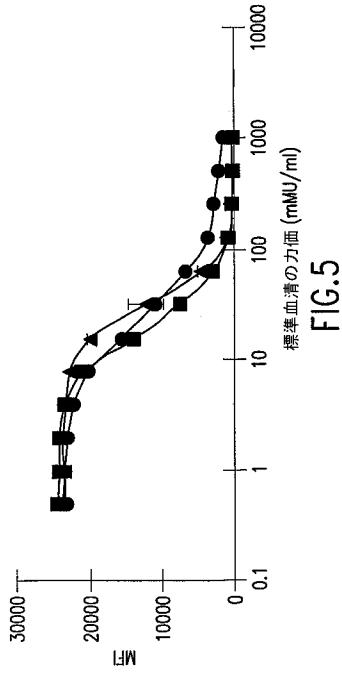


【 図 4 D 】

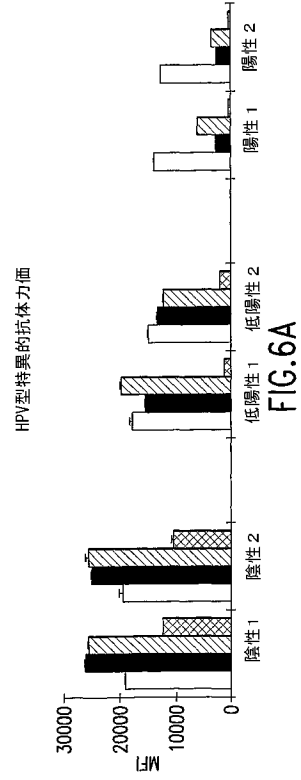


【 図 5 】

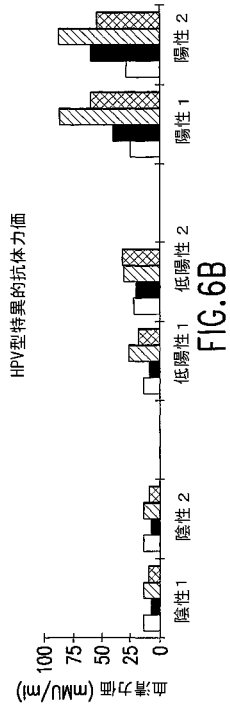
HPV-LUMINEXアッセイに及ぼす血清とアッセイ緩衝液の効果



【 図 6 A 】

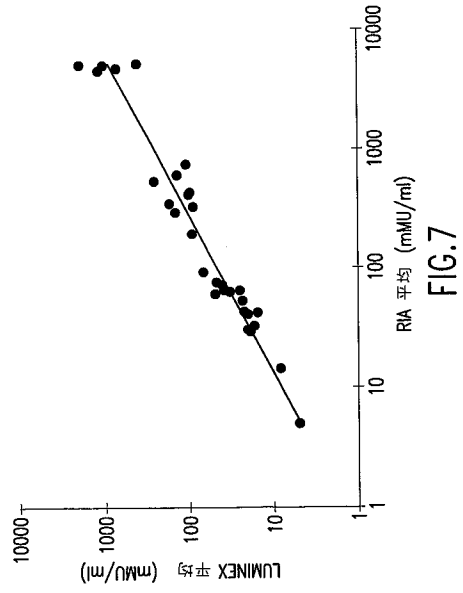


【 図 6 B 】



【 図 7 】

HPV-16RIAとHPV-16 LUMINEXアッセイの比較



【 図 8 】

競合HPV RIAと多重LUMINEXイムノアッセイの検出及び定量限界

	HPV-6		HPV-11		HPV-16		HPV-18	
	RIA	LUMINEX	RIA	LUMINEX	RIA	LUMINEX	RIA	LUMINEX
検出限界	2.7	0.8	2.7	1.0	0.4	1.6	3.9	5.3
定量下限	8.0	1.2	13.0	9.8	6.0	4.5	13.0	11.3
定量上限	83.0	54.8	130.0	365.6	130.0	476.5	130.0	203.0

FIG.8

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/12913												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53 US CL : 435/6, 7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	SMITH et al. A Rapid Sensitive, Multiplexed Assay for Detection of Viral Nucleic Acid Using the FlowMetrix System. Clinical Chemistry. 1998, Vol. 44, No. 9, pages 2054-2056, see the entire document.	1-18												
Y	FULTON et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix System. Clinical Chemistry, 1997, Vol. 43, No. 9, pages 1749-1756, see the abstract.	1-18												
Y	MARTINS, T. G. Development of Internal Controls for the Luminex Instrument as Part of a Multiplex Seven-Analyte Viral Respiratory Antibody Profile. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. January 2002, Vol. 9, No. 1, pages 41-45, see the abstract.	1-18												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier document published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"I" 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)</td> <td>"A" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"B" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"I" 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)	"A" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"B" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"I" 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)	"A" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 25 JUNE 2003		Date of mailing of the international search report 28 JUL 2003												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Alicia D. Roberts for</i> A. R. SALIMI Telephone No. (703) 308-1235												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US03/12913

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	✓ CHRISTENSEN et al. Monoclonal Antibodies to HPV-6 L1 Virus-like Particles Identify Conformational and Linear Neutralizing Epitopes on HPV-11 in Addition to Type-Specific Epitopes on HPV-6. <i>Virology</i> , 1996, Vol. 224, pages 477-486, see the abstract.	1-18
Y	✓ GIROGLOU et al. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. <i>Vaccine</i> , 2001, Vol. 19, pages 1783-1793, see the abstract.	1-18
Y	✓ YEAGER et al. Neutralization of Human Papillomavirus (HPV) Pseudovirions: A Novel and Efficient Approach to Detect and Characterize HPV Neutralizing Antibodies. <i>Virology</i> , 2000, Vol. 278, pages 570-577, see the abstract.	1-18
Y	✓ BROWN et al. Neutralization of Human Papillomavirus Type 11 (HPV-11) by Serum from Woman Vaccinated with Yeast-Derived HPV-11 L1 Virus-like Particles: Correlation with Competitive Radioimmunoassay Titer. <i>The Journal of Infectious Diseases</i> , 2001, Vol. 184, pages 1183-1186, see the abstract.	1-18
Y	✓ WO 01/13120 A1 (LUMINEX CORPORATION) 22 February 2001 (22.02.2001), see the claims.	1-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US03/12913

**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST, EPA, JAP, DERWENT, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

search terms: HPV?, antibod?, detect?, multiplexed, Luminex, papilloma virus

---

フロントページの続き

- (74)代理人 100103920  
弁理士 大崎 勝真
- (74)代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明
- (72)発明者 エツサー, マーク・テイー  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- (72)発明者 オパウカ, デイビッド・ダブリュ  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- (72)発明者 ゲッツ, ビクター  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- (72)発明者 ドラモンド, ジェイムズ・イー  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- (72)発明者 ワシヤボー, マイケル・ダブリュ  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

专利名称(译)	人乳头瘤病毒多重测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005524076A</a>	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2004501646	申请日	2003-04-25
申请(专利权)人(译)	默克结束Kamupani公司		
[标]发明人	エツサーマークティー オパウカデイビッドダブリユ ゲツツビクター ドラモンドジエイムズイー ワシヤポーマイケルダブリユ		
发明人	エツサー,マーク・ティー オパウカ,デイビッド・ダブリユ ゲツツ,ビクター ドラモンド,ジエイムズ・イー ワシヤポー,マイケル・ダブリユ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/54333 G01N2333/025		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.511.D G01N33/569.L		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/376721 2002-04-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及利用粒子流式细胞术分析同时测量针对多种HPV类型的抗体的存在的免疫测定。以竞争形式存在和不存在测试样品中的中和抗体，其允许已知类型特异性荧光标记中和单克隆抗体与测试样品中的抗体竞争结合特定HPV上的构象敏感性中和表位 - /或测量效力这是固定的。本发明还提供了包含与HPV VLP缀合的微球的微球复合物。

【 図 1 A 】

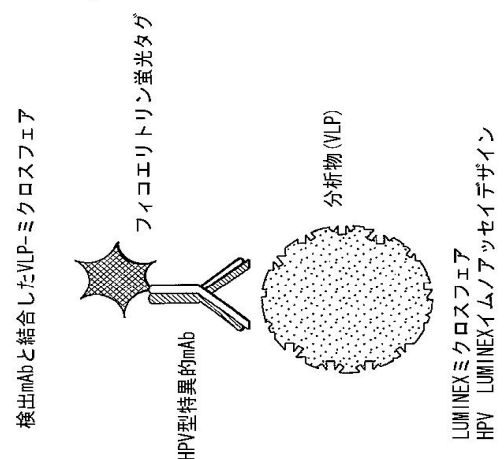


FIG.1A