

(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2011-528102

(P2011-528102A)

(43) 公表日 平成23年11月10日(2011.11.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-513504 (P2011-513504)	(71) 出願人	510326795 チェン シュリン
(86) (22) 出願日	平成21年6月12日 (2009. 6. 12)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月8日 (2011. 2. 8)		539 フレモント ウォーム スプリングス ブルバード 47853
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/003537	(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開番号	W02009/151632		
(87) 国際公開日	平成21年12月17日 (2009. 12. 17)	(74) 代理人	100119530 弁理士 富田 和幸
(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)	(74) 代理人	100144266 弁理士 鈴木 一寿
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/192, 912	(72) 発明者	チェン シュリン
(32) 優先日	平成20年9月22日 (2008. 9. 22)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(33) 優先権主張国	米国 (US)		539 フレモント ウォーム スプリングス ブルバード 47853 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 初期段階および後期段階のHPV感染の検出

(57) 【要約】

本発明の実施形態は、様々なHPV遺伝子型、初期および/または後期のHPVに関連したHPV特異性タンパク質または抗体による感染を含むHPV感染を検出する方法、ポリクロナル抗体、モノクローナル抗体、分析およびキットを提供する。モノクローナル抗体を使用して単一の分析で発癌性高リスクまたは低リスクのHPV型を検出し、分析の種類または形式に限定されない。浸潤性子宮頸癌を特異的に検出する有効な手段を提供する。子宮頸癌バイオマーカーを特定して、初期段階前癌病変および後期段階癌進行に対する検出方法において用いる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト対象におけるパピローマウイルス感染の検出方法であって、
ヒト対象の臨床サンプルに免疫学的分析を行う工程と、1個以上のモノクローナル抗体を用いて臨床サンプルからのヒト細胞の核部分を染色する工程とを含む方法。

【請求項 2】

前記核部分の陽性染色は、初期形成不全段階、軽度扁平上皮内病変（LSIL）、重度扁平上皮内病変（HSIL）、子宮頸部上皮内癌形成段階1（CIN1）、子宮頸部上皮内癌形成段階2（CIN2）、子宮頸部上皮内癌形成段階3（CIN3）およびそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患段階への進行に関連する請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

ヒト細胞の細胞質部分の陽性染色は、後期形成不全段階、重度扁平上皮内病変（HSIL）、子宮頸部上皮内癌形成（CIN2/3）、浸潤性子宮頸癌、扁平上皮細胞癌（SCC）、腺癌、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患段階へ進行するパピローマウイルス感染を示す請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

1個以上のモノクローナル抗体を、1個以上の精製組み換え型パピローマウイルスタンパク質に対して生成する請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

1個以上のモノクローナル抗体は、少なくとも1個のHPV初期ウイルス性タンパク質に結合できる請求項1に記載の方法。

20

【請求項 6】

1個以上のモノクローナル抗体は、少なくとも1個のHPV後期ウイルス性タンパク質に結合できる請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

1個以上のモノクローナル抗体は、少なくとも1個のHPV初期ウイルス性タンパク質、および少なくとも1個のHPV後期ウイルス性タンパク質に結合できる請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

1個以上のモノクローナル抗体は、HPV初期ウイルス性タンパク質に結合できる抗体、およびHPV後期ウイルス性タンパク質に結合できる抗体を有する請求項1に記載の方法。

30

【請求項 9】

1個以上のモノクローナル抗体は、抗HPV E6モノクローナル抗体、抗HPV E7モノクローナル抗体、抗HPV L1モノクローナル抗体、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 10】

1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して生成した1個以上の抗体を用いて、ヒト対象の臨床サンプルからヒト細胞に免疫化学分析を行う工程と；
臨床サンプルからのヒト細胞の細胞質部分の染色と核部分の染色を比較する工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

40

【請求項 11】

臨床サンプルからのヒト細胞の細胞質部分より核部分で観察される陽性染色は、初期形成不全段階、軽度扁平上皮内病変（LSIL）、重度扁平上皮内病変（HSIL）、子宮頸部上皮内癌形成1、子宮頸部上皮内癌形成2、子宮頸部上皮内癌形成3、（それぞれCIN1, CIN2, CIN3）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される初期疾患段階でヒト対象におけるパピローマウイルス感染を示す請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

臨床サンプルのヒト細胞の核部分より細胞質部分で観察される陽性染色は、後期形成不

50

全段階、子宮頸部上皮内癌形成（CIN3）、浸潤性子宮頸癌およびそれらの組み合わせからなる群から選択される後期疾患段階でヒト対象におけるパピローマウイルス感染を示す請求項10に記載の方法。

【請求項13】

E6, E7, 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HPVウイルス性タンパク質に結合できる2個以上の抗体を用いて、ヒト対象の臨床サンプルに免疫化学分析を行う工程と；

2個以上の抗体によってヒト対象の染色を比較する工程であって、2個以上の抗体のうち少なくとも1個によるヒト細胞の陽性染色はヒト対象におけるパピローマウイルス感染を示す工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

10

【請求項14】

免疫化学分析を用いて様々な疾患段階でHPV感染を検出し、疾患段階は、初期HPV感染、後期HPV感染、初期段階子宮頸部細胞病変、後期段階子宮頸部細胞病変、軽度扁平上皮内病変（LSIL）、重度扁平上皮内病変（HSIL）、異型扁平上皮細胞（ASCUS）、子宮頸部上皮内癌形成ステージ1（CIN1）、子宮頸部上皮内癌形成ステージ2（CIN2）、子宮頸部上皮内癌形成ステージ3（CIN3）、進行した子宮頸癌、腺癌（ADC）、扁平上皮細胞癌（SCC）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15】

ヒト対象から臨床サンプルを提供して、臨床サンプルは形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を含む臨床サンプルを処理して、スライドガラス上の細胞の薄層内に塗布する工程と；

20

1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して生成した1個以上の抗体を用いて免疫化学分析を行う工程であって、少なくとも1個の抗体はパピローマウイルス初期ウイルス性タンパク質と結合できる工程と；

形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を含むスライドガラス上で臨床サンプルに存在する1個以上のパピローマウイルス型から1個以上のパピローマウイルス性タンパク質をそのまま染色する工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項16】

形態学的に異常または正常なヒト細胞の混合物から各細胞を分離することによって、それぞれの個々の細胞を検出する1個以上のフローサイトメトリ分析を行う工程と；

30

臨床サンプルからの液体溶液内に含まれる形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物における1個以上のパピローマウイルス型から、1個以上のヒト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さらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項17】

ヒト対象における1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を検出する方法であって、

1個以上のパピローマウイルス型からの1個以上のパピローマウイルス性タンパク質に結合でき、ヒト対象から臨床サンプルに存在する1個の抗HPV抗体を提供する工程と；

1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を含有する様々なタンパク質を含む細胞溶解液内に臨床サンプルを処理する工程と；

40

細胞溶解液内に存在する抗HPV抗体および様々なタンパク質からなる群から選択される少なくとも1個のタンパク質で固体表面をその上にコートして提供する工程と；

細胞溶解液で抗HPV抗体を反応する工程と；

固体表面に抗HPV抗体で1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の複合体を形成する工程と；

臨床サンプルに存在する1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在を確認するために固体表面上の複合体を検出する工程とを含む方法。

【請求項18】

1個以上のパピローマウイルス性タンパク質は、パピローマウイルス性E6タンパク質

50

、パピローマウイルス性 E7 タンパク質、パピローマウイルス性 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 17 に記載の方法。

【請求項 19】

固体表面は、ビーズ表面、ストリップ表面、迅速試験ストリップ表面、膜表面、装置による鉛直流動の膜表面、マイクロ流体装置の表面、プロット膜の表面、タンパク質チップの表面、ガラス表面、マイクロタイタープレートの底面、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 17 に記載の方法。

【請求項 20】

複合体を、1 個以上のビーズの固体表面で検出し、複合体を FACS (蛍光活性化細胞分類) によって検出する請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

複合体を、ストリップの一端に固定化した一次抗 HPV 抗体を有する迅速試験装置のストリップの固体表面で検出し、二次抗 HPV 抗体および細胞溶解液を、一次抗 HPV 抗体を有する複体内に形成する迅速試験装置のストリップの固体表面上で横方向に流れる前に、ストリップのもう一端に加える請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

複合体を、それに固定化した一次抗 HPV 抗体を有する鉛直流動迅速試験装置の膜の固体表面で検出し、細胞溶解液および二次抗 HPV 抗体を、一次抗 HPV 抗体を有する複体内に形成する鉛直流動迅速試験装置の膜の固体表面にその後加える請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 23】

複合体をマイクロ流体装置の固体表面で検出し、マイクロ流体装置によって流れる請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

細胞溶解物溶液内に存在する 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質を、抗 HPV 抗体と反応する前に、固体表面にコートする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

細胞溶解物溶液に存在する 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質を、プロット膜の固体表面にコートする請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

細胞溶解物溶液に存在する 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質をマイクロタイタープレートの固体表面上にコートし、抗 HPV 抗体は、複合酵素、ビオチン、金粒子、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される検出剤で予め標識化して、検出剤の存在が、1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質および抗 HPV 抗体の複合体を固体表面上での形成、およびヒト対象に存在する 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在を示すようにする請求項 24 に記載の方法。

30

【請求項 27】

抗 HPV 抗体を、1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質を有する細胞溶解物溶液と反応させてヒト対象のパピローマウイルス感染を検出する前に、固体表面にコートする請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 28】

抗 HPV 抗体を、細胞溶解物溶液と反応する前に、タンパク質チップ装置の固体表面にコートする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

抗 HPV 抗体を、細胞溶解物溶液と反応する前にマイクロ流体装置の固体表面にコートする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

固体表面上の複体の複合体検出は、抗 HPV 抗体、細胞溶解物溶液に存在する様々なタンパク質、抗 HPV 抗体に結合する二次抗体、抗 HPV 抗体と異なる第 2 の抗 HPV 抗体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 個以上のタンパク質に予め標識

50

化した検出剤の存在を検出する工程をさらに有し、第2の抗HPV抗体はまた、1個以上のパピローマウイルス型から1個以上のパピローマウイルス性タンパク質に結合でき臨床サンプルに存在する請求項17に記載の方法。

【請求項31】

検出剤の存在を、薬剤の色変化の直接定量的可視化、ELISAリーダーによる読み取り、マイクロアレイスキャナによる読み取り、FACS（蛍光活性化細胞分類）装置による読み取り、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される分析によって検出する請求項30に記載の方法。

【請求項32】

固体表面上の細胞内タンパク質に対して抗体をコートする工程と、ヒト対象の臨床サンプルにおける1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在と細胞内タンパク質の存在を比較する工程をさらに有し、細胞内タンパク質は、p16INK4a, E2F, Ki-67 (MIB-1), MYCタンパク質、CDK4、サイクリン-A, サイクリン-B, サイクリン-E、テロメラーゼ-TERC、MCM2タンパク質、TOP2Aタンパク質、熱ショックタンパク質40 (HSP40), 熱ショックタンパク質60 (HSP60), 熱ショックタンパク質70 (HSP70), CA9/MNタンパク質、ラミニン5、ラミニンタンパク質、brn-3a、CDKN2タンパク質、トポイソメラーゼ2A, ミクロソーム維持タンパク質-2、ミクロソーム維持タンパク質-4、ミクロソーム維持タンパク質-5、スルビピンタンパク質、VEGFタンパク質、p53、RB, p27 (kip1) および p21 (waf) 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請求項1または31に記載の方法。

10

20

【請求項33】

細胞溶解物溶液内で処理される臨床サンプルに存在する1個以上のパピローマウイルス型からの1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を検出する横方向流動装置において、

第1の抗HPV抗体を有するストリップの一端の第1固体表面であって、第1の抗HPV抗体は、1個以上のパピローマウイルス型から1個以上のパピローマウイルス性タンパク質に結合でき、第1の抗HPV抗体は、固体表面上で細胞溶解物溶液に存在する1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を捕捉できるようにする第1固体表面と；

固定した第2の抗HPV抗体を有するストリップのもう一端の第2固体表面であって、ストリップの第1固体表面から横方向に流れる細胞溶解物溶液と反応して、ストリップの第2固体表面上で第2抗HPV抗体を有する複体内に形成し、第2抗HPV抗体は1個以上のパピローマウイルス性タンパク質と結合でき、第2抗HPV抗体が臨床サンプルにおける1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を結合および検出できるようにする第2固体表面とを有する横方向流動装置。

30

【請求項34】

ヒト対象におけるパピローマウイルス感染を検出するキットであって、ヒト対象の臨床サンプルに免疫化学分析を行う抗HPVモノクローナル抗体は、臨床サンプルから1個以上のヒト細胞の核部分を染色して、ヒト細胞の細胞質部分の染色と核部分の染色を比較することができるキット。

40

【請求項35】

ヒト対象におけるパピローマウイルス感染を検出するキットであって、抗HPVモノクローナル抗体を有し、前記抗HPVモノクローナル抗体は、形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を含む溶液内で処理して、形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を含むスライドガラス上で臨床サンプルに存在する1個以上のパピローマウイルス型から1個以上のパピローマウイルス性タンパク質をそのまま染色するためのスライドガラス上の細胞の薄層内に塗布したヒト対象から、臨床サンプルに免疫化学的分析を行うパピローマウイルス性初期タンパク質に結合することができるキット。

【請求項36】

抗HPV抗体は、抗HPV E7モノクローナル抗体、抗HPV E6モノクローナル

50

抗体、抗HPV L1抗体および抗HPV E7モノクローナル抗体の組み合わせ、抗HPV L1抗体および抗HPV E6モノクローナル抗体の組み合わせ、抗HPV E6抗体および抗HPV E7モノクローナル抗体の組み合わせ、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34または35に記載のキット。

【請求項37】

抗HPVモノクローナル抗体を使用して様々な疾患段階でHPV感染を検出し、前記疾患段階は、初期HPV感染、後期HPV感染、初期段階子宮頸部細胞病変、後期段階子宮頸部細胞病変、軽度扁平上皮内病変(LSIL)、重度扁平上皮内病変(HSIL)、異型扁平上皮細胞(ASCUS)、子宮頸部上皮内癌形成ステージ1(CIN1)、子宮頸部上皮内癌形成ステージ2(CIN2)、子宮頸部上皮内癌形成ステージ3(CIN3)、進行した子宮頸癌、腺癌(ADC)、扁平上皮細胞癌(SCC)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34または35に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

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のに必要である。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。

20

【0002】

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。

30

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

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】

【0004】

50

本発明の実施形態は、組み換え型HPVタンパク質に対する様々なモノクローナル抗体を用いてHPVタンパク質を*in situ*で検出する様々な免疫測定を提供し、高リスクおよび/または低リスクのHPV型による感染が一つの特異的なモノクローナル抗体および/または一般的なpan抗体によって検出できるようにするものである。一つの実施形態において、ヒト対象におけるパピロームウイルス感染の検出方法には、ヒト対象の臨床サンプル上での免疫学的分析を行う工程および、HPV初期ウイルス性タンパク質に結合できる1個以上のモノクローナル抗体を用いて臨床サンプルからヒト細胞の核部分を染色する工程を有する。他の実施形態において、ヒト対象におけるパピロームウイルス感染の検出方法は、1個以上の精製組み換え型パピロームウイルス性タンパク質に対して生成した1個以上の抗体を用いてヒト対象の臨床サンプルからヒト細胞上で免疫化学分析を行う工程および、核部分の染色を臨床サンプルからのヒト細胞の細胞質部分の染色と比較する工程を有する。ヒト対象におけるパピロームウイルス感染の他の検出方法は、E6、E7および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HPVウイルス性タンパク質に結合できる2個以上の抗体を用いてヒト対象の臨床サンプル上の免疫化学分析を行う工程および、2個以上の抗体によってヒト細胞の染色を比較する工程を有し、2個以上の抗体のうち少なくとも1個によるヒト細胞の陽性染色はヒト対象におけるパピロームウイルス感染を示すものとする。

10

20

30

40

50

【0005】

一つの態様において、本発明は、後期疾患のヒト対象からのHPV感染したヒト細胞の細胞質部分を染色する免疫学的分析において用いることができる抗HPVモノクローナル抗体を提供する。他の態様において、一つの病期でのHPV感染を示すヒト対象からのヒト細胞の核部分を染色する免疫学的分析において用いることができる抗HPV E7モノクローナル抗体および抗HPV E6モノクローナル抗体を提供する。HPV感染したヒト対象の核部分の染色は初期HPV感染を示すが、HPV感染した細胞質部分の染色はHPV感染による後期疾患への形成不全進行を示す。免疫学的分析において用いる抗HPVモノクローナル抗体は、抗HPV E7モノクローナル抗体、抗HPV E6モノクローナル抗体、抗HPV L1モノクローナル抗体およびそれらの組み合わせである。他の態様において、本発明は子宮頸癌進行を検出するのに用いるバイオマーカーとしての抗HPV E7モノクローナル抗体および抗HPV E7タンパク質を提供する。加えて、本発明は、免疫化学分析および免疫細胞分析等の1個以上の免疫化学分析の実施方法を提供する。HPVウイルス性タンパク質に対して高い特異性のモノクローナル抗体も提供して、HPV検出免疫学的分析に用いる。一つの実施形態において、上皮組織サンプルの核部分を抗HPVモノクローナル抗体で染色して、概してHPV感染を示す。他の実施形態において、上皮組織の細胞質部分を抗HPVモノクローナル抗体で染色してHPV感染による形質不全進行を示す。

【0006】

さらに他の態様において、臨床サンプル上で免疫学的分析を行うキットを提供し、ヒト対象からのHPV感染したヒト細胞の核部分を染色してHPV感染を示すことができ、また、HPV感染したヒト細胞の細胞質部分を染色して後期疾患のHPV感染を示すことができる抗HPVモノクローナル抗体を有する。一つの態様において、ヒト対象におけるパピロームウイルス感染を示すキットは、ヒト対象の臨床サンプル上の免疫学的分析を行う抗HPVモノクローナル抗体を有し、臨床サンプルからの1個以上のヒト細胞の核部分を染色して、核部分の染色をヒト細胞の細胞質部分の染色と比較することができる。

【0007】

本発明はまた、子宮頸部細胞または子宮頸部組織におけるHPVタンパク質を検出するHPV免疫細胞(ICC)分析、HPVフローサイトメトリ分析、HPV免疫化学(IHC)分析も提供する。加えて、HPVウイルス性タンパク質に高い特異性を有するモノクローナル抗体も提供し、HPV ICCまたはHPVフローサイトメトリ分析において用いる。一つの実施形態において、ヒト対象におけるパピロームウイルス感染の検出方法は、1個以上の抗体を用いてヒト細胞の薄層を有するスライドガラス上の生物学的サンプル

に存在する 1 個以上のパピローマウイルス型からの 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質を *in situ* で検出して、ヒト細胞の薄層を染色する免疫細胞分析によって行う。この方法は、ヒト対象から臨床サンプルを提供し、臨床サンプルは形態学的に異常および正常の細胞の混合物内に入れる工程と、混合物をスライドガラス上の細胞の薄層に入れる工程と、1 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して生成した 1 個以上の抗体を用いて免疫化学分析を行い、形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を含むスライドガラス上の臨床サンプルに存在する 1 個以上のパピローマウイルス型を *in situ* で染色する工程を有する。

【0008】

他の実施形態において、ヒト対象におけるパピローマウイルス感染の検出方法は、ヒト対象から臨床サンプルを提供する工程および 1 個以上の抗体を化学物質でタグを付け、臨床サンプルを形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を含む液体溶液内で処理する工程を有する。形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物は、1 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して生成した 1 個以上の抗体を用いて染色する。この方法はさらに、1 個以上のフローサイトメトリ分析を行って、形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物から各細胞を分離することによってそれぞれの独立した細胞を検出する工程と、臨床サンプルからの液体溶液において含まれる形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物において 1 個以上のパピローマウイルス型からの 1 個以上のヒト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。

【0009】

一つの実施形態において、1 個以上の抗体は、1 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して生成し、少なくとも 1 個の抗体は、パピローマウイルス性初期タンパク質を認識することができる。他の実施形態において、1 個以上の抗体を化学物質でタグを付け、ヒト対象の生物学的サンプルにからの 1 個以上のヒト細胞を液体溶液において準備して、1 個以上の抗体の生物学的サンプルの 1 個以上のヒト細胞に存在する 1 個以上のパピローマウイルス型からの 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質との結合が、タグを付けた 1 個以上の抗体と反応する化学物質の存在によって検出できるようにする。他の実施形態において、化学物質には、染色剤、蛍光色素原、および 1 個以上のフローサイトメトリ分析において 1 個以上のヒト細胞をその後分離して特定する他の化学物質がある。加えて、免疫細胞分析を行うキットを提供する。キットは、前 - 抗体ブロッキング溶液、後 - 抗体ブロッキング溶液、一次抗体としての抗 HPV 抗体、二次抗体としての HRP もしくはビオチンまたは他の物質と結合した抗マウスまたは抗ラビット免疫グロブリン、二次抗体を検出する基質として用いる適切な化学物質を含む溶液を含む。

【0010】

さらに他の実施形態において、キットを、ヒト対象におけるパピローマウイルスを検出するために提供し、形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を有する溶液内で処理し、形態学的に異常および正常なヒト細胞の混合物を有するスライドガラス上の臨床サンプルに存在する 1 個以上のパピローマウイルス型からの 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質を *in situ* で染色するスライドガラス上の薄層細胞に入れる、ヒト対象からの臨床サンプル上の免疫化学分析を行うためにパピローマウイルス性初期タンパク質に結合できる抗 HPV モノクローナル抗体を有する。

【0011】

本発明はまた、子宮頸部細胞または子宮頸部組織等の生物学的サンプルにおける HPV タンパク質の存在を検出する、HPV プロット膜分析、タンパク質チップマイクロアレイ分析、HPV ビーズ分析、HPV 側方流動迅速試験、HPV 鉛直流迅速試験、HPV マイクロ流体迅速試験、直接的酵素免疫測定 (EIA)、酵素免疫測定 (ELISA) も提供する。加えて、これらの分析を行うキットおよび装置も提供する。一つの実施形態において、1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質を検出する方法を提供し、1 個以上のパピローマウイルス型からの 1 個以上のパピローマウイルス性タンパク質に結合でき、臨床サンプルに存在する 1 個の抗 HPV 抗体を提供する工程と、細胞溶解物溶液に存在する抗

10

20

30

40

50

HPV抗体または様々なタンパク質をその上にコーティングした固体表面を提供する工程と、臨床サンプルを、1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を有する様々なタンパク質を含む細胞溶解物溶液内で処理する工程を有する。この方法はさらに、抗HPV抗体を細胞溶解物溶液と反応させ、固体表面上で抗HPV抗体を有する1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の複合体を形成し、固体表面上で複合体を検出して、臨床サンプルに存在する1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在を確認する工程を有する。

【0012】

他の実施形態において、生物学的サンプルにおける1個以上のパピローマウイルス型からの1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在を検出する方法を提供し、この方法は、細胞溶解物溶液において処理した生物学的サンプルを提供する工程と、固体表面上に固定した第1抗HPV抗体を提供して、細胞溶解物溶液と反応させる工程と、細胞溶解物溶液を第2抗HPV抗体と反応させる工程を有する。両方の抗体は、1個以上のパピローマウイルス型からの1個以上の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。この方法はさらに、固体表面上で第1および第2抗HPV抗体を有する1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の複合体を形成する工程と、生物学的サンプルにおける1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在に対する固体表面上の複合体の形成を検出する工程を有する。

10

【0013】

加えて、生物学的サンプルにおける1個以上のパピローマウイルス型からの1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在を検出する側方流動装置を本発明の一つの実施形態に従って提供する。側方流動装置は、ストリップの一端に固定化した第1抗HPV抗体を有するストリップの第1固体表面およびストリップのもう一端に第2抗HPV抗体を有するストリップの第2固体表面で、第1HPV抗体を有する複体内に形成するストリップの固体表面上で側方に流す生物学的サンプルから処理した細胞溶解物溶液と反応できる第2固体表面を有する。他の実施形態において、生物学的サンプルにおける1個以上のパピローマウイルス型からの1個以上のパピローマウイルス性タンパク質の存在を検出する鉛直粒迅速試験装置を提供し、この装置は、生物学的サンプルから処理した細胞溶解物溶液と反応するその上に固定化した第1抗HPV抗体を有する膜の固体表面と、固体表面を鉛直に流れ膜の固体表面上の第1抗HPV抗体との複体内で形成する膜の固体表面上に細胞溶解物溶液を加える第2抗HPV抗体を有する。

20

30

【0014】

一つの態様において、第1抗HPV抗体は、1個以上の第1パピローマウイルス遺伝子によってコードした1個以上の第1組み換え型タンパク質に対して生成し、第1抗HPV抗体が固体表面上で細胞溶解物において1個以上のパピローマウイルス性タンパク質を捕捉できるようにする。他の態様において、第2抗HPV抗体は、同じパピローマウイルス遺伝子によってコードした同じ第1組み換え型タンパク質に対して生成し、第2抗HPV抗体が細胞溶解物において1個以上のパピローマウイルス性タンパク質と結合および検出できるようにする。

【図面の簡単な説明】

【0015】

40

【図1A】図1Aは、抗E7抗体を用いてIHCによってマイクロアレイ染色した組織からの扁平上皮癌(SCC)組織の画像である。

【図1B】図1Bは、図1AからのSCC対象の正常上皮(腫瘍組織から15mm離れた)の画像である。

【図1C】図1Cは、同じ抗E7抗体を用いてIHCによってマイクロアレイ染色した組織からの他のSCCサンプルの画像である。

【図1D】図1Dは、図1C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。

【図2A】図2Aは、抗E7抗体を用いてIHCによって染色した組織からの腺腫内癌(ADC)サンプルの腫瘍細胞の画像である。

【図2B】図2Bは、図2AからのADCサンプルの正常上皮(腫瘍から15mm離れた

50

)に対応する画像である。

【図2C】図2Cは、図2Aからの腺腫内癌腫瘍の細胞質染色の拡大画像である。

【図3A】図3Aは、本発明の他の実施形態に従ったIHC分析におけるマウスモノクローナル抗HPV E7抗体を用いたCIN3組織の形成不全の染色画像である。

【図3B】図3Bは、CIN3形成不全の特定の核染色を示す、図2Aの形成不全上皮の拡大画像である。

【図4A】図4Aは、本発明の他の実施形態に従ったIHC分析におけるマウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いたCIN2組織の形成不全細胞の染色画像である。

【図4B】図4Bは、同じマウスモノクローナル抗体IHC分析を用いた図1AのCIN2サンプルの形成不全組織に隣接した正常上皮の染色画像である。

10

【図4C】図4Cは、本発明の他の実施形態に従ったIHC分析における図1Aの一つとしての同じ抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いたCIN3組織の形成不全上皮の染色結果を示す図である。

【図4D】図4Dは、本発明の他の実施形態に従ったIHC分析における図1Cの一つとしての同じ抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いた他のCIN3組織の形成不全上皮の染色結果を示す図である。

【図5A】図5Aは、本発明の一つの実施形態に従ったICC分析における抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いた、液体溶液における、ASCUSと診断された臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図5B】図5Bは、本発明の他の実施形態に従ったICC分析における抗HPV E7マウスモノクローナル抗体を用いた図5Aにおいて示したのと同じ臨床サンプルの染色結果を示す図である。

20

【図6A】図6Aは、本発明の一つの実施形態に従ったICC分析における抗HPV E7マウスモノクローナル抗体を用いた、液体溶液における、CIN2と診断された臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図6B】図6Bは、本発明の他の実施形態に従ったICC分析における抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いた、液体溶液における、CIN2と診断された他の臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図7A】図7Aは、本発明の他の実施形態に従ったICC分析における抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いた、液体溶液における、CIN3と診断された臨床サンプルの染色結果を示す図である。

30

【図7B】図7Bは、図7Aにおいて用いたのと同じ抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いた、液体溶液における、CIN3と診断された臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図7C】図7Cは、図7Bにおいて用いたのと同じ臨床サンプル上で同じ抗HPV E6マウスモノクローナル抗体で染色した他のICC染色画像である。

【図7D】図7Dは、図7Bにおいて用いたのと同じ臨床サンプル上で同じ抗HPV E6マウスモノクローナル抗体で染色した他のICC染色画像である。

【図7E】図7Eは、図7Bにおいて用いたのと同じCIN3サンプル上であるが、本発明の他の実施形態に従った抗HPV E7マウスモノクローナル抗体で染色した他のICC染色結果を示す図である。

40

【図7F】図7Fは、図7Eにおいて示したのと同じCIN3サンプル上で同じ抗HPV E7マウスモノクローナル抗体で染色した他のICC染色画像である。

【図7G】図7Gは、図3Bにおいて示したのと同じCIN3サンプル上であるがICC分析において抗p16マウスモノクローナル抗体で染色した染色結果を示す図である。

【図8】図8は、腺腫癌と診断され本発明の他の実施形態に従ったICC分析において抗HPV E6マウスモノクローナル抗体で染色した臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図9A】図9Aは、扁平内皮癌(SCC)と診断され本発明の他の実施形態に従ったICC分析において抗HPV E6マウスモノクローナル抗体で染色した臨床サンプルの染

50

色結果を示す図である。

【図 9 B】図 9 B は、図 9 A において用いたのと同じ S C C サンプルで、本発明の他の実施形態に従った I C C 分析において抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体で染色した染色結果を示す図である。

【図 9 C】図 9 C は、本発明の他の実施形態に従った I C C 分析において抗 p 1 6 マウスモノクローナル抗体を用いた図 9 A において用いたのと同じ S C C サンプルの染色結果を示す図である。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、正常と診断され本発明の他の実施形態に従った I C C 分析において抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体で染色した臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図 1 0 B】図 1 0 B は、図 6 A において用いたのと同じサンプルで、本発明の他の実施形態に従った I C C 分析において抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体で染色した染色結果を示す図である。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、本発明の他の実施形態に従った I C C 分析において抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体での他の子宮頸部かき取りサンプルの細胞質部分の染色を示す図である。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体での図 1 1 A で用いたものと同じサンプルの核部分の染色を示す図である。

【図 1 1 C】図 1 1 C は、抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体での他の子宮頸部かき取りサンプルの細胞質部分の染色を示す図である。

【図 1 2 A】図 1 2 A は、C I N 1 と診断され本発明の他の実施形態に従った I C C 分析において抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体で染色した臨床サンプルの染色結果を示す図である。

【図 1 2 B】図 1 2 B は、同じ抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いた図 1 2 A において示したのと同じ C I N 1 サンプルの他の I C C 染色画像を示す図である。

【図 1 2 C】図 1 2 C は、同じ抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いた図 1 2 A において示したのと同じ C I N 1 サンプルの他の I C C 染色画像を示す図である。

【図 1 2 D】図 1 2 D は、図 1 2 A において示したのと同じ C I N 1 サンプルであるが、本発明の他の実施形態に従った I C C における抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体を用いて染色した染色結果を示す図である。

【図 1 2 E】図 1 2 E は、同じ抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体を用いた図 1 2 D において示したのと同じ C I N 1 サンプルの他の I C C 染色画像を示す図である。

【図 1 2 F】図 1 2 F は、本発明の他の実施形態に従った I C C 分析における抗 p - 1 6 マウスモノクローナル抗体を用いた図 1 2 A において示したのと同じ C I N 1 サンプルの染色結果を示す図である。

【図 1 3 A】図 1 3 A は、本発明の一つの実施形態に従った抗 H P V L 1 マウスモノクローナル抗体を用いた H P V L 1 を検出するドットプロット分析の結果を示す図である。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、図 1 において用いたのと同じ抗 H P V L 1 抗体を用いた H P V L 1 を検出する他のドットプロット分析の結果を示す図である。

【図 1 4 A】図 1 4 A は、本発明の他の実施形態に従った抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いた H P V E 6 を検出する図 1 3 A に示したのと同じドットプロットを用いた結果を示す図である。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、本発明の他の実施形態に従った図 1 4 A において用いたのと同じ抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いた H P V E 6 を検出する図 1 3 B に示したのと同じドットプロットを用いた結果を示す図である。

【図 1 5】図 1 5 は、本発明の他の実施形態に従った抗 H P V E 7 タンパク質を検出する抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体でドットした図 1 3 A および図 1 4 A において示したのと同じドットプロットの結果を示す図である。

【図 1 6】図 1 6 は、本発明の他の実施形態に従った様々な H P V タンパク質および様々

10

20

30

40

50

な細胞内因性タンパク質を検出する10個の子宮頸部かき取りからの細胞溶解物上で行った抗体マイクロアレイ分析の平均蛍光強度の結果を示すグラフである。

【図17】図17は、本発明の他の実施形態に従ったHPV L1タンパク質を検出する図16において示した10個の細胞溶解物サンプルのそれぞれに対する抗体マイクロアレイ分析の平均蛍光強度の結果を示す他のグラフである。

【図18】図18は、本発明の他の実施形態に従ったHPV E7タンパク質および細胞p16INK4aタンパク質を検出する図16において示した10個の細胞溶解物サンプルのそれぞれに対する抗体マイクロアレイ分析の平均蛍光強度の結果を示す他のグラフである。

【図19】図19は、本発明の他の実施形態に従ったHPV L1タンパク質および細胞p53タンパク質を検出する図16において示した10個の細胞溶解物サンプルのそれぞれに対する抗体マイクロアレイ分析の平均蛍光強度の結果を示す他のグラフである。

【図20】図20は、本発明の他の実施形態に従ったHPV E7タンパク質およびRbタンパク質の細胞リン脂質を検出する図16において示した10個の細胞溶解物サンプルのそれぞれに対する抗体マイクロアレイ分析の平均蛍光強度の結果を示す他のグラフである。

【図21】図21は、サンプルS2に対する抗体マイクロアレイ分析の蛍光強度結果を示す他のグラフである。

【図22】図22は、本発明の他の実施形態に従った細胞p21WAF1およびp53タンパク質を検出する図16において示した10個の細胞溶解物サンプルのそれぞれに対する抗体マイクロアレイ分析の平均蛍光強度の結果を示す他のグラフである。

【図23】図23は、本発明の他の実施形態に従ったコーティングおよび検出に対する抗HPVラビットポリクローナル抗体を用いたHPV陰性血清サンプル(PCRによる)と比較した、SCC(扁平上皮細胞癌)またはHPV陽性(PCRによる)と診断されたヒト血清サンプルにおけるHPV E6, E7およびL1タンパク質を検出するELISA分析の結果を示す図である。

【図24】図24は、コーティング抗体としての抗HPV16 L1マウスモノクローナル抗体、および検出抗体としての抗HPV16 L1ラビットポリクローナル抗体を用いた組み換え型HPV16 L1タンパク質を検出するFACSによるサンドウィッチビーズ分析の結果を示す図である。

【図25】図25は、コーティング抗体としての抗HPV16 E6マウスモノクローナル抗体および検出抗体としての抗HPV16 E6ラビットポリクローナル抗体を用いた組み換え型HPV16 E6タンパク質を検出するFACSによるサンドウィッチビーズ分析の結果を示す図である。

【図26】図26は、コーティング抗体としての抗HPV18 E6マウスモノクローナル抗体および検出抗体としての抗HPV18 E6ラビットポリクローナル抗体を用いた組み換え型HPV18 E6タンパク質を検出するFACSによるサンドウィッチビーズ分析の結果を示す図である。

【図27】図27は、コーティング抗体としての抗HPV16 E7マウスモノクローナル抗体および検出抗体としての抗HPV16 E7ラビットポリクローナル抗体を用いた組み換え型HPV16 E7タンパク質を検出するFACSによるサンドウィッチビーズ分析の結果を示す図である。

【図28】図28は、コーティング抗体としての抗HPV16 E6マウスモノクローナル抗体および検出抗体としての抗HPV16 E6ラビットポリクローナル抗体を用いた組み換え型HPV16 E6タンパク質を検出するFACSによるサンドウィッチビーズ分析の結果を示す図である。

【図29】図29は、検出抗体としての抗HPV18 E6マウスモノクローナル抗体およびコーティング抗体としての抗HPV18 E6ラビットポリクローナル抗体を用いた組み換え型HPV18 E6タンパク質を検出するFACSによるサンドウィッチビーズ分析の結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図30A】図30Aは、金粒子を結合させた膜上にストリップしたラビット抗HPV L1ポリクローナル抗体を用いたHPV L1組み換え型タンパク質（左から右へ875, 435, 0 μg/mL）を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

【図30B】図30Bは、図30Aにおいて示したのと同じストリップを用いた正常（HPV陰性として既知）血清（右）と比較したSCC（扁平上皮細胞癌）患者（左）からのヒト血清サンプルにおけるHPV L1タンパク質を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

【図30C】図30Cは、検出のために金粒子を結合させた膜上にストリップしたマウス抗HPV E6モノクローナル抗体を用いたHPV E6組み換え型タンパク質（左から右へ10, 2, 0 μg/mL）を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

10

【図30D】図30Dは、図30Cにおいて示したのと同じストリップを用いた正常（HPV陰性として既知）血清（右）と比較したSCC（扁平上皮細胞癌）患者（左から第1および第2）からのヒト血清サンプルにおけるHPV L1タンパク質を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

【図30E】図30Eは、検出のために金粒子を結合させた膜上にストリップした他のマウス抗HPV E6モノクローナル抗体を用いたHPV E6組み換え型タンパク質（左から右へ875, 435, 0 μg/mL）を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

【図30F】図30Fは、検出のために金粒子を結合させた膜上にストリップしたマウス抗HPV E7モノクローナル抗体を用いたHPV E7組み換え型タンパク質（左から右へ0, 660, 66, 6.6, 0.66 μg/mL）を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

20

【図30G】図30Gは、図30Fにおいて示したのと同じストリップを用いた既知のHPV陰性血清（右）と比較した既知の陽性ヒト血清サンプル（左）からのHPV E7タンパク質を検出するワンステップ側方流動分析の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

1. 抗血清および抗HPV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HPV組み換え型タンパク質

30

HPV組み換え型タンパク質は、限定することはないが、E2, E6, E7, L1, L2等の初期遺伝子および/または後期遺伝子のHPVタンパク質である、いずれかの種類のHPVタンパク質であり、様々なHPV型からでよい。全長E6, E7および/またはL1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E6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E6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E6およびE7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HPV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。

40

【0017】

1) HPV16 E6およびHPV18 E6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HPV型であるHPV-16からの例示的な発癌性E6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HPV16 E6遺伝子は、全HPV-16 E6遺伝子の157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（PCR）増幅によって得られた474塩基対（b.p.）DNAフラグメントである。独立したDNA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

50

によって確認した。組み換え型HPV-18 E6タンパク質も得た。すべ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、HPV18 E6遺伝子もクローン化し、DNA配列を確認した。

【0018】

2) HPV16 E7およびHPV18 E7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HPV型であるHPV-16からの例示的な発癌性E7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HPV16 E7遺伝子は、全HPV-16 E7遺伝子の99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(PCR)増幅によって得られた294塩基対(b.p.)DNAフラグメントである。独立したDNA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E7 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。

10

【0019】

3) HPV16 L1およびHPV18 L1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HPV型であるHPV-16からの例示的な発癌性E7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HPV16 E7遺伝子は、全HPV-16 L1遺伝子の531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(PCR)増幅によって得られた1596塩基対(b.p.)DNAフラグメントである。独立したDNA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。

20

【0020】

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。

30

【0021】

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。

40

【0022】

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

50

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。

【0023】

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。

【0024】

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1gGをHPV免疫分析に対する抗HPV抗体として用いた。

【0025】

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ずれかの初期段階HPV感染かどうかは確証できない。加えて、後期段階HPV検出は、疾患の医療介入および治療するには遅すぎる。

【0026】

本願明細書に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。本願明細書に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ニングする有効なツールを提供し；疾患の進行に介入する手段および初期治療を提供する機械を提供する。

【0027】

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定をELISA分析によって試験し、その後定期的な

10

20

30

40

50

ブースティングおよび出血させた。マウスの血清の滴定は最適となり、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。

【0028】

1) ハイブリドーマのスクリーニング

本発明において説明する、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。

10

【0029】

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

【0030】

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。

【0031】

4. 各抗HPV抗体の特異性

一つの実施形態において、HPV IHC分析を行うキットを提供する。このキットは、抗原回復剤、前-抗体ブロッキング溶液、後-抗体ブロッキング溶液、一次抗体としての抗HPV抗体、二次抗体としてのHRPもしくはビオチンまたは他の物質と結合した抗マウスまたは抗ラビット免疫グロブリン、二次抗体を検出する基質として用いる適切な化学物質を含む溶液を含む。

30

【0032】

抗原回復剤は、低いpHまたは中性pHもしくは高いpH緩衝液における溶液を含む。前-抗体ブロッキング溶液は、細胞が抗体に非特異的に結合するのをブロックする特定のタンパク質もしくはBSA、または血清または他の化学物質を含む。後-抗体ブロッキング溶液は、一次抗体の培養に用いるタンパク質または血清を含まない前-抗体ブロッキング溶液と同様の溶液である。HPV抗体を含む溶液は、濃縮して、または試薬を準備して希釈する。抗HPV抗体はまた、基質として用いた以下の適切な化学物質を検出するHRPもしくはビオチン、または他の化学物質で直接タグを付ける。二次抗体を含む溶液は、濃縮して、または試薬を準備して希釈する。基質として用いる適切な化学物質を含む溶液は、1コンポーネントもしくは2コンポーネントとしてのDAB(3,3'-ジアミノベンジジン)、1コンポーネントもしくは2コンポーネントとしてのAEC(3-アミノ-9-エチルカルバゾール)基質または他の基質がある。一度子宮頸部組織を処理および固定したら、免疫化学(IHC)分析を、一定時間抗原回復緩衝液でスライドガラス上の組織を沸騰させて行う。スライドガラスをその後室温まで冷却し、一定時間前-ブロッキング溶液でブロッキングし、その後HPV抗体で培養した。その後、スライドガラスをPBSもしくはH₂Oまたは他の溶液で3~5回洗浄し、いずれかの未結合HPV抗体を除去した。その後、スライドガラスを、例えば抗マウスIgG HRP等の二次抗体で培養し、検出のための適切な基質で培養した。例として、DABは、ペルオキシダーゼまたは過酸化水素の存在下で酸化させ、その結果、茶色のアルコール溶解性沈殿物が酵素活性状態

40

50

で堆積する。沈殿物は、存在する酵素の量によって明茶色から暗琥珀色に色が変化する。顕微鏡で観察した琥珀色の沈殿物は、スライドガラス上の組織切片の細胞に存在するHPVタンパク質とのHPV抗体の特異的な結合を示す。この分析は、結合反応が加速するように室温または高温で行う。このHPV IHC分析は手で行う、またはIHCオートメーションによって操作し、*in situ*でHPV感染およびHPV発癌タンパク質を検出する強力なツールを提供する。したがって、HPV IHC染色分析は、確認試験として非常に有効である。形成不全細胞を特定するため、HPV IHC染色は、HPV感染の状態および/またはHPV発癌タンパク質の発現に対するさらなる情報を提供する。したがって、子宮頸部形成不全の様々な段階におけるHPV E6およびE7発癌タンパク質の過剰な発現は、CINおよび/または子宮頸癌発達の進行を示す。

10

【0033】

サンプル選択および準備：本発明において提供する抗HPV抗体が異なる段階のCINまたは癌から*in situ*でHPVタンパク質を検出できるかどうかを分析するため、IHC分析上で試験する子宮頸部組織には、CIN2（穏やかに見られる病変を有する子宮頸部上皮内癌ステージ2）およびCIN3（重度に見られる病変を有する子宮頸部上皮内癌ステージ3）、扁平上皮細胞癌（SCC、子宮頸癌における最も一般的な癌）および腺癌（ADC、腺型の癌）からなる子宮頸癌からなる。4ミクロンに切断したパラフィン組織ブロックをスライドガラス上に置き、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。HPVタンパク質に対する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。

20

【0034】

組織マイクロアレイ。一つの反応における多くのサンプルに対して均一な分析を行うため、組織マイクロアレイを生成して一つのスライドガラス上の多くのサンプルにスポットした。CIN2、CIN3または浸潤癌からの全84サンプルを処理するため、3個の組織マイクロアレイを準備した：一つは30個の独立したCIN2およびそれらの周囲の正常上皮を含み、一つは30個の独立したCIN3およびそれらの周囲の正常上皮を含み、一つは12個の子宮頸部扁平上皮細胞癌およびそれらの周囲の正常上皮に相当するものをおよび、12個の腺癌およびそれらの正常上皮に相当するもの、肉眼的腫瘍境界から少なくとも15mm離れた膣または子宮頸部粘膜を含む。内癌形成に対する一つの組織スポットおよびその正常なものを示す他のスポットを各CINに対して取った。浸潤癌の場合、腫瘍組織の2スポットおよび正常部分の1スポットを取った。2mm周囲の阻止スポットを、HPV DNAタイピングに対する組織スライドを取った後に対応するパラフィン固定組織ブロックから回収した。

30

【0035】

HPV DNAテスト。各場合に対するHPV DNAタイピングは、ナイロン膜上に13型特異性のオリゴヌクレオチドを有する。Easy Chip（登録商標）HPVプロットまたはHR-HPVチップを用いた修飾MY11/GP6+PCR逆プロット分析によって特定した。全細胞DNAを増幅するための核酸のソースとして、またその後、検出するためハイブリダイゼーションして用いた。

40

【0036】

IHCスコアおよびデータの解釈。組織マイクロアレイスライド上の各ドットの染色は、顕微鏡下で有資格の解剖病理学者によって観察した。腫瘍細胞または形成不全細胞の範囲は、スコア0~3の染色強度で染色した細胞のパーセンテージで示した。対応する形成不全または腫瘍から15mm離れた隣接する正常上皮または正常組織もスコアした。すべてのデータは、有資格の病理学者によってスコアした。染色した10%は、分析の陽性または陰性を画定するためにカットした。すべてのデータを表1~17において示す。

【0037】

浸潤子宮頸癌におけるHPVタンパク質の検出を行うため、最も一般的な子宮頸癌と思

50

われる扁平内皮細胞癌 (SCC) の組織を HPV IHC 分析を行うように処理した。図 1 A ~ 1 D は、マウスモノクローナル HPV E7 抗体を用いた扁平上皮細胞癌組織の IHC 染色を示す。図 1 A は、抗 HPV E7 マウスモノクローナル抗体を用いた IHC によって染色した組織マイクロアレイからの SCC 組織の画像である。図 1 B は、図 1 A からの SCC 対象の正常上皮 (腫瘍組織から 15 mm 離れた) の画像を示す。図 1 C は、同じ抗 E7 抗体を用いて IHC によってマイクロアレイ染色した組織からの他の SCC サンプルの画像である。図 1 D は、図 1 C からの細胞質において同じ抗 HPV E7 抗体によって染色した腫瘍細胞の拡大画像である。結果は、E7 発癌タンパク質の発現は腫瘍細胞または SCC 組織において検出できることを示す。黒色矢印は、腫瘍細胞における E7 タンパク質の特異的な染色を示し、白色矢印は、染色されていない正常細胞を示す。これらの結果は、SCC 子宮頸部組織からの HPV タンパク質の *in situ* での存在が IHC 分析において用いるマウスモノクローナル抗 HPV E7 抗体によって検出できることを示す。

10

【0038】

他の型の浸潤子宮頸癌における HPV タンパク質の検出を行うため、図 2 A ~ 2 C は、同じマウスモノクローナル HPV E7 抗体を用いた子宮頸部腺癌の IHC 染色を示す。結果は、E7 発癌タンパク質の発現は、腺癌組織の腫瘍細胞において検出できることを示す。黒色矢印は腫瘍細胞における E7 タンパク質の特異的な染色を示し、白色矢印は染色されない正常細胞を示す。図 2 A は、図 1 において示したのと同じ抗 HPV E7 モノクローナル抗体を用いて IHC によって染色した腺腫内癌 (ADC) サンプルの腫瘍細胞の画像である。図 2 B は、図 2 A からの ADC サンプルの正常上皮 (腫瘍から 15 mm 離れた) に対応する画像である。図 2 C は、図 2 A からの腺腫内癌腫瘍の細胞質染色の拡大画像である。拡大画像は、正常上皮または間質細胞等の他の細胞ではなく腫瘍細胞の細胞質において発現した E7 タンパク質の場所を示す。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 SCC において見られる類似の染色パターンを示す腺腫内癌の主要細胞を検出することができることを示す。

20

【0039】

各浸潤癌の各対象からの HPV IHC 結果を分析するため、表 1 は、図 1 A ~ D および図 2 A ~ 2 C において示した抗 HPV E7 抗体を用いた C, N の後に % で示した、細胞質 (C) および核 (N) を染色する IHC スコアした 24 ケースの浸潤癌サンプルからのデータを示す。他の抗 E7 抗体、MAb 1 および MAb 7 等の抗 HPV E6 抗体および抗 HPV L1 抗体等のさらなる抗 HPV 抗体も同じ組織マイクロアレイ上で試験した。様々な抗 HPV 抗体による IHC 染色をするため、他の抗 HPV 抗体を用いた腫瘍細胞の細胞質染色からの IHC スコアも示した。HPV DNA タイピングの結果もその対応する場合に対して表において示した。

30

【0040】

表 1 において示したデータのように、核および細胞質の染色の両方が抗 E7 抗体によって染色した SCC および ADE 染色した腫瘍細胞のすべての対象において見られる。しかし、腫瘍細胞の核の染色と比較して、腫瘍細胞の細胞質における染色は多くない (染色パーセンテージ)。その隣接する正常上皮細胞における HPV E7 タンパク質の検出は核においてのみ見られ、上皮細胞の細胞質においては見られない。細胞質の染色は、対応する正常な隣接細胞と比較して腫瘍細胞において最も区別できる。これらのデータは、HPV E7 タンパク質の発現が SCC および ADE 組織の腫瘍細胞の細胞質および核において検出されたことを示す。腫瘍細胞の細胞質において発現するが、正常な隣接する上皮および間質細胞において発現しない E7 タンパク質の局在化は腫瘍特異性を示す。抗 HPV E7 抗体によって検出した正常な隣接する上皮および腫瘍細胞の核に存在する HPV E7 タンパク質は、発癌タンパク質が発現した HPV 感染を示す。同様の染色パターンは、表 1 において示すように他の HPV 抗体を用いたときにも見られた。データは、本願明細書で記載する HPV IHC 分析は、子宮頸がん組織の腫瘍細胞に存在する E6, E7 等の HPV 初期遺伝子および L1 等の後期遺伝子タンパク質を検出できることを示す。

40

50

【 0 0 4 1 】

HPV IHCの結果をHPV DNAタイピングと比較すると、抗E7抗体は、試験するサンプルに存在するすべてのHPV型と陽性反応する。例えば、本願明細書に記載する抗E7モノクローナル抗体は、癌に関連するHPV型（高リスクHPV型）である、少なくともHPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45などによって1個のHPV感染を検出できる。1個の抗E7モノクローナル抗体はまた、高リスク、低リスク、および非発癌タンパク質 - パピロームウイルス等のHPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-52, HPV-58, HPV-51, HPV-59などの組み合わせ等の2個以上のHPV型によるHPV感染も検出する。しかし、多くのHPV型による感染には、少なくとも1個の型が高リスクHPV型である。これらのデータは、本発明において説明する抗E7抗体が型に特異的でなく、子宮頸癌における最も一般的な高リスクHPV型からのHPV E7タンパク質を検出する強力なツールを提供する。

10

【 0 0 4 2 】

重度の形成不全子宮頸部組織（HSIL；重度扁平上皮内病変、ステージ3）を有する非浸潤におけるHPVタンパク質の検出を行うため、図3は、同じマウスモノクローナルHPV E7抗体を用いたCIN3組織のIHC染色を示す。結果は、E7発癌タンパク質の発現がステージ3のCIN組織において検出されることを示す。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し、白色矢印は染色されていない正常細胞を示す。図3Aは、浸潤子宮頸部組織に対して図1および図2において示したのと同じ抗HPV E7抗体を用いたIHCによって染色した子宮頸部上皮内腫瘍（CIN3）組織の形成不全細胞の画像である。図3Bは、図3AのCIN3組織の隣接する正常上皮の画像である。これらの結果は、CIN3子宮頸部組織からのHPV E7タンパク質の*in situ*の存在は、本願明細書に記載するIHC分析において用いたマウスモノクローナル抗HPV E7抗体によって検出できることを示す。

20

【 0 0 4 3 】

【表 1】

12個のSCC生検サンプルおよび12個のADC生検サンプルに対するIHC染色結果(染色%)およびHPV DNAタイピング(C:細胞質;N:核;Dys:形成不全または腫瘍細胞)

サンプル	HPV型	抗E7				他の抗E7	抗E6	他の抗E6	抗L1
		Dys (%染色)		正常上皮(%染色)		Dys (%)	Dys (%)	Dys (%)	Dys (%)
		C	N	C	N	C	C	C	C
SCC-1	18	85	85	0	20	12.5	10	70	55
SCC-2	16,52	90	85	0	25	15	15	10	55
SCC-3	16	60	65	0	40	5	0	10	20
SCC-4	16	92	50	0	40	5	0	10	85
SCC-5	16,52,58	92	55	0	50	20	5	15	88
SCC-6	18,52,58	90	60			25	18	10	70
SCC-7	16,52	92	75	0	30	30	5	10	20
SCC-8	16,58	10	10	0	5	25	0	10	50
SCC-9	DNAなし	95	60	0	40	0	8	15	8
SCC-10	18	92	65	0	60	45	25	20	65
SCC-11	16,58			0	80	5		0	0
SCC-12	33	95	90	0	0	30	1	20	55
ADE-1	16,18	30	20	0	50	15	25	20	82
ADE-2	DNAなし	62	40	0	30	35		35	78
ADE-3	16	20	30	0	20	35	1		60
ADE-4	16,18	80	80	0	0	10	25	0	90
ADE-5	51,52	95	80	0	50	10	70	15	92
ADE-6	11,16,52			0	40	5	0	0	15
ADE-7	18	50	40	0	60	25	20	20	75
ADE-8	18	85	60	0	40	15	50	15	82
ADE-9	45	82	55	0	30	30	2	20	40
ADE-10	18	15	10	0	40	15	15	5	70
ADE-11	18,59	70	0	0	50	15	8	5	65
ADE-12	18								30

【0044】

表2は、CINサンプルのパップスミアによって確認した30個のヒト対象からのHPV IHC結果を示す:抗E7抗体で染色したM, C, Nの後に%で示す細胞膜(M), 細胞質(C), および核(N)の染色)。さらなる抗HPV抗体には、MAb1およびMAb7等の抗HPV E6抗体および抗HPV L1抗体も同じ組織マイクロアレイ上で試験する。様々な抗HPV抗体によるIHC染色を行うため、他のHPV抗体を用いた腫瘍細胞の細胞質染色からのIHCスコアも示した。HPV DNAタイピングの結果も対応する場合に対して表に示した。この結果は、形成不全細胞の核よりも細胞質において多くの染色が見られることを示す。浸潤癌組織において以前見られたように、その隣接する正常上皮細胞におけるHPV E7タンパク質は核においてしか見られず、上皮細胞の細

胞質においては見られなかった。細胞質の染色は、対応する正常な隣接細胞と比較して形成不全細胞において最も区別できる。形成不全の細胞質において発現するが正常な隣接する上皮および間質細胞において発現しないE7タンパク質の局在化はHSIL特異性を示す。これらのデータは、HPV E7タンパク質の発現がCIN3組織の形成不全細胞の細胞質および核において検出されたことを示す。

【0045】

抗HPV E7抗体によって検出した正常な隣接する上皮および形成不全細胞の核に存在するHPV E7タンパク質は、発癌タンパク質が発現したHPV感染を示す。形成不全細胞の細胞質において検出されるHPV E7タンパク質の高レベルの発現の場合、形成不全の進行のリスクを示唆する。同様の染色パターンは、他のHPV抗体を用いたときにも見られた。データは、本願明細書に記載するHPV IHC分析は、子宮頸がん組織の腫瘍細胞に存在するE6, E7等のHPV初期遺伝子およびL1等の後期遺伝子タンパク質を検出できることを示す。

10

【0046】

HPV IHCの結果をHPV DNAタイピングと比較すると、抗E7抗体は、試験するサンプルに存在するすべてのHPV型と陽性反応する。例えば、本願明細書に記載する抗E7モノクローナル抗体は、癌に関連するHPV型(高リスクHPV型)である、少なくとも1個のHPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-58などによって1個のHPV感染を検出できる。1個の抗E7モノクローナル抗体はまた、最も一般的な高リスクHPV型であるHPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-58などの組み合わせ等の2個以上のHPV型によるHPV感染も検出する。これらのデータは、抗E7抗体が型に特異的でなく、CIN3組織における最も一般的な高リスクHPV型からのHPV E7タンパク質を検出する強力なツールを提供する。

20

【0047】

【表 2】

30個のCIN3サンプルに対するIHC染色結果およびHPV DNAタイピング (染色%およびスコア; 0~3)、HPV DNAタイピング (M:細胞膜; C:細胞質; N:核; Dys:形成不全)

ID	HPV型	抗E7						抗E6	他の抗E7	抗L1
		Dys (%染色)			正常上皮 (%染色)			Dys (%)	Dys (%)	Dys (%)
		M	C	N	M	C	N	C	C	C
31	33	0	80	80	0	0	50	70	40	80
32	16	0	80	80			60	0	0	5
33	16,58				0	0	60			
34	31	0	50	70	0	0	50	0	0	10
35	16,39	0	70	90	0	0	40	0	10	30
36	31	0	70	60	0	0	50	0	20	20
37	39	0	0	40	0	0	0	0	0	0
38	16				0	0	40			
39	16	0	80	70	0	0	40	0		0
40	58	0	90	90	0	0	40	50	0	30
41	16	0	0	50	0	0	50	0	20	20
42	16	0	70	70	0	0	50	0	0	
43	33	0	0	90	0	0	30	0	0	5
44	52	0	70	80	0	0	50	70	10	50
45	51,52	0	90	90	0	0	30	80	50	10
46	16	0	0	80	0	0	50	0	0	5
47	16	0	60	80	0	0	50	30	10	20
48	16,58	0	0	80	0	0	50	0	0	10
49	31	0	80	60			50	70	40	40
50	16	0	0	60	0	0	30	0	20	20
51	6				0	0	20		0	
52	16,18,33,39	0	0	20	0	0	30	0	0	0
53	51,52,58	0	70	60	0	0		60	60	40
54	16,45	0	0	70	0	0	50	0	20	20
55	16	0	0	75	0	0	50	0	0	0
56	33,52	0	0	80	0	0	40	0	0	10
57	16	0	0	50	0	0	40	0	0	0
58	33	0	0	80	0	0		0	20	10
59	16	0	0	60	0	0	20	0	10	5
60	16,52,58	0	70	80	0	0	50	70	0	20

10

20

30

40

50

【0048】

わずかな形成不全 (CIN2のステージ2) を有するHSILにおけるHPVタンパク質の検出を行うため、図4は、マウスモノクローナルHPV E6抗体を用いたCIN2組織のIHC染色を示す。結果は、E6発癌タンパク質の発現がCINのステージ2における初期に検出されることを示す。図4Aは、抗E6モノクローナル抗体を用いた免疫細胞分析染色 (IHC) によって染色した子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN2) 組織の形成不全細胞の画像である。図4Bは、図4AのCIN2サンプルの形成不全組織からの隣接する正常上皮の画像である。図4Cは、同じ抗HPV E6マウスモノクローナル抗体を用いたIHCによって染色した他のCIN2サンプルの形成不全上皮の画像である。図4Dは、図4Cにおける形成不全上皮の拡大画像である。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し、白色矢印は染色されていない正常細胞を示す。CIN3におけるCIN2の同様の染色パターンは、形成不全細胞の細胞質において発現するが

、正常上皮または間質細胞等の他砂防においては発現しないE 6タンパク質の局在化を示す。

これらの結果は、C I N 2子宮頸部組織からのHPV E 6タンパク質の*in situ*の存在は、本願明細書で記載するIHC分析において用いたマウスモノクローナル抗HPV E 7抗体によって検出できることを示す。

【0049】

C I N 2の各対象からのHPV IHC結果を分析するため、表3は、抗E 7抗体で染色したM, C, Nの後に%で示す細胞膜(M), 細胞質(C), および核(N)の染色に対するIHCスコアを有するC I Nサンプルの30個の場合からのデータを示す。さらなる抗HPV抗体には、MAb 1およびMAb 7等の抗HPV E 6抗体および抗HPV L 1抗体も同じ組織マイクロアレイ上で試験する。表3は、様々な抗HPV抗体によるIHC染色を行い、他のHPV抗体を用いた形成細胞の細胞質染色からのHPV DNAタイピングおよびIHCスコアの結果も示した。核染色は試験するすべてのC I N 2サンプルの形成不全において見られたが、抗E 6または抗E 7抗体による細胞質の染色は特定の部分しか見られなかった。この結果は、C I N 2において見られる形成不全細胞の細胞質よりも核に多くの染色が見られることを示す。

【0050】

【表 3】

30個の生検サンプル(CIN2)に対するIHC染色結果(染色%およびスコア;0~3)、HPV DNAタイピング(M:細胞膜;C:細胞質;N:核;Dys:形成不全)

ID	HPV 型	抗E7						抗E 6	他の 抗E7	抗L 1
		Dys (%染色)			正常上皮 (%染色)			Dys s (%)	Dys s (%)	Dys s (%)
		M	C	N	M	C	N	C	C	C
1	6	0	80	80	0	0	30	70	40	80
2	31	0	0	90				0	40	0
3	52	0	25	50	0	0	70	0	20	20
4	16	0	0	40	0	0	30	0	5	0
5	58	0	0	50	0	0	10	0	0	0
6	52	0	80	70	0	0	50	0	5	0
7	53	0	0	80	0	0	30	0	10	10
8	52	0	50	90	0	0	20	60	10	20
9	31	0	80	80	0	0	50	70	20	40
10	16	0	50	90	0	0	50	60	20	10
11	DNA なし	0	0	80	0	0	70	0	0	10
12	33	0	60	60	0	0	50	0	10	30
13	DNA なし	0	70	80	0	0	70	0	20	10
14	52	0	0	70	0	0	70	0	30	20
15	DNA なし	0	0	70	0	0	50	0	20	5
16	16	0	0	10	0	0	30	0	0	5
17	16	0	0	60	0	0	80	0	0	5
18	52,44	0	50	60	0	0	30	50	10	20
19	16	0	50	70				0	10	20
20	16,18, 6	0	50	80	0	0	40	0	30	30
21	16,31	0	0	50	0	0	50	0	20	20
22	6	0	0	40	0	0	0	0	10	0
23	16	0	0	30	0	0	60	0	0	
24	58	0	0	80	0	0	50	0	10	5
25	16,39, 52	0	0	10	0	0	60	0	0	0
26	58	0	0	40	0	0	40	0	10	5
27	16,39, 52				0	0	70		0	
28	6	0	0	50	0	0	70	0	10	5
29	16	0	0	70	0	0	5	0	10	20
30	66,68	0	0	30	0	0	60	0	10	0

10

20

30

40

50

【0051】

SCC, ADC, およびCIN3において、HPV E7タンパク質は、内皮細胞の核においてのみ見られ細胞質においては見られない隣接する正常内皮細胞において見られることを示す。抗E6タンパク質を用いたCIN2における細胞質の染色は、対応する正常な隣接細胞と比較して形成不全細胞において最も区別できる。形成不全の細胞質において発現するが正常な隣接する上皮および間質細胞において発現しないE6タンパク質の局在

化はHSIL特異性を示す。これらのデータは、HPV E6タンパク質の発現がCIN2組織の形成不全細胞の細胞質および核において検出されることを示す。形成不全細胞の細胞質において検出されるHPV E6タンパク質の高レベルの発現の場合、形成不全進行を示唆する。E6, E7等の初期タンパク質およびL1等の後期タンパク質は、本願明細書で記載するHPV IHC分析によってCIN2形成不全細胞において検出できる。

【0052】

HPV IHCおよびHPV DNAタイピングの結果を比較すると、抗E7抗体は、試験するサンプルに存在するすべてのHPV型と陽性反応する。例えば、本願明細書で記載する抗E7モノクローナル抗体は、癌に関連するHPV型(高リスクHPV型)である、少なくとも1個のHPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-52, HPV-58などおよび、高リスクHPV型でないHPV6およびHPV53によって1個のHPV感染を検出できる。1個の抗E7モノクローナル抗体はまた、最も一般的な高リスクHPV型および低リスクHPV型であるHPV6, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-39, HPV-44, HPV-52, HPV-58, HPV-66, HPV-68などの2個以上のHPV型によるHPV感染も検出する。これらのデータは、本発明において説明する抗E7抗体が型に特異的でなく、CIN2組織における一般的な高リスクHPV型および低リスクHPV型からのHPV E7タンパク質を検出することができる。発癌タンパク質の発現の結果である形成不全細胞の形成は、異なるHPV型の変化よりも可能である。この結果は、細胞質部分における検出不可能な発癌タンパク質を有する高リスク型による感染に対して起こる回復を説明する。したがって、本願明細書で記載するHPV IHC分析は、HPV感染の検出および形成不全進行の特定に対する臨床情報を提供する。

【0053】

細胞質染色は、対応する正常細胞と区別可能な形成不全細胞においてのみ見られるため、細胞質染色は形成不全進行における分析を行うのに用いた。異なる段階のCINまたは癌組織における形成不全細胞の特異的な細胞質染色を比較するため、表1~3からのデータをさらに分析性能を得るために分析した。各対象からの染色10%以上のパーセンテージは陽性と考え、さもなければ10%未満のサンプルに対しては陰性であるとする。

【0054】

【表4】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上の抗E7を用いたIHC染色の結果まとめ

	抗E7	形成不全 または腫瘍細胞 質染色	正常細胞 質染色	IHC陽 性率	特異性		
CIN2	陽性	11	0	38%	100%	100%	PPV
	陰性	18	28			61%	NPV
CIN3	陽性	14	0	52%	100%	100%	PPV
	陰性	13	28			68%	NPV
SCC	陽性	11	0	100%	100%	100%	PPV
	陰性	0	11			100%	NPV
ADC	陽性	10	0	100%	100%	100%	PPV
	陰性	0	10			100%	NPV

【0055】

【表 5】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上の他の抗E7を用いたIHC染色の結果まとめ

	抗E7	形成不全 または腫瘍細胞 質染色	正常細胞 質染色	IHC陽 性率	特異性		
CIN2	陽性	21	16	72%		57%	PPV
	陰性	8	9		36%	53%	NPV
CIN3	陽性	13	4	48%		76%	PPV
	陰性	14	25		86%	64%	NPV
SCC	陽性	8	5	67%		62%	PPV
	陰性	4	6		55%	60%	NPV
ADC	陽性	10	6	83%		63%	PPV
	陰性	2	6		50%	75%	NPV

10

20

【0056】

表4において示したデータのように、分析の陽性率は、CIN2、CIN3およびSCCまたはADEそれぞれに対してCINの重度で38%、52%、100%まで増加する。陽性的中率（PPV）および陰性的中率（NPV）も表において示し、細胞質のパーセント染色を用いて分析特異性を示す。HPV E7の発現を示すため、発癌タンパク質は他の抗E7モノクローナル抗体によって検出し、同じ組織マイクロアレイを試験して、表5において示し、CIN2、CIN3、SCCおよび腺癌それぞれに対して陽性率72%、48%、67%、83%を有する他のE7抗体の分析性能を示した。陽性的中率（PPV）および陰性的中率（NPV）は、この抗体を用いた分析特異性が良くないことを示す。

30

【0057】

【表 6】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上の抗E6を用いたIHC染色の結果まとめ

	抗E6	形成不全 または腫瘍細胞 質染色	正常細胞 質染色	IHC陽 性率	特異性		
CIN2	陽性	5	1	17%		83%	PPV
	陰性	25	29		97%	54%	NPV
CIN3	陽性	17	7	57%		71%	PPV
	陰性	13	23		77%	64%	NPV
SCC	陽性	7	1	64%		88%	PPV
	陰性	4	10		91%	71%	NPV
ADC	陽性	9	0	75%		100%	PPV
	陰性	3	12		100%	80%	NPV
計	陽性	38	9	46%	0%	81%	PPV
	陰性	45	74	0	89%	62%	NPV

10

20

【0058】

【表 7】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上の他の抗E6を用いたIHC染色の結果まとめ

	抗E6	形成不全 または腫瘍細胞 質染色	正常細胞 質染色	IHC陽 性率	特異性		
CIN2	陽性	5	0	17%		100%	PPV
	陰性	24	28		100%	54%	NPV
CIN3	陽性	8	0	30%		100%	PPV
	陰性	19	29		100%	60%	NPV
SCC	陽性	11	0	92%		100%	PPV
	陰性	1	11		100%	92%	NPV
ADC	陽性	9	0	75%		100%	PPV
	陰性	3	12		100%	80%	NPV
計	陽性	33	0	41%	0%	100%	PPV
	陰性	47	80	0	100%	63%	NPV

30

40

【0059】

HPV E6発癌タンパク質の発現の評価は抗E6モノクローナル抗体によって検出し、同じ組織マイクロアレイを試験し、2個の抗E6抗体の分析性能を示す表6および7に

50

おいて示す。データが示すように、浸潤癌サンプルからのCIN2、CIN3および腫瘍細胞からの形成不全細胞の細胞質において発現するE6タンパク質は、本発明において記載する抗E6抗体によって検出できる。CINの重度で増加する抗E7 IHC分析の陽性率を示す同じ傾向が抗E6抗体を用いた分析においても見られる。2個の抗E6抗体は、CINの重度に対して分析の陽性率が増加する同じ傾向を示すが、1個の抗E6抗体はもう一方よりも良い分析性能を与える。MAb1は、MAb7投与から異なるエピトープを認識でき、異なる分析性能を与える。しかし、両方のモノクローナル抗体は、表において示すように高い陽性的中率(PPV)および高い陰性的中率(NPV)を与える。抗E7抗体を用いたIHC分析の全陽性的中率(PPV)は、抗E6抗体を用いるよりも高い。E7タンパク質は子宮頸癌の初期検出に対するバイオマーカーとして機能するように初期に発現することができる。

10

【0060】

異なる段階のCINに存在するL1ウイルス性タンパク質の発現を検出するため、同じ組織マイクロアレイも抗L1抗体を用いてIHC分析上で試験した。細胞質のL1染色からのIHCスコアもすべてのサンプル上の陽性率を分析して得た。異なる段階のCINにおける*in situ*で発現したHPV初期および後期タンパク質の相互関係を調べるため、表8は、CIN2、CIN3および浸潤癌に対する細胞質におけるE7発現およびL1発現のIHC分析の陽性率を示す。E7は子宮頸癌の初期検出に対する良いバイオマーカーであると考えられ、本発明において記載したHPV IHC分析を用いて様々な段階のCINおよび浸潤癌組織におけるE7およびL1発現の相互関係を比較する。CINサンプルのL1 IHC陽性に対して、表8において示すように、CIN2の約60%(15のうち9)、CIN3の58%(19のうち11)がE7 IHC分析で陽性を示す。浸潤癌サンプルのL1細胞質陽性に対して、SCC(11のうち11)および腺癌(10のうち10)の両方の100%がE7細胞質陽性であり、癌進行のE7発現の100%の相互関係を示す。データは、CIN2/3のL1およびE7の細胞質陽性の両方が、IHC分析でそれらのL1陽性であるがE7陰性であるものと比較してさらなる形成不全進行にリスクが高いことを示す。

20

【0061】

表8は、細胞質におけるE7発現およびE6発現陽性のサンプルの相互関係を示す。データが示すように、E7細胞質陽性サンプルに対して、CIN2の約45%(11のうち5)、CIN3の57%(14のうち8)がE6細胞質発現で陽性を示すが、100%のSCC(11のうち11)または90%の腺癌(10のうち9)がE6細胞質発現を示す。これらのデータは、E6が初期形成不全の間はE7よりも発現するが、後期段階の子宮頸癌においては共に発現することを示す。

30

【0062】

【表 8】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上の抗L1および抗E6と比較した抗E7を用いたIHC染色の結果まとめ

サンプル 番号	CIN2		CIN3		SCC		ADC	
	L1 (+)	L1 (-)	L1 (+)	L1 (-)	L1 (+)	L1 (-)	L1 (+)	L1 (-)
E7陽性	9	2	11	3	11	0	10	0
E7陰性	2	8	8	5	0	0	0	0
サンプル 番号	E6 (+)	E6 (-)	E6 (+)	E6 (-)	E6 (+)	E6 (-)	E6 (+)	E6 (-)
E7陽性	5	6	8	6	11	0	9	1
E7陰性	0	17	0	13	0	0	0	0

10

【0063】

一つの反応におけるサンプルのすべての段階に対する均一な分析条件を得るため、組織マイクロアレイを生成して同じスライドガラス上にCIN2, CIN3および浸潤癌からの多くのサンプルをスポットした。2個の組織マイクロアレイを準備した：一つは10個の独立したCIN2, CIN3およびSCCおよびそれらの周囲の正常上皮を含み、一つは10個の独立したCIN2, CIN3およびADEおよびそれらの周囲の正常上皮を含む。HPV IHC分析は、HPVに関連する形成不全または子宮頸癌に特異的であることを確認するため、様々な正常ヒト組織からの90以上のサンプルを有するさらなる組織マイクロアレイも試験して、HPV IHC分析の陰性対象として用いた。抗E6および抗E7抗体を用いた同じHPV IHC分析は、上述したようにIHC染色パーセンテージを得るためにこれらの組織マイクロアレイ上に用いた。核および/または細胞質における10%以上のIHC染色は分析の陽性としてスコアした。

20

【0064】

30

【表 9】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上のモノクローナル抗HPV-E7を用いたIHC染色の結果

	CIN2	CIN3	SCC	ADC	合計
抗HPV E7陽性	34	43	22	23	122
抗HPV E7陰性	13	5	0	0	18
陽性率	72%	90%	100%	100%	87%

40

【0065】

【表 10】

CIN陰性サンプルと比較したCIN2+病変上のマウスモノクローナル抗E7抗体を用いた免疫組織化学染色結果まとめ

	CIN2 +	CIN 陰性	
抗HPV E7陽性	122	7	95%PPV
抗HPV E7陰性	18	85	83%NPV
感度	87%		
特異性		92%	

10

【0066】

まとめると、本願明細書で試験したすべての組織マイクロアレイからのIHCデータを表9～14において示した。表9は、子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上のモノクローナル抗HPV-E7を用いたIHC染色の結果を示す。表9におけるデータは、in situでのHPV E7タンパク質の存在は、CIN2、CIN3から扁平上皮細胞癌(SCC)または腺癌(ACC)等の浸潤癌組織まで様々な段階の子宮頸部組織で分析の陽性率が増加して検出できる。CIN2およびCIN3それぞれのサンプルに対して約72%および90%の陽性率である。癌組織(SCCおよびAD)に対して、100%のサンプルが抗HPV E7抗体を用いてIHCによって陽性に染色し、100%の癌がHPV発癌タンパク質を発現することを示す。これらのデータは、本発明において記載するHPV E7抗体を用いたIHC分析は、様々な段階における組織からの子宮頸癌の診断を確認する強力なツールを提供することを示す。

20

【0067】

分析性能を得るため、表9からのデータをさらに分析した。表10は、CIN2陰性サンプルとして正常のヒト組織を用いた表9からのIHC染色結果のまとめを示す。データは、抗HPV E7抗体を用いたIHC染色方法がCIN2+に対して87%の重度および92%の特異性のIHC分析を提供することを示す。これらのデータは、子宮病変CIN2以上であることを確認するためHPVタンパク質を検出するのに有効である。

30

【0068】

データをさらに分析するため、表11は、本発明において記載した抗HPV E7抗体の使用が95%の重度、92%特異性および93%の陽性的中率および95%の陰性的中率を有するCIN3+(CIN3および浸潤癌を含む)の免疫組織化学分析を提供することを示す表9および表10からの免疫組織化学染色結果のまとめを示す。これらのデータは、この分析が、異なる段階の子宮頸部病変を確認するHPVタンパク質を検出する臨床用途に有効であることを示唆する。

【0069】

【表 1 1】

CIN陰性サンプルと比較したCIN3+病変上のマウスモノクローナル抗E7抗体を用いた免疫組織化学染色結果まとめ

	CIN3 +	CIN 陰性	
抗HPV E7陽性	88	7	93%PPV
抗HPV E7陰性	5	85	94%NPV
感度	95%		
特異性		92%	

10

【0070】

E6タンパク質の発現が本発明において記載した抗E6抗体を用いた免疫組織化学分析によって検出できるか確認するため、同じ組織マイクロアレイを、抗E6抗体を用いたIHC分析上で行った。例示的な他のHPV免疫組織化学分析として、表12～14は、抗HPV E6抗体を用いた免疫組織化学染色の結果を示す。データが示すように、HPV抗E6は、HPV抗E7に匹敵する免疫組織化学の結果を与える。

【0071】

表12は、子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上のマウス抗HPV-E6抗体を用いた免疫組織化学染色の結果を示す。データは、HPV E6タンパク質が、免疫組織化学分析において用いるマウスモノクローナル抗HPV E6抗体によって検出できることを示す。HPV E6タンパク質の*in situ*での存在は、様々な段階の子宮頸部組織から検出できる。データが示すように、HPV E6タンパク質は、CIN, CIN3から扁平上皮細胞癌(SCC)または腺癌(AD)等の子宮頸部組織まで陽性率が増加してサンプルに存在する。CIN2およびCIN3のサンプルに対してそれぞれ約65%および70%の陽性率である。癌組織に対して、96%のSCC組織サンプルが抗HPV E6抗体を用いた免疫組織化学によって陽性に染色するが、ADサンプルの71%しか陽性に染色せず、HPV E6発癌タンパク質はADよりもSCCにおいてより支配的に発現することを示す。これらのデータは、本発明において記載したHPV E6抗体を用いた免疫組織化学分析は、様々な重症度における組織からの子宮頸部組織の診断を確認するためのツールを提供することを示す。

20

30

【0072】

【表 1 2】

子宮頸癌進行および組織病変の間の様々な生検サンプル上のモノクローナル抗HPV-E6を用いた免疫組織化学染色の結果

	CIN2	CIN3	SCC	ADC	合計
抗HPV E6陽性	32	35	23	17	107
抗HPV E6陰性	17	15	1	7	40
陽性率	65%	70%	96%	71%	73%

40

【0073】

【表 1 3】

CIN陰性サンプルと比較したCIN2+病変上のマウスモノクローナル抗E6抗体を用いた免疫組織化学染色結果まとめ

	CIN2 +	CIN 陰性	
抗HPV E6陽性	107	12	90%PPV
抗HPV E6陰性	40	80	67%NPV
感度	73%		
特異性		87%	

10

【0074】

データをさらに分析するため、表13は、表11および12からのIHC染色結果のまとめを示す。データが示すように、抗HPV E6抗体の使用は、CIN2+に対して73%の重度、87%の特異性の免疫組織化学分析を与える。これらのデータは、この分析が、異なる段階の子宮頸部病変を確認するHPVタンパク質を検出する臨床用途に有効であることを示唆する。

【0075】

【表 1 4】

20

CIN陰性サンプルと比較したCIN3+病変上のマウスモノクローナル抗E7抗体を用いた免疫組織化学染色結果まとめ

	CIN 3+	CIN 陰性	
抗HPV E6陽性	75	7	91%PPV
抗HPV E6陰性	23	85	79%NPV
感度	77%		
特異性		92%	

30

【0076】

データをさらに分析するため、表14は、本発明において記載した抗HPV E6抗体の使用が77%の重度、92%の特異性および91%のPPVおよび79%のNPVを有するCIN3以上の免疫組織化学分析を提供することを示す表13からの免疫組織化学染色結果のまとめを示す。データは、この分析が、異なる段階の子宮頸部病変を確認するHPVタンパク質を検出する臨床用途に有効であることを示唆する。

5. HPV ICC分析

【0077】

40

サンプル準備：標準的な従来のパップスメアサンプルおよび液体細胞サンプルの2種類のサンプルをICC分析に用いる。スライドガラス上の直接的なスメアから収集した子宮頸部かき取り細胞または液体溶液を2つに分け、一つは細胞パバニコロー染色、もう一つは本発明において記載したHPV抗体を用いた細胞組織化学染色とした。パバニコロー染色からの結果であるパップスメアに対して、サンプルを0~17にスコアし、(1)~(3)を正常、(4)およびそれ以上を異常と考えた。例えば、LSIL：軽度扁平上皮内病変、HSIL：重度扁平上皮内病変、CIN1：子宮頸部上皮内癌形成、CIN2：より悪性となる病変を伴う子宮頸部上皮内癌形成、CIN3：形成不全を伴う子宮頸部上皮内癌形成がある。浸潤癌には、扁平上皮細胞癌(SCC)、腺癌(ADC)およびその他がある。例えば、異常細胞は未確定で、ASCUS：異型扁平上皮細胞、パップスメアに

50

において異常または非典型的な細胞は、不合理であり未確定である。未確定な程度のA G U S : 異型腺癌細胞がある。異常細胞の特定に対して、H P V I C C 染色は、H P V 感染および/またはH P V 発癌タンパク質の発現の状態に対してさらなる情報を提供する。したがって、H P V I C C 染色分析はL S I L またはH S I L 異常細胞を検出するのに非常に有効である、および/またはパパニコロー染色と比較してA S C U S , またはA G U S 等の未確定の異常細胞の検出に対して有効である。

【0078】

I C C 方法を用いた免疫分析の実施例として、子宮頸部かき取りからの細胞直接スライドガラス上にスメアした、または本願明細書に記載するI C C 手順に従って液体溶液内に収集し、遠心分離し、洗浄し、免疫染色した。液体溶液によって収集した子宮頸部かき取りを製造装置に従って処理した。子宮頸部細胞をその後、サイトスピンまたは薄膜プレップ技術によって単層内に処理した。スライドガラス上の細胞の薄層を固定して、H P V I C C プロトコールに従って抗H P V 抗体によって染色した。染色した細胞を顕微鏡で可視化した。

10

【0079】

一つの実施形態において、I C C 分析を行うキットを提供する。キットは、前 - 抗体ブロッキング溶液、後 - 抗体ブロッキング溶液、一次抗体としての抗H P V 抗体、二次抗体としてのH R P もしくはビオチンまたは他の物質と結合した抗マウスまたは抗ラビット免疫グロブリン、二次抗体を検出する基質として用いる適切な化学物質を含む溶液を含む。

20

【0080】

抗H P V 抗体は、基質として用いた以下の適切な化学物質を検出するH R P もしくはビオチン、または他の化学物質で直接タグを付ける。前 - 抗体ブロッキング溶液は、細胞が抗体に非特異的に結合するのをブロックする特定のタンパク質もしくはB S A、または血清または他の化学物質を含む。後 - 抗体ブロッキング溶液は、一次抗体の培養に用いるタンパク質または血清を含まない前 - 抗体ブロッキング溶液と同様の溶液である。H P V 抗体を含む溶液は、濃縮して、または試薬を準備して希釈する。二次抗体を含む溶液は、濃縮して、または試薬を準備して希釈する。基質として用いる適切な化学物質を含む溶液は、1 コンポーネントもしくは2 コンポーネントとしてのD A B (3 , 3 ' - ジアミノベンジジン)、1 コンポーネントもしくは2 コンポーネントとしてのA E C (3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール) 基質または他の基質がある。

30

【0081】

一度子宮頸部かき取りからのヒト細胞をスライドガラス上の細胞の単層または薄層上に処理および固定したら、免疫組織化学 (I C C) 分析を、H P V 抗体で培養する前に、一定時間、前抗体ブロッキング溶液でスライドをブロッキングすることによって行う。その後、スライドガラスをP B S もしくはH₂O または他の溶液で3 ~ 5 回洗浄し、いずれかの未結合H P V 抗体を除去した。その後、スライドガラスを、例えば抗マウスI g G H R P 等の二次抗体で培養し、検出のための適切な基質で培養した。例として、D A B は、ペルオキシダーゼまたは過酸化水素の存在下で酸化させ、その結果、茶色のアルコール溶解性沈殿物が酵素活性状態で堆積する。沈殿物は、存在する酵素の量によって明茶色から暗琥珀色に色が変わる。顕微鏡で観察した琥珀色の沈殿物は、スライドガラス上の組織切片の細胞に存在するH P V タンパク質とのH P V 抗体の特異的な結合を示す。この分析は、結合反応が加速するように室温または高温で行う。このH P V I C C 分析は手で行う、またはI C C オートメーションによって操作し、子宮頸部のかき取りからの上皮細胞において局所化した *in situ* のH P V 感染およびH P V 発癌タンパク質をスクリーニングする強力なツールを提供する。

40

【0082】

H P V I C C 分析は、内癌の初期、中間期および後期からの異なる段階の形成不全に適用できる。これらのサンプルには、限定することはないが、例えば、L S I L , またはC I N 1 またはA S C U S 等の初期段階、C I N 2、C I N 3 またはH S I L 等の中間期、またはS C C もしくはA D E または他等の後期がある。本願明細書に記載するI C C 分

50

析は、様々なサンプル、または様々な液体溶液における様々な段階からの、液体溶液における異なる段階のサンプルに対する染色に用いて、本発明における I C C 分析を行うために準備した。

【 0 0 8 3 】

H P V I C C 分析は、例えば、A S C U S (異型扁平上皮細胞 ; パップスメアにおける異常または異型細胞は不合理で重度が未確定である) または A G U S (異型腺癌) 等の標準的な細胞パパニコロー染色によって未確定な異常細胞を特定するのに有効であり、H P V I C C 分析は A S C U S サンプルを試験するのに用いる。図 5 A において示すように、I C C 分析の結果は、パパニコロー染色によって A S C U S と診断された特定の子宮頸部かき取りは抗 E 6 抗体を用いて陽性に I C C 染色できる。図 5 B は、(パパニコロー染色によって A S C U S と診断された) 子宮頸癌かき取り細胞が抗 E 7 モノクローナル抗体を用いて陽性に I C C 染色できることを証明する図 5 A において示したのと同じサンプルからの I C C 分析の結果を示す。図 5 A および図 5 B において、高い N / C (核 / 細胞質) 比を有する異常細胞 (黒色矢印で示した) は陽性に染色し、正常細胞 (小さい核を有する大きい、不規則な形の細胞) は白色矢印で示したように陰性に染色した。図 5 A および図 5 B の両方は、H P V E 6 および H P V E 7 タンパク質の両方がパップスメア A S C U S のサンプルからの異常細胞において検出されることを示す。これらの結果は、E 6 および E 7 発癌タンパク質が発現した H P V 感染細胞を含むこの A S C U S サンプルが、マウスモノクローナル抗 H P V E 6 およびマウス抗 H P V E 7 モノクローナル抗体をそれぞれ用いて、本発明において記載した I C C 分析によって *i n s i t u* で検出できることを示す。

10

20

【 0 0 8 4 】

H P V I C C 分析が H S I L 細胞を検出できることを示すため、図 6 A は、他の液体溶液において準備したパパニコロー染色によって C I N 2 と診断された子宮頸部かき取り細胞が抗 E 7 モノクローナル抗体を用いて陽性に I C C 染色できることを示す。図 6 A において示すように、高い N / C (核 / 細胞質) 比を有する C I N 2、H S I L 異常細胞 (黒色矢印で示した) は核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*i n s i t u* で存在する H P V E 7 タンパク質が、I C C 分析において本願明細書に記載するマウスモノクローナル抗 H P V E 7 を用いて液体溶液の様々なソースにおいて、中間段階の腫瘍からの異常細胞において検出できることを示す。

30

【 0 0 8 5 】

他の実施例として、図 6 B は、他の液体溶液において準備した子宮頸部かき取り細胞の他の C I N 2 サンプルが抗 E 6 モノクローナル抗体を用いて陽性に I C C 染色できることを示す。図 6 B において示すように、高い N / C (核 / 細胞質) 比を有する互いに結合した形の C I N 2、H S I L 異常細胞 (黒色矢印で示した) は核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*i n s i t u* で存在する H P V E 6 タンパク質が、I C C 分析において本願明細書に記載するマウスモノクローナル抗 H P V E 6 を用いて液体溶液の様々なソースにおいて、中間段階の腫瘍からの異常細胞において検出できることを示す。

40

【 0 0 8 6 】

本願明細書に記載する I C C 分析が、液体溶液における中間期から後期の子宮頸部上皮内 (C I N) 細胞を特定できることを示すため、異なる液体溶液における C I N 子宮頸部かき取りサンプルも準備して本発明において記載する I C C 分析を行った。図 7 A は、(パパニコロー染色によって C I N 3 と診断された) 特定の子宮頸部かき取り細胞が抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いて陽性に I C C 染色できることを示す。図 7 B ~ 7 E は、同じマウスモノクローナル抗体を用いた他の C I N 3 を示す。図において示すように、高い N / C (核 / 細胞質) 比を有する互いに結合した形の C I N 3、H S I L 異常細胞 (黒色矢印で示した) は核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*i n s i t u* で存在する H P V E 6 タンパク質が、I C C 分析において本願明細書に記載するマウスモノクローナル抗 H P V E 6 を用いて液体溶液の様々なソースにおい

50

て、中間期/後期の腫瘍からの異常細胞において検出できることを示す。これらの結果は、*in situ*で存在するHPV E6タンパク質が、ICC分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗HPV E6を用いて液体溶液のCIN3からの異常細胞において検出できることを示す。

【0087】

図7Eは、抗HPV E7を用いて図7Bにおいて示したのと同じCIN3サンプルからのICC染色の結果を示す。図3Fは、同じ抗HPV E7を用いて図3Eにおいて示したのと同じICC染色の結果の他の画像を示す。図において示すように、高いN/C(核/細胞質)比を有する互いに結合した形のCIN3、HSIL異常細胞(黒色矢印で示した)は核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*in situ*で存在するHPV E7タンパク質が、ICC分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗HPV E7を用いて液体溶液の様々なソースにおいて、中間期/後期の腫瘍からの異常細胞において検出できることを示す。これらの結果は、*in situ*で存在するHPV E6タンパク質が、ICC分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗HPV E6を用いて液体溶液のCIN3からの異常細胞において検出できることを示す。p16も後期の腫瘍において過剰に発現することを示すため、同じCIN3サンプルを、抗p16マウスモノクローナル抗体を用いたICC染色に用いた。図7Gは、図7B~7Fにおいて示したのと同じCIN3サンプルから抗p16マウスモノクローナル抗体を用いてICC染色した結果を示す。図において示すように、高いN/C(核/細胞質)比を有する互いに結合した形のCIN3、HSIL異常細胞(黒色矢印で示した)は核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*in situ*で存在するp16タンパク質が、中間期から後期の腫瘍からの異常細胞において検出できることを示す。これらの結果は、*in situ*で存在するHPV E6, E7およびp16タンパク質が、ICC分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗体を用いて液体溶液のCIN3からの異常細胞において検出できることを示す。

10

20

【0088】

他の実施例として、本願明細書で記載するICC分析が液体溶液における子宮頸癌細胞の検出に使用できることを示すため、異なる液体溶液における異なる子宮癌のCIN子宮頸部かき取りサンプルも準備して本発明において記載するICC分析を行った。図8は、(パパニコロ染色によって腺癌と診断された)子宮頸癌細胞が抗E6マウスモノクローナル抗体を用いて陽性にICC染色できることを示す。図8において、高いN/C(核/細胞質)比を有する異常細胞(黒色矢印で示した)は陽性に染色した。互いに結合した形のHSIL異常細胞も陽性に染色した。これらの結果は、*in situ*で存在するHPV E6タンパク質が、ICC分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗HPV E6を用いて液体溶液において、腺癌子宮頸部細胞において検出できることを示す。

30

【0089】

本願明細書で記載するICC分析が液体溶液における他の種類の子宮頸癌の検出に使用できることを示すため、図9Aは、他の種類の子宮頸癌細胞であるSCC(パパニコロ染色によって扁平上皮細胞癌と診断された)が抗E6マウスモノクローナル抗体を用いて陽性にICC染色できることを示す。図9Bは、抗HPV E7マウスモノクローナル抗体を用いた同じSCCサンプルのICC染色の結果を示す。図9Cは、抗p16マウスモノクローナル抗体を用いた同じSCCサンプルのICC染色の結果を示す、図において示すように、HSIL SCC細胞は、核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*in situ*で存在するHPV E6およびHPV E7タンパク質が、ICC分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗HPV E6または抗HPV E7抗体を用いて液体溶液における様々な種類の子宮頸癌細胞から検出できることを示す。p16も後期の腫瘍において過剰に発現することを示すため、同じSCCサンプルを、抗p16マウスモノクローナル抗体を用いたICC染色に用いた。図9Cは、図9A~9Bにおいて示したのと同じSCCサンプルの抗p16マウスモノクローナル抗体を用

40

50

いた I C C 染色した結果を示す。これらの結果は、存在する H P V E 6 , H P V E 7 および p 1 6 タンパク質が、I C C 分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗体を用いて液体溶液の異なる種類の子宮頸癌からの異常細胞において *i n s i t u* で検出できることを示す。

【 0 0 9 0 】

本願明細書で記載する I C C 分析が H P V 抗体の子宮頸部かき取り細胞の *i n s i t u* で存在する H P V タンパク質との特異的な結合であることを示すため、液体溶液からの正常な子宮頸部細胞も得て I C C 分析上で試験した。図 1 0 A は、液体溶液において準備したすべての子宮頸部かき取り細胞（パニコロー染色によって正常と診断された）が抗 E 6 マウスモノクローナル抗体を用いて I C C 染色陰性であったことを示す。図 1 0 B において、同じサンプルを抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体を用いて I C C によって染色した。これらの結果は、H P V E 6 タンパク質も H P V E 7 タンパク質も正常な子宮頸部かき取り細胞からの *i n s i t u* で存在しないことを示し、I C C 分析は、マウスモノクローナル抗 H P V E 6 またはマウスモノクローナル抗 H P V E 7 抗体を用いて陰性染色の結果を示す。したがって、本発明において記載する I C C 分析は、本願明細書で記載する H P V 特異的な抗体を用いて H P V タンパク質を染色するための特異的な染色方法である。

10

【 0 0 9 1 】

細胞レベルで I C C 染色を行うため、図 1 1 A は、マウスモノクローナル抗 H P V E 6 抗体を用いた液体溶液からの子宮頸部かき取り細胞の細胞質染色を示す。図 1 1 B は、マウスモノクローナル抗 H P V E 7 によって染色した図 1 1 A からの同じサンプルの核染色を示す。図 1 1 C は、マウスモノクローナル抗 H P V E 7 を用いた他のサンプルからの細胞質染色の画像を示す。図において示すように、高い N / C（核 / 細胞質）比を有する異常細胞（黒色矢印で示した）は陽性に染色したが、正常細胞（大きい、小さい核を有する不規則な形の細胞）は白色矢印で示したように陰性に染色した。これらの結果は、互いに結合した形の H S I L 異常細胞も陽性に染色した。これらの結果は、H P V E 6 および H P V E 7 タンパク質が本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗 H P V E 6 およびマウスモノクローナル抗 H P V E 7 抗体を用いて細胞質および / または核において検出できることを示す。

20

【 0 0 9 2 】

H P V E 6 E 7 発癌タンパク質が特定の L S I L（低度の扁平上皮細胞癌）または C I N 1（子宮内皮細胞癌、中程度の細胞異常）において発現することを示すため、図 1 2 A ~ 1 2 C は、抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いて液体溶液において C I N 1 と診断された臨床サンプルの I C C 染色の結果を示す。図 1 2 B ~ 1 2 C は、同じ抗 H P V E 6 マウスモノクローナル抗体を用いた図 1 2 A において示したのと同じ I C C 染色の結果の他の画像である。図 1 2 D は、抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体を用いた図 1 2 A において示したのと同じ C I N 1 サンプルからの I C C 染色の結果を示す。図 1 2 E は、同じ抗 H P V E 7 マウスモノクローナル抗体を用いて図 1 2 D において示したのと同じ I C C 染色の結果の他の画像である。図において示すように、互いに結合した形または高い N / C（核 / 細胞質）比を有する異常な L S I L、C I N 1 細胞（黒色矢印で示した）は核および細胞質に対して陽性に染色した。これらの結果は、*i n s i t u* で存在する H P V E 6 および H P V E 7 タンパク質が、I C C 分析において本願明細書で記載するマウスモノクローナル抗 H P V E 6 および H P V E 7 抗体を用いて液体溶液における初期の腫瘍において検出できることを示す。p 1 6 が初期の腫瘍において発現することを示すため、同じ C I N 1 サンプルを、抗 p 1 6 マウスモノクローナル抗体を用いた I C C 染色に用いた。図 1 2 F は、図 1 2 A ~ 1 2 E において示したのと同じ C I N 1 サンプルから抗 p 1 6 マウスモノクローナル抗体を用いて I C C 染色した結果を示し、p 1 6 タンパク質はこの C I N 1 サンプルの初期腫瘍において検出できないことを示す。これらの結果は、*i n s i t u* で存在する H P V E 6 , E 7 および p 1 6 タンパク質が、本願明細書で記載する I C C 分析を用いてマウス抗 H P V E 6 または抗 H

30

40

50

HPV E6モノクローナル抗体を用いて初期の腫瘍からの異常細胞において検出できることを示す。

【0093】

免疫細胞（ICC）分析はHPV感染を検出するだけでなく、*in situ*のHPV発癌タンパク質も検出する。したがって、ICC分析だけで、または様々な特異的および一般的な抗HPV抗体と組み合わせて、標準的なHPV DNA試験またはパップスメア分析と比較して、HPV検出に対する強力なツールとなる。

【0094】

【表15】

液体溶液における様々な子宮頸部かき取り細胞上のマウス抗HPV E6モノクローナル抗体を用いたICC染色結果

パップスメア	正常	ASC US	ASC -H	CIN 1	CIN 2/3	SCC
抗HPV E6抗体を用いたICC陽性	4	3	4	11	17	4
抗HPV E6抗体を用いたICC陰性	25	6	4	6	0	1
合計	9	9	8	17	17	5
陽性率	14%	33%	38%	65%	100%	80%

10

20

【0095】

表15は、液体溶液における様々な子宮頸部かき取りサンプル上でマウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いたICC分析の結果を示す。表15における結果は、HPV E6タンパク質が、マウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いた免疫細胞化学（ICC）分析によってスライドガラス上に固定した単離細胞上を*in situ*で検出できることを示す。HPV E6タンパク質の*in situ*の存在は、様々な液体溶液における様々な段階の子宮頸部かき取りサンプルから検出できる。同じ子宮頸部かき取りサンプルは、パップスメアとICC染色結果を比較するため標準的なパバニコロー染色によっても処理した。表15において示すように、HPV E6タンパク質は、それぞれ、正常な子宮頸部かき取り、ASCUS、ASC-H、CIN1、CIN2/3サンプルにおいて徐々に高い陽性率で存在する。

30

【0096】

パップスメアでCIN2/3であると診断したサンプルに対しては約100%の陽性率であり、パップスメアで正常であると診断したサンプルは約14%しか同じ抗HPV E6抗体を用いたICCによって陽性染色しない。ASCUSまたはASC-Hサンプルに対して、約33%～50%のこれらのサンプルが、表15において示したCIN1、CIN2/3サンプルに対して用いたのと同じ抗HPV E6抗体によって陽性に染色し、これらのASCUSまたはASC-Hサンプル対象における発癌タンパク質の発現はさらなる癌進行となることを示す。ASCUSと診断されたパップスメアおよび陰性と診断されたICC染色（抗HPV E6）のサンプルに対して、進行した病変に発展するリスクが低い。

40

【0097】

【表 16】

液体溶液におけるCIN2+子宮頸部かき取りサンプル上のマウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いたICC染色の結果まとめ

パップスメア	正常	CIN2+		
抗HPV E6抗体を用いたICC陽性	4	21	84%	PPV
抗HPV E6抗体を用いたICC陰性	25	1	96%	NPV
感度		95%		
陽性率	86%			

10

【0098】

【表 17】

液体溶液における様々な子宮頸部かき取りサンプル上のマウスモノクローナル抗HPV E7抗体を用いたICC染色の結果

パップスメア	正常	ASCUS	ASC-H	CIN1	CIN2/3	SCC
抗HPV E7抗体を用いたICC陽性	3	4	3	11	16	4
抗HPV E7抗体を用いたICC陰性	25	6	5	6	1	1
合計	28	10	8	17	17	5
陽性率	11%	40%	38%	65%	94%	80%

20

30

【0099】

表16は、表15からのICC染色の結果のまとめを示す。データが示すように、本発明において説明する抗HPV E6抗体を用いたICC染色方法は、CIN2+に対する95%の感度および83%の特異性のICC分析を提供する。これらのデータは、この分析が、繰り返すパップスメア染色に伴って一般的な集団から子宮頸癌をスクリーニングするためにHPVタンパク質を検出するのに有効である。HPV検出ICC分析の他の実施例として、表17および表18は、HPV E7抗体を用いたICC染色の結果を示す。データが示すように、HPV抗E7は、示したHPV抗E6に匹敵するICC結果をああ得る。表17は、HPV E7タンパク質が、それぞれ、正常な子宮頸部かき取り、ASCUS、ASC-H、CIN1、CIN2/3サンプルにおいて徐々に高い陽性率で存在することを示す。パップスメアでCIN2/3であると診断したサンプルに対しては約94%の陽性率であり、パップスメアで正常であると診断したサンプルは11%しか同じ抗HPV E7抗体を用いたICCによって陽性染色しない。ASCUSまたはASC-Hサンプルに対して、約40%のこれらのサンプルが、表17において示したCIN1、2/3サンプルに対して用いたのと同じ抗HPV E7抗体によって陽性に染色し、これらのASCUSまたはASC-Hサンプル対象における発癌タンパク質の発現はさらなる癌進行となることを示す。ASCUSと診断されたパップスメアおよび陰性と診断されたICC染色(抗HPV E7)のサンプルに対して、進行した病変に発展するリスクが低い。

40

50

データが示すように、本発明において説明する抗HPV E7抗体を用いたICC染色方法は、CIN2+に対する91%の感度および89%の特異性のICC分析を提供する。これらのデータは、この分析が、繰り返すパップスメア染色に伴って一般的な集団から子宮頸癌をスクリーニングするためにHPVタンパク質を検出するのに有効である。

【0100】

【表18】

液体溶液におけるCIN2+子宮頸部かき取りサンプル上のマウスモノクローナル抗HPV E7抗体を用いたICC染色の結果まとめ

パップスメア	正常	CIN2+		
抗HPV E7抗体を用いたICC陽性	3	20	87%	PPV
抗HPV E7抗体を用いたICC陰性	25	2	93%	NPV
感度		91%		
陽性率	89%			

10

20

【0101】

【表19】

HPV DNAテストと比較した様々な抗HPV抗体を用いたパップスメアで正常なサンプルに対するICC染色結果

	パップスメア正常	
	ICC HPV陽性	ICC HPV陰性
重度HPV DNA陽性	0	6
重度HPV DNA陰性	0	26

30

【0102】

本発明におけるHPV ICC分析が初期の子宮頸癌のスクリーニングに適切かどうかを試験するため、パップスメアで正常なサンプルを用いてHPV DNAテストと比較した。表19において示すように、試験したすべてのパップスメアで正常なサンプル(32のうち32)は、抗HPV抗体を用いて陰性染色した。32個のサンプルのうち、12サンプルは抗HPV E6抗体で染色し、16サンプルはHPV E7抗体で染色し、4サンプルは抗HPV L1抗体で染色した。これらのデータは、本発明において説明するICC染色分析が非常に特異的であることを示す。同じサンプル上でHPV DNAテストと比較すると、パップスメアで正常なサンプルの19%(32のうち6)がHPV DNAテスト上で陽性を示す。本研究で用いたハイグレードのHPV DNAテストはhc2であり、FDAのみがHPV DNAテストを認めた。それらのHPV DNA陽性に対して、パップスメアで正常およびHPV ICCで陰性なサンプルに対して、HPV DNA分析の陽性またはHPV発癌タンパク質の発現がないHPV感染のDNA検出を誤っている可能性がある。これらのデータは、本願明細書に記載するHPV ICC分析がHPV DNAテストと比較して良い陽性的中率を提供し、子宮頸癌のスクリーニングに対して良い臨床的信頼性を提供する。

40

【0103】

6. HPVフローサイトメトリ分析

50

HPVタンパク質を検出する免疫分析の他の実施例として、HPVフローサイトメトリ分析を行った。製造ガイドラインに従った液体溶液において収集した子宮頸部かき取りからの細胞を遠心分離、洗浄、同様のICC染色手順に従って免疫染色した。細胞をスライドガラス上に塗布する代わりに、細胞をフローサイトメトリによる分析の染色から溶液において保存する。HPVフローサイトメトリを行うため、溶液における子宮頸部細胞を固定し、ブロックし、抗HPV抗体と培養し、その後適切な二次抗体およびフローサイトメトリによって検出する基質化学物質と培養した。このHPVフローサイトメトリ分析の利点は、高い訓練をした細胞学者がスライドガラスを観察する必要がないことである。

【0104】

一つの実施形態において、ICCフローサイトメトリを行うキットを提供する。このキットは、前-抗体ブロッキング溶液、後-抗体ブロッキング溶液、一次抗体としての抗HPV抗体、二次抗体としてのHRPもしくはビオチンまたは他の物質と結合した抗マウスまたは抗ラビット免疫グロブリン、フローサイトメトリによって二次抗体を検出する基質として用いる適切な化学物質を含む溶液を含む。

10

【0105】

例として、関節標識は2個の培養工程を必要とする；最初は一次抗体でその後二次抗体と培養する。二次抗体は蛍光色素(FITC, PE, Cy5など)を結合させた。抗HPV抗体も、基質として用いる適切な化学物質を検出するための蛍光、またはビオチン、または他の化学物質で直接タグを付ける。前-抗体ブロッキング溶液は、細胞が抗体に非特異的に結合するのをブロックする特定のタンパク質もしくはBSA、または血清または他の化学物質を含む。後-抗体ブロッキング溶液は、一次抗体の培養に用いるタンパク質または血清を含まない前-抗体ブロッキング溶液と同様の溶液である。HPV抗体を含む溶液は、濃縮して、または試薬を準備して希釈する。二次抗体を含む溶液は、濃縮して、または試薬を準備して希釈する。

20

【0106】

例として、HPV E6, E7またはL1タンパク質は、蛍光色素(FITC, PE, Cy5などを結合した)で標識化した二次抗体である特異的な抗体によって検出する。フローサイトメトリによって分析した細胞は、染色してもしなくても大きさまたは他のパラメータによってゲートして細胞集団を見ることができる。小さい細胞サイズの細胞集団からの染色強度は、分析における正常細胞の対照として大きい細胞サイズを有する細胞集団と比較できる。この分析は、個々の細胞に対する特異的な染色を提供する。染色したまたは未染色の細胞の数を数えて、染色強度も分析によって定量化する。この分析は、顕微鏡、細胞学者を必要とせず染色結果をスコアできる。フローサイトメトリから強力なコンピュータソフトウェアは、偏見のないまたは細胞学において訓練したヒトなしで分析するすべてのデータを提供する。この分析は、HPVに関連するタンパク質を検出するためのスクリーニングテストまたは付随する試験としての臨床設定においてよく用いられるだろう。

30

【0107】

他の実施例として、細胞を染色した後、暗所において4°Cで細胞懸濁液を保管して、できる限り早くフローサイトメトリ上で細胞を分析するのが良い。フローサイトメトリ前が1時間以上であれば、細胞を固定する必要がある。これは少なくとも数日保存できる。これが光散乱および不活性な最もバイオハザードの化学物質を安定化させる。異なる化学物質の固定は、異なる分析に対する最適化が必要である。フォーマット1：パラホルムアルデヒド0.01%~1%を10~15分間、サンプルにつき100µL。フォーマット2：アセトンまたはメタノール：1mLの氷冷したアセトン1mLを各サンプルに加える。穏やかに混合する。-20°Cで5~10分間置く。遠心、PBS1%BSAにおいて2回洗浄する。

40

【0108】

細胞内染色のため、細胞をまず固定して、可溶性抗原または短い半減期を有する抗原の安定性をとる。これは、元の細胞位置における標的タンパク質を保持する。細胞内抗原の

50

検出は、染色前に細胞透過化の工程を必要とする。抗体は、透過化緩衝液において準備し、細胞が透過性であるようにする。細胞集団上でゲートすると、フローサイトメトリ上の細胞の光散乱プロファイルは透過化の後に変化する。細胞質小器官および微小体における抗原は、抗原によって固定化および透過化が必要である。エピトープは、アクセス可能である必要がある。

【0109】

固定化は染色分析の質に重要である。固定化に利用できるいくつかの方法がある：(1)ホルムアルデヒドおよびその後の洗浄剤：0.01%のホルムアルデヒドにおいて10~15分間固定(これはタンパク質を安定化する)、その後、洗浄剤によって膜破壊。洗浄剤：トリトンまたはNP-40(PBS内0.1~1%)。これらはまた核膜を溶解し、核抗原に非常に適切である。細胞膜および細胞質がなくなると光散乱が減少してしまい、非特異的な蛍光も減少することに留意されたい。Tween 20、サポニン、ジギトニンおよびレウコペルムは中程度の膜可溶剤である。PBS内0.5%で用いる。これらは、抗原に対して十分なコアを与え、細胞膜を溶解することなく貫通する。細胞質または細胞膜の細胞質表面における抗原として適切である。また、可溶性核物質としても適切である。(2)ホルムアルデヒド(0.01%)およびその後のメタノール。メタノールの後洗浄剤。1mLの氷冷メタノールを各サンプルに加える。穏やかに混合する。-20°Cで10分間置く。遠心、PBS 1% BSAにおいて2回洗浄する。アセトン固定および透過化：1mLの氷冷アセトン各サンプルに加える。穏やかに混合する。-20°Cで5~10分間置く。遠心、PBS 1% BSAにおいて2回洗浄する。

10

20

【0110】

7. 1個の抗HPV抗体を用いた固体表面上のHPVタンパク質の検出

1)直接EIA：1個以上のHPVタンパク質をマイクロタイタープレート上にコートして1個以上の抗HPV抗体によって検出する。子宮頸部かき取りからの臨床サンプルを直接EIA上でHPV E6, E7またはL1の検出のために得た。様々なサンプルソースからの子宮頸部細胞には、液体細胞溶解溶液における子宮頸部かき取り細胞、輸送媒体における子宮頸部かき取り細胞(HPV DNAテストサンプルに対して用いる)、または溶菌緩衝液における子宮頸部かき取り細胞がある。本願明細書に記載する直接EIAを行うため、生検を処理、遠心分離、洗浄、および検体としての細胞溶解物を生成するように溶解した。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HPVモノクローナル抗体およびその後HRP結合した二次抗体(例えば抗マウスIgGまたは抗ラビットIgG)によって検出した。TMB基質を加え、その後、標準的な反応停止溶液を加えた。OD₄₅₀をELISAプレートリーダーによって行った。

30

【0111】

実施例として、液体溶液において収集した様々な段階の子宮頸部腫瘍からの子宮頸部細胞を処理して、HPV DNAおよびHPVタンパク質の検出に対する細胞溶解物を得た。HPV DNA検出に対して、タッチダウンPCRプロトコルを用いた。直接EIAによるHPVタンパク質検出に対して、細胞溶解物をマイクロタイタープレート上に直接コーティング、ブロックして、その後特異的なHPV抗体は、HRPを結合した二次抗体によって用いた。OD₄₅₀は、一次抗体およびその後二次抗体を加えてまたは加えることなく、細胞溶解物でコーティングしたマイクロタイタープレートから取った。細胞溶解物からの様々なタンパク質がマイクロプレート上にコートされるため、一次HPV抗体を持たない各サンプルは、二次抗体を有する細胞溶解物の非特異的な結合として考えられる。HPVタンパク質の抗HPV抗体との特異的な結合に対するODを得るため、二次抗体の非特異的な結合からのODの控除によって得た各サンプルのネットODを、一次抗体とのHPVタンパク質の特異的な結合として考えた。各PCR陰性サンプルからのネットODを得た。PCR陰性サンプルからの平均ODを、分析のベースラインとして用いた。PCR陰性サンプルからの平均ODの2倍以上のネットODのサンプルは陽性と考え、さも

40

50

なければ本願明細書で記載する E I A に対して陰性とした。

【 0 1 1 2 】

実施例として、組織学またはパップスメア染色によって異常細胞、A S C U S、C I N 1、C I N 2、C I N 3、S C C および腺癌等と診断された臨床サンプルを得て、マイクロタイタープレート上に直接コートする細胞溶解物进行处理した。臨床的診断またはパップスメア結果と比較して、P C R による H P V D N A の検出および E I A による H P V タンパク質の検出を表 2 0 に示した。データは、H P V D N A の 7 9 % (2 4 のうち 1 9) がポリクロナル抗 E 7 抗体によって検出した H P V タンパク質と関連することを示す。これらの H P V D N A および H P V タンパク質の不一致に対して (2 1 % ; 2 4 のうち 5)、3 (5 のうち) は P C R 陽性、E I A 陰性であり (N o . 9 / C I N 1、N o . 1 2 / C I N 2、および N o . 1 3 / C I N 2)、発現しないまたは検出不可能な E 7 発癌タンパク質による H P V 感染を示す。N o . 4 (A S C U S) および N o . 1 0 (C I N 1 / A S C U S) 等の P C R 陰性、E I A 陽性に対して、P C R または H P V D N A の損失を伴った E 7 の発癌タンパク質の発現の誤りであるとする。

【 0 1 1 3 】

【表 2 0】

液体子宮頸部かき取りからのHPV DNAおよびHPVタンパク質の検出

液体溶液子宮頸部かき取り		PCRによる HPV DNA	ポリ抗 E7による直接 EIA
サンプル番号	Dxまたは パップスメア結果		
1	ASCUS	陽性	陽性
2	ASC-H	陽性	陽性
3	ASCUS	陽性	陽性
4	ASCUS	陰性	陽性
5	ASCUS	陰性	陰性
6	CIN1	陽性	陽性
7	CIN1	陽性	陽性
8	CIN1	陽性	陽性
9	CIN1	陽性	陰性
10	CIN1/ASCUS	陰性	陽性
11	CIN1	陰性	陰性
12	CIN2	陽性	陰性
13	CIN2	陽性	陰性
14	CIN2	陰性	陰性
15	CIN2	陰性	陰性
16	CIN3	陽性	陽性
17	CIN3	陽性	陽性
18	CIN3	陽性	陽性
19	CIN3	陰性	陰性
20	CIN3	陰性	陰性
21	CIN3	陰性	陰性
22	SCC	陽性	陽性
23	SCC	陽性	陽性
24	AD	陰性	陰性

10

20

30

40

【0114】

HPV DNA陽性であるがHPV EIA陰性であるサンプルに対して、HPV DNA分析の陽性またはHPV発癌タンパク質が発現していないHPV DNA検出が陽性である可能性がある。これらのデータは、本願明細書に記載するHPV EIAが子宮頸癌のスクリーニングに対するさらなる臨床的信頼性を提供することを示す。HPV発癌タンパク質を検出して腫瘍HSILの進行が起きているかを追跡するのが重要である。これらのデータは、HPV発癌タンパク質が子宮頸癌および他のHPVに関連する癌のスクリーニングおよび初期検出に対して良いバイオマーカーであることを示す。PCRおよびEIAの両方が陰性であるが、ASCUS、またはCINと診断された場合、HPV DNAおよびHPV発癌タンパク質検出の損失は、子宮頸部かき取りサンプリングもしくはは

50

患者の治療のために起こる、またはパップスメアの陽性結果が誤りである。しかし、試験するサンプルが多いことが義務的である。

【 0 1 1 5 】

2) ドットプロット分析：膜上に細胞溶解物をスポットし、1個以上の抗HPV抗体を用いて生物学的サンプルからHPVタンパク質を検出する。

読み取りに装置を必要としない結果を示す迅速試験を開発するため、ドットプロット分析は、色基質による視覚的結果を得る膜上の細胞溶解物からのHPVタンパク質を検出する実現可能性を示す。実施例として、液体溶液において収集した様々な段階の子宮頸部腫瘍からの子宮頸部細胞を処理して、膜上にスポットする細胞溶解物を得た。膜は、ブロッキング溶液でプロットをブロッキングする前に空気乾燥した。抗HPV抗体を加えて、抗HPV抗体に結合できる二次抗体によってプロットと反応させた。プロットは各工程間で洗浄して、抗体の膜上への非特異的な結合を防いだ。最終工程において、TMB基質をプロットに加えて、青色スポットがこのドットプロット分析において用いた抗HPV抗体と結合する細胞溶解物の陽性反応を示す。組み換え型HPVタンパク質も膜上にスポットして、陽性または陰性対照として用いた。

10

【 0 1 1 6 】

図13Aは、マウスモノクローナル抗HPV L1抗体を用いたHPV L1タンパク質を検出するドットプロットに結果を示す。示すように、第1列からのドットは、液体溶液における様々なSCC子宮頸部かき取りからの細胞溶解液であり、第2列からのドットは、それぞれA, B, C, Dで示した左から右へ20, 2, 0.2および0 μg/mLの濃度の組み換え型HPV 16 L1タンパク質である。プロットの第2列において示した結果のように、HPV L1タンパク質は0.2 μg/mLまたはそれ以下の精製組み換え型タンパク質を図13Aにおいて用いたマウスモノクローナル抗HPV L1抗体と高い陽性で反応する。これらのデータは、組み換え型HPV 16 L1および細胞溶解物からのHPV L1タンパク質が図13Aにおいて示すようにマウスモノクローナル抗HPV L1抗体を用いてドットプロット分析によって検出できることを示す。

20

【 0 1 1 7 】

図13Bは、図13Aにおいて示したのと同じマウスモノクローナル抗HPV L1抗体を用いたHPV L1タンパク質を検出する他のドットプロットの結果を示す。示すように、第1列および第2列からのドットは、液体溶液における様々なSCC子宮頸部かき取りからの細胞溶解物である。プロットの第3列において、組み換え型HPV 16 E6、HPV 18 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E7、HPV 16 L1タンパク質は、それぞれA, B, C, D, Eで示し、左から右へスポットした。プロットの第3列において示した結果のように、組み換え型HPV L1タンパク質であるスポット3Eは、検出可能なスポットを持たないHPV 16 E7およびHPV 16 E6またはプロットの第3列上で示した非常に弱いスポットのHPV 18 E7およびHPV 18 E6と比較して、分析において用いたマウスモノクローナル抗HPV L1抗体と陽性反応する。分析のバックグラウンドまたは非特異的な結合を示す弱いスポットを用いて、臨床サンプル2Cおよび2Eは、HPV 16 L1組み換え型タンパク質ほど強いスポットを示す。図13Aは、組み換え型HPV 16 L1および細胞溶解物の両方からのHPV L1タンパク質がマウスモノクローナル抗HPV L1抗体を用いたドットプロット分析によって検出できることを示す。

30

40

【 0 1 1 8 】

ドットプロット分析上でHPV E6タンパク質を検出するため、図14Aは、マウスモノクローナル抗HPV E6抗体でのドットプロットに結果を示す。示すように、第1列からのドットは、液体溶液における様々なSCC子宮頸部かき取り(図1の第1列と同じ)からの細胞溶解液であり、第2列からのドットは、それぞれA, B, C, Dで示した左から右へ20, 2, 0.2および0 μg/mLの濃度の組み換え型HPV 16 E6タンパク質である。プロットの第2列において示した結果のように、HPV E6タンパク質は、陽性に20, および2 μg/mL、弱く0.2 μg/mLまたはそれ以下の精製組

50

み換え型タンパク質を、図3において用いたマウスモノクローナル抗HPV E6抗体反応する。これらのデータは、組み換え型HPV16 E6および細胞溶解物からのHPV E6タンパク質が図14Aにおいて示すようにマウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いたドットプロット分析によって検出できることを示す。

【0119】

図13Bにおいて示したのと同じドットプロットを、ドットプロット分析上でHPV E6タンパク質の検出を行うのに用いた。図14Bは、図14Aにおいて示したのと同じマウスモノクローナル抗HPV E6抗体を用いたHPV E6タンパク質を検出する他のドットプロットの結果を示す。プロットの第3列において示した結果のように、組み換え型HPV16 E6タンパク質、スポット3Aは、図13Bの第3列上で示した非常に弱いスポットのHPV18 E6および検出可能なスポットを持たない他の組み換え型タンパク質と比較して、分析において用いたマウスモノクローナル抗HPV E6抗体と陽性反応する。これらの結果は、HPV E6タンパク質のマウスモノクローナル抗HPV E6抗体との特異的な反応を示し、HPV L1またはHPV E7タンパク質と架橋反応しないことを示す。分析のバックグラウンドまたはHPV18 E6の架橋反応結合を示す弱いスポットを用いて、サンプル2Cおよび2Eは、他の中程度のスポットおよび検出可能なスポットがない2Dと比較して非常に強いスポットを示す。これらのデータは、HPV E6タンパク質を含む70%の臨床サンプルが図14Bにおいて示したマウスモノクローナル抗HPV16 E6抗体を用いたドットプロット分析によって検出できることを示す。

10

20

【0120】

ドットプロット分析上のHPV E7タンパク質の検出を行うため、図13Bおよび図14Bにおいて示したのと同じドットプロットを用いて、図15において示すようにHPV E7タンパク質を検出するマウスモノクローナル抗HPV E7抗体でのプロットを行った。図15におけるプロットの第3列において示した結果のように、組み換え型HPV18 E7タンパク質であるスポット3Dは、プロットの第3列上で示した検出可能なスポットを持たない他のHPV組み換え型タンパク質または非常に弱いスポットのHPV16 L1であるスポット3Eと比較して、分析において用いたマウスモノクローナル抗HPV18 E7抗体と陽性反応する。これらの結果は、マウスモノクローナル抗HPV E7抗体とのHPV E7タンパク質の特異的な結合を示すが、HPV L1またはHPV E7タンパク質との架橋反応は示さない。分析におけるバックグラウンドまたはHPV18 E7抗体の架橋結合を示す弱いスポットを用いると、サンプル2Cおよび2Eは、検出不可能なスポットを有する他のものと比較して非常に強いスポットを示す。これらのデータは、図15において示したように、HPV18 E7タンパク質を含むサンプル2Cおよび2Eがマウスモノクローナル抗HPV18 E7抗体を用いたドットプロット分析によって検出できることを示す。

30

3) 抗体マイクロアレイ：生物学的サンプルからの標識化した細胞におけるHPVタンパク質および細胞内因性タンパク質上の抗体のスポットティング

【0121】

例えば、タンパク質チップ分析において、コートする/結合するタンパク質の表面は、例えば、表面化学処理したガラスまたは膜であり、捕捉剤またはタンパク質と共有的にもしくは非共有的に結合またはコートする。適切な緩衝液における組み換え型タンパク質、抗原、抗体または他のタンパク質等の捕捉剤に浸したファインピンを有するスポット機械は、処理した表面にこのタンパク質または抗体を結合させるのに概して用いる。マイクロタイタープレートフォーマットにおいて説明した他の表面のように、スポットし補足したタンパク質または抗体は、タンパク質チップの表面化学処理した表面に強く結合し、非特異的な結合を除去する洗浄後であっても、処理表面上で捕捉タンパク質の標的タンパク質、抗体、または抗原との相互作用および特異的な結合を可能にし、Cy3またはCy5と結合する検出システムで検出できる。特異的な相互作用の検出は、マイクロアレイスキャナを介したスポットした/浸した画像の蛍光強度によって獲得および測定する。

40

50

【 0 1 2 2 】

実施例として、抗体マイクロアレイは、HPVタンパク質および他の細胞内タンパク質の検出に関するタンパク質チップ分析フォーマットとして用いることができる。まず、試験する細胞、サンプルまたは培養細胞を収集、遠心分離、洗浄および溶解して、分析物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て、予めスポットした抗体表面上のこの標識化したタンパク質の結合を検出するためにビオチンまたはCy3, Cy5またはいずれかの他のクロマゲンで標識化した。タンパク質チップ分析に対するタンパク質チップの表面は、異なる分析または定量化技術に対して膜またはガラスである。

【 0 1 2 3 】

表21は、様々なHPVタンパク質および様々な宿主細胞タンパク質の存在を検出するタンパク質チップ分析の結果を示す。HPVおよび様々な細胞内タンパク質に対して抗体で予めスポットした抗体アレイを用いて、ヒト子宮頸部かき取り臨床サンプルにおけるこれらのHPVタンパク質および宿主細胞タンパク質の存在を検出した。液体溶液から得た角質化した扁平上皮細胞癌（グレード2またはグレード3）と診断された子宮頸部かき取りの10個のサンプルすべて（表21上でS1～S10と示した）を処理および溶解して、その後の検出のために適切に（ビオチン標識化等の）標識化したタンパク質溶解物を生成した（例えば、ストレプトアビジン-Cy3）。限定することはないが、HPV16E7, HPV16L1, p63, p53, p21WAF1, p16INK4a, リン酸化Rb, 非リン酸化Rb等の当タンパク質に対して予めスポットした抗体を有するヒトサンプルからのタンパク質の結合を示す蛍光強度を得て表21において示す。HPV感染したこれらのタンパク質の発現レベルにおける変化を示す、マイクロアレイ上に予めスポットした特異的な抗体との特異的なタンパク質の結合に対する蛍光強度を比較および分析して図6～12において示した。

【 0 1 2 4 】

10

20

【表 2 1】

抗体マイクロアレイ上の子宮頸がん患者からの細胞溶解物において発現したタンパク質との特異的な抗体の結合を示すそれぞれのスポットの蛍光強度（バックグラウンドを減算後）

スポットした Ab	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
HPV 16 E 7	849	1407	422	355	443	403	316	337	383	267
HPV 16	1309	236	1477	418	620	1206	251	205	700	3407
p 6 3	398	128	205	51	167	146	215	230	427	174
p 5 3	325	102	86	161	119	83	226	242	465	335
p 2 1 WAF - 1	594	100	130	92	167	54	177	178	493	250
p 1 6 I NK 4 a	164	549	97	107	116	87	72	128	87	174
網膜芽細胞腫	753	170	140	185	109	70	219	247	448	317
R b (リン酸化)	491	236	269	143	238	245	156	224	310	171

10

20

30

【 0 1 2 5 】

試験した 10 個のサンプルからの各タンパク質の発現を比較するため、各サンプルからの特異的なタンパク質に対する平均蛍光強度を得て、図 1 6 において示したグラフの標準偏差パーでタンパク質発現レベルを示した。結果は、10 個の子宮頸部かき取りサンプルの細胞溶解物からの様々な HPV タンパク質および様々な細胞内因性タンパク質は、本願明細書で記載する抗体マイクロアレイ分析上で検出できることを示す。図 1 6 において示すように、HPV 16 および HPV 16 E 7 は他の細胞内タンパク質と比較して過剰に発現している。

【 0 1 2 6 】

異なるサンプルにおける HPV 16 の変化を調べるため、図 1 7 は、図 1 6 において示した子宮頸部かき取り細胞からの細胞溶解物における HPV L 1 タンパク質を検出するための各サンプルの蛍光強度を示す。結果は、抗体マイクロアレイ上の子宮頸癌患者からの細胞溶解物において発現した HPV タンパク質、とくに L 1 ウイルス性タンパク質との HPV 抗体（抗 HPV L 1 抗体）の結合を示す。HPV 16 L 1 タンパク質は、サンプル S 1 , S 3 , S 6 において高く発現し、サンプル S 4 , S 5 および S 9 に対して中程度に発現したが、この分析において用いた HPV 16 抗体によって認識されない異なる HPV 種類である S 2 , S 7 および S 8 において低く発現した。

40

【 0 1 2 7 】

HPV E 6 および E 7 タンパク質は、子宮頸癌における HPV の発癌タンパク質において重要な役割を果たす。HPV E 6 および E 7 発癌タンパク質の細胞内タンパク質と

50

の相互作用を研究するため、本願明細書で記載する抗体マイクロアレイ分析を、HPV発癌タンパク質と直接相互作用するp53もしくはRb等の細胞内タンパク質および、またはHPV感染に作用されるp16、p21等の細胞内タンパク質等の同時の検出に対するツールを提供する。p16INK4aは、子宮頸癌の検出に対するサロゲートとして一般的に用いられる。HPVウイルス性タンパク質を調べるため、このE6またはE7発癌タンパク質は子宮頸癌を検出する良いバイオマーカーとして機能し、本願明細書で記載する抗体マイクロアレイ(タンパク質分析)は、様々なHPVタンパク質および様々な細胞内タンパク質を含む多くのタンパク質を同時に検出する。図18は、10個のSCCサンプルにおけるHPV E7およびp16タンパク質の検出および比較を示す、各サンプル(1~10)からの蛍光強度は、HPV16 E7抗体およびp16INK4a抗体の抗体マイクロアレイ上の子宮頸癌患者からの細胞溶解物において発現したタンパク質との結合を示す。10個のサンプル試験に対して、各サンプルは、p16抗体よりもHPV E7抗体に強い蛍光強度を示し、p16より多くのHPV E7タンパク質が発現したことを示す。これらのデータは、HPV E7は子宮頸癌を検出するのに良いマーカーとして機能することを示す。

10

【0128】

子宮頸癌におけるHPVによって感染したp53を調べるため、図19はHPV16およびp53抗体の両方に対する蛍光強度を示し、HPV感染した臨床サンプルにおけるHPV16のp53抑制による過剰発現を示す。HPV16およびp53の発現を比較すると、結果は、HPV16感染ではない異なる種類のHPVである臨床サンプルS7およびS8を除いたほとんどの臨床サンプルにおいて、p53は高いレベルで発現したHPV16よりもずっと低いレベルで発現することを示す。しかし、すべての臨床サンプルにおける低いp53発現は、ほとんどのp53タンパク質が子宮頸癌進行の転移の間HPV E6発癌タンパク質によって分解されることを示す。

20

【0129】

E7および網膜芽腫(Rb)タンパク質および子宮頸癌におけるHPVによって作用されたリン酸化Rbの相互作用を調べるため、図20は、HPV16 E7およびpRb抗体に対する蛍光強度を示し、HPV16 E7はRbが不活性のとき発現し、低濃度の抗Rbリン酸塩特異性抗体によって認識されることを示す。HPV16 E7発現をRb-リン酸塩と比較すると、HPV16 E7の過剰発現は、サンプルS2において高い。データは、E7経路によるRbの不活性化(Rb-リン酸所抗体との反応において低い)は、子宮頸癌に進行する悪性形質転換を引き起こす。

30

【0130】

実施例として子宮頸癌に対するタンパク質チップ分析の発現プロファイルを調べるため、図21は、サンプルS2に対する選択したHPVタンパク質および細胞内タンパク質の発現プロファイルを示す。結果は、HPV E7およびp16は過剰に発現したが、他の細胞内タンパク質は抑制されたことを示す。図8、図20および図21の結果をまとめると、サンプルS2におけるHPV E7タンパク質の過剰発現は、Rbを不活性化し、p16INK4a発現を誘起し、その結果悪性形質転換および子宮頸癌の進行を導く。高くHPV E7を発現するサンプルS1は、Rbから独立した経路を通るが、高くp16INK4aを発現しない。

40

【0131】

子宮頸癌における他の細胞内タンパク質p21 WAF1およびp53との関連性を調べるため、図12は、子宮頸部かき取り細胞からの細胞溶解物を用いて細胞内p21 WAF1およびp53タンパク質を検出する各サンプルの蛍光強度を示す。図22において示すように、p21WAF1を発現する10個のうち9サンプル(サンプル1を除く)がp53の発現と大きく関連する。これらのデータは、p21WAF1阻害を通じたHPV E6経路による腫瘍抑制p53の分解が、子宮頸癌進行に対する悪性形質転換を引き起こすことを示す。

【0132】

50

タンパク質チップ分析は、癌進行の形質転換におけるHPV感染によって誘起されたおよび/または阻害されたHPVタンパク質および細胞内タンパク質を検出するツールを提供することができる。本発明において説明したタンパク質チップ分析を用いた研究結果は、本研究における子宮頸がんの患者は様々な経路を適用し、進行が異なる。この技術は、他のHPVに関連する癌の形質転換を伴う経路を予想するのに適用できる。アルゴリズムは、癌進行寛の経路を伴うすべての患者の症状を予想できるように開発する。したがって、一人ひとりに特化した薬剤の特別な治療を勧めることができる。

8. 二次抗HPV抗体によって検出する表面上に補足した一次抗HPV抗体を用いた生物学的サンプルからのHPVタンパク質の検出

【0133】

実施例として、抗原サンドイッチ分析は、タンパク質チップ、膜および/またはマイクロタイタープレートなどの底面等の表面上に対象の抗原を結合する親和性を有する捕捉抗体またはスポット抗体等の一次抗体をコーティングする工程を有する。対象の抗原は、例えば、初期遺伝子または後期遺伝子等のHPVウイルス性遺伝子によってコードした、例えば、パピローマウイルス性タンパク質、発癌タンパク質、カプシドタンパク質である。表面上の未結合部分をブロッキング後、分析する臨床サンプルを捕捉抗体に結合させるように塗布し、対象の抗原へ結合することによって二次抗体または検出抗体によって検出する免疫複合体を形成させる。その後、一次および二次抗体または捕捉抗体および検出抗体の対は、サンドイッチのように対象の抗原と相互作用する。捕捉またはスポット抗体は、検出抗体および2個の抗体がHPVウイルス性タンパク質、HPV発癌タンパク質、カプシドタンパク質およびそれら等の対象の抗原に特異的に結合できるように、同じまたは異なる。

【0134】

次に、サンドイッチ結合抗体-抗原複合体を、検出抗体に対して親和性を有し色素化学発光、蛍光および多くの種類の基質を用いて標準的な免疫複合体検出による測定を行う、二次抗体によって検出する。最終的な読み取りまたは可視化は、適切な吸光リーダーを有する装置によって、または直接目で見て行い、対照サンプルと比較する。陽性結果は、対象の抗原の一次抗体、捕捉抗体、および検出抗体との結合を示し、臨床サンプルにおける対象の抗原の存在を示す。逆に、陰性結果は、対象の抗原の一次抗体への結合がないことを示し、臨床サンプルにおける対象の抗原がないことを示す。

【0135】

1) ELISA: 二次抗HPV抗体によるHPVタンパク質を検出する一次抗HPV抗体のマイクロタイタープレート上のコーティング

マイクロタイタープレート上のサンドイッチELISAを行うため、SCCまたはHPV PCR陽性またはHPV PCR陰性と診断された血清を希釈して、血清サンプルに存在するHPV E6, E7またはL1タンパク質を検出する分析物として用いた。ELISAサンドイッチ分析において行う分析フォーマットは、一次抗体としてのE6, E7またはL1に対するラビットポリクロナル抗体、その後、分析物(血清)およびHRPを結合した他の抗体によって検出するそれに関連する二次抗HPV抗体をコーティングした。基質および停止剤と培養後、OD450をマイクロタイタープレートによって取った。図8において示した実施例として、結果は、ラビットポリクロナル抗HPV抗体をコーティングおよび検出に用いたHPV陰性血清(PCRによる)と比較したSCC(扁平上皮細胞癌)またはHPV陽性(PCRによる)と診断されたヒト血清サンプルにおけるHPV E6, E7およびL1タンパク質を検出するELISAを示す。

【0136】

図23は、E6, E7発癌タンパク質およびL1ウイルス性タンパク質の存在は、対照としてHPV PCR陰性サンプルからの血清を用いて、SCCまたはHPV PCR陽性サンプルと診断された患者からの血清において検出できることを示す。データは、E7はE6またはL1と比較して血清から検出されたタンパク質である。SCCおよびHPV PCRの両方が陽性のサンプルは、PCR陰性サンプルからの血清と比較して高いE6

10

20

30

40

50

および E7 タンパク質を有する。SCC は HPV PCR 陰性血清と比較して高い L1 検出を有するが、HPV PCR 陽性サンプルは HPV PCR 陰性サンプルと比較して高く発現しないことに留意されたい。しかし、L1 タンパク質の発現は、E6 または E7 どちらの場合も高くない。これらのデータは、L1 の発現は、ウイルス感染の段階および / またはサイクルによって血清に存在するまたは存在しないことを示す。しかし、SCC および HPV PCR 両方が陽性であるサンプルからの血清における発癌タンパク質 E6 または E7 の検出は、E6 または E7 が血清における HPV 検出に対する良いマーカーを示すことを示唆する。これは、血清からの E6, E7 発癌タンパク質の検出に対する最初の報告である。分析には多くの血清サンプルが必要である。

【0137】

2) フロービーズ分析：二次抗 HPV 抗体による HPV タンパク質を検出するビーズ上の一次抗体コーティング

実施例として、ビーズ表面にコートした一次抗体は、生物学的サンプルの細胞溶解物における HPV タンパク質と反応し、二次抗 HPV 抗体を捕捉するビーズの表面上に複合体を形成する。複合体は、二次抗 HPV 抗体を予め標識化したとき直接検出できる、または、二次抗 HPV 抗体に結合できる予め標識化した抗体を加えることによって検出できる。予め標識化した抗体は、限定することはないが西洋ワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光およびそれらの組み合わせ等の検出剤で標識化する。実施例として、ビーズの固体表面上に存在する複合体は、抗マウスまたは抗ラビット PE を二次抗体として用いて FACS (蛍光活性細胞分類) によって検出できる。多くの HPV タンパク質がビーズ上に補足されたら、異なる蛍光染色によって標識化された多くの二次抗 HPV 抗体が FACS によって同時に検出できる。したがって、FACS によるビーズ分析は、生物学的サンプルからの 1 個以上の HPV タンパク質を検出する強力な分析を提供する。

【0138】

様々な HPV タンパク質の検出に用いる本願明細書に記載するビーズ分析を示すため、HPV E6, HPV E7 および HPV L1 に対する様々な抗体をコーティングおよび検出抗体として用いて、HPV E6, HPV E7 および HPV L1 タンパク質を検出した。図 24 ~ 27 は、FACS による、それぞれ HPV 16 L1, HPV 16 E6, HPV 18 E6 および HPV 16 E7 タンパク質を検出するビーズ分析の結果を示す。実施例として、図 24 は、コーティング抗体としてのラビットポリクロナル抗 HPV L1 抗体および検出抗体としてのマウスモノクローナル抗 HPV 16 L1 抗体を用いて、その後二次抗体である抗マウス接合 PE 剤を用いて、組み換え型 HPV 16 L1 タンパク質を検出する FACS によるサンドイッチビーズ分析の結果を示す。示したデータのように、FACS によって検出するビーズ表面上に捕捉する精製組み換え型 HPV 16 L1 タンパク質を含むサンプルは、分析の陰性対照としての緩衝液を含むサンプル (図 24 の左のピーク) からの高い蛍光 PE を有する離散的なピーク (図 24 の右側のピーク) を示す。結果が、特異的な検出タンパク質を含むサンプル (幾何平均約 2958) および存在するタンパク質を検出しない対照サンプル (幾何平均約 12) で約 250 倍の蛍光差異を示す。データは、このビーズフォーマットが、臨床サンプルに存在する様々な量の HPV L1 タンパク質を検出することができる分析のダイナミックレンジを提供することを示す。

【0139】

他の実施例として、図 25 は、コーティング抗体としてのラビットポリクロナル抗 HPV E6 抗体および検出抗体としてのマウスモノクローナル抗 HPV 16 E6 抗体を用いて、その後二次抗体である抗マウス接合 PE 剤を用いて、組み換え型 HPV 16 E6 タンパク質を検出する FACS によるサンドイッチビーズ分析の結果を示す。示したデータのように、FACS によって検出するビーズ表面上に捕捉する精製組み換え型 HPV 16 E6 タンパク質を含むサンプルは、分析の陰性対照としての緩衝液を含むサンプル (図 25 の左側のピーク) からの高い蛍光 PE を有する離散的なピーク (図 25 の右側のピーク) を示す。結果が、特異的な検出タンパク質を含むサンプル (幾何平均約 114)

10

20

30

40

50

および存在するタンパク質を検出しない対照サンプル（幾何平均約 1.7）で約 9 倍の蛍光差異を示す。データは、このビーズフォーマットが、臨床サンプルに存在する様々な量の HPV E6 タンパク質を検出することができる分析のダイナミックレンジを提供することを示す。

【0140】

図 2.6 は、コーティング抗体としてのラビットポリクロナル抗 HPV 1.8 E6 抗体および検出抗体としてのマウスモノクロナル抗 HPV 1.8 E6 抗体を用いて、その後二次抗体である抗マウス接合 PE 剤を用いて、組み換え型 HPV 1.6 L1 タンパク質を検出する FACS によるサンドイッチビーズ分析の結果を示す。示したデータのように、FACS によって検出するビーズ表面上に捕捉する精製組み換え型 HPV 1.8 E6 タンパク質を含むサンプルは、分析の陰性対照としての緩衝液を含むサンプル（図 2.6 の左側のピーク）からの高い蛍光 PE を有する離散的なピーク（図 2.6 の右側のピーク）を示す。結果が、特異的な検出タンパク質を含むサンプル（幾何平均約 2.294）および存在するタンパク質を検出しない対照サンプル（幾何平均約 1.48）で約 1.5 倍の蛍光差異を示す。データは、このビーズフォーマットが、臨床サンプルに存在する様々な量の HPV 1.8 E6 タンパク質を検出することができる分析のダイナミックレンジを提供することを示す。

10

【0141】

図 2.7 は、コーティング抗体としてのラビットポリクロナル抗 HPV 1.6 E7 抗体および検出抗体としてのマウスモノクロナル抗 HPV 1.6 E7 抗体を用いて、その後二次抗体である抗マウス接合 PE 剤を用いて、組み換え型 HPV 1.6 E7 タンパク質を検出する FACS によるサンドイッチビーズ分析の結果を示す。示したデータのように、FACS によって検出するビーズ表面上に捕捉する精製組み換え型 HPV 1.6 E7 タンパク質を含むサンプルは、分析の陰性対照としての緩衝液を含むサンプル（図 2.7 の左側のピーク）からの高い蛍光 PE を有する離散的なピーク（図 2.7 の右側のピーク）を示す。結果が、特異的な検出タンパク質を含むサンプル（幾何平均約 6.73）および存在するタンパク質を検出しない対照サンプル（幾何平均約 5.5）で約 1.22 倍の蛍光差異を示す。データは、このビーズフォーマットが、臨床サンプルに存在する様々な量の HPV 1.6 E7 タンパク質を検出することができる分析のダイナミックレンジを提供することを示す。

20

30

【0142】

抗体を検出するためにコーティングからの抗体を変えることによって異なる分析フォーマットの分析性能変化を調べるため、図 2.8 および図 2.9 は、それぞれ図 2.5 および図 2.6 と比較して HPV 1.6 E6 および HPV 1.8 E6 を検出する異なる分析を示す。実施例として、図 2.8 は、検出抗体としてのラビットポリクロナル抗 HPV 1.6 E6 抗体およびコーティング抗体としてのマウスモノクロナル抗 HPV 1.6 L1 抗体を用いて、その後二次抗体である抗マウス接合 PE 剤を用いて、組み換え型 HPV 1.6 E6 タンパク質を検出する FACS によるサンドイッチビーズ分析の結果を示す。示したデータのように、FACS によって検出するビーズ表面上に捕捉する精製組み換え型 HPV 1.6 E6 タンパク質を含むサンプルは、分析の陰性対照としての緩衝液を含むサンプル（図 2.8 の左側のピーク）からの高い蛍光 PE を有する離散的なピーク（図 2.8 の右側のピーク）を示す。結果が、特異的な検出タンパク質を含むサンプル（幾何平均約 2.755）および存在するタンパク質を検出しない対照サンプル（幾何平均約 1.223）で約 2 倍の蛍光差異を示す。HPV 1.6 E6 タンパク質のビーズ分析上の検出に関する図 2.8 を図 2.5 と比較すると、データは、図 2.5 において示したビーズフォーマットは、臨床サンプルに存在する様々な量の HPV E6 タンパク質を検出することができる分析の良いダイナミックレンジを提供することを示す。

40

【0143】

他の実施例として、図 2.9 は、検出抗体としてのラビットポリクロナル抗 HPV 1.8 E6 抗体およびコーティング抗体としてのマウスモノクロナル抗 HPV 1.8 L1 抗

50

体を用いて、その後二次抗体である抗マウス接合PE剤を用いて、組み換え型HPV18 E6タンパク質を検出するFACSによるサンドイッチビーズ分析の結果を示す。示したデータのように、FACSによって検出するビーズ表面上に捕捉する精製組み換え型HPV16 E6タンパク質を含むサンプルは、分析の陰性対照としての緩衝液を含むサンプル(図29の左側のピーク)からの高い蛍光PEを有する離散的なピーク(図29の右側のピーク)を示す。結果が、特異的な検出タンパク質を含むサンプル(幾何平均約3803)および存在するタンパク質を検出しない対照サンプル(幾何平均約787)で約5倍の蛍光差異を示す。HPV16 E6タンパク質のビーズ分析上の検出に関する図29を図26と比較すると、データは、図26において示したビーズフォーマットは、臨床サンプルに存在する様々な量のHPV E6タンパク質を検出することができる分析の良いダイナミックレンジを提供することを示す。

3) HPV感染を検出する迅速流動分析: 迅速免疫学分析は、ストリップにおいて膜上に垂直にまたは横方向に行く。側方流動または拡散ワンステップ迅速免疫学的分析も、結果を得るのに5~15分間かかり用いるのが簡単であり、限定的な訓練を必要とするが装置を必要としない免疫クロマトグラフストリップ試験と呼ぶ。分析の基本的な主旨は、パップスメアからの綿棒サンプルと反応する捕捉剤を含む固相ニトロセルロース膜またはストリップを含む。患者サンプルが標的因子を含めば、ニトロセルロースにおける捕捉剤は標的因子と反応し、複合体が拡散または毛細管現象を通してニトロセルロース膜において形成および移動する。

【0144】

膜またはスティックは、それぞれもしくは一緒に、サンプル収集の間に試験するヒト対象に投与するおよび/または綿棒と結合させ、設計した免疫学的反応が開始して、試験結果が、例えば試験するヒト対象の子宮頸部内に検鏡および綿棒を挿入後すぐ等、即座に得られるようにする。したがって、ワンステップ迅速免疫学的分析は、主要なスクリーニング試験として機能を果たす。ワンステップ迅速免疫学的分析は、本願明細書に記載するパップスメア組織試験、免疫学的分析および核酸ハイブリダイゼーション分析またはそれらの組み合わせ等の、さらなるHPV確認試験の前に行うことができる。

【0145】

鉛直迅速免疫学的試験は、そこに捕捉剤をコートまたはスポットするための捕捉/結合表面としての膜を有する装置において行う。装置はさらに、膜の底面にパッドを含み、サンプルおよび分析試薬が膜を流れるようにする。サンプルにおいて含まれ捕捉剤と特異的に相互作用および結合するいずれの標的タンパク質、抗体または抗原も流れず、非特異的な結合を除去する洗浄の後であさえも、膜表面上に捕捉および保持される。HRPまたは他の物質を結合した二次抗体を膜上に塗布して、表面上に保持され色素物質によって可視化されたタンパク質-抗体複合体を検出する。

【0146】

本願明細書で提供するワンステップ迅速免疫学的分析は、いずれの特別な試験装置を必要としない市販の妊娠検査薬に類似した非侵襲的および容易な分析である。ワンステップ迅速免疫学的分析は、一般的なHPV抗原、高リスクHPV型、またはHPVに関連する抗体の直接的な定量検出に対する*in vitro*の免疫クロマトグラフ分析である。ワンステップ迅速免疫学的分析は、ポイントオブケア(その場)診断および/または小さなクリニックもしくは研究室等でのパップスメア試験の補助試験として用いることができる。ワンステップ迅速免疫学的分析は、簡単に希釈してまたはせずを得たサンプルを加えて、設計した反応が起こる反応時間を待って結果を見るために室温での試験条件が適切である。

【0147】

側方迅速免疫学的試験は、その表面上の設計した位置にすでに塗布/コートした捕捉タンパク質または抗体を有する膜ストリップを用いたワンステップ試験である。この試験に必要なワンステップは、標的タンパク質または抗体を有するサンプルと側副金粒子と結合した検出抗体を組み合わせ、組み合わせた混合体を、膜ストリップの表面の設計された

位置まで膜ストリップを通過して側方に流れるようにサンプル液に対して塗布する工程である。捕捉 - 標的 - 検出タンパク質 - 抗体免疫複合体は、捕捉抗体または抗体がコートされた設計位置上で形成および保持される。陽性結果をこれらの設計位置で可視化し、洗浄または分離は必要ないため、ワンステップと呼ぶ。試験の全手順は、数分間、例えば15分以内であり、この試験はワンステップ迅速試験とも呼ぶ。

【0148】

ワンステップ迅速免疫学的分析は、分析を行うのが簡単、迅速および容易であり、ポイントオブケア（その場）の用途に便利である。概して、試験サンプルを本願明細書に記載するように検出抗体と簡単に混合し、混合物を塗布して、予め画定した反応時間（例えば分単位などで）室温等の最適化した培養温度で表面上に予め固定する。反応は、用いる検出抗体の量および分析反応条件によって短くなるように最適化する。

A) ワンステップHPV側方流動分析：膜上に一次抗HPV抗体をストリップして、側副金粒子と結合した二次抗HPV抗体によってHPVタンパク質を検出する

【0149】

ワンステップ迅速免疫学的分析は、例えば本願明細書に記載する精製HPV抗体、組み換え型タンパク質、またはHPVに関連する抗体およびタンパク質などの捕捉剤をストリップし、例えばHPV関連抗体およびHPV関連タンパク質などの標的因子を捕捉し、その後免疫分析検出する膜またはスティック試験である。

【0150】

実施例として、図30A～30Gは、ワンステップ側方流動上での本発明において説明した抗体を用いたHPVタンパク質の検出を示す。図30Aは、膜上にストリップしたラビット抗L1ポリクローナル抗体および検出のために結合した金粒子を用いた、HPV L1組み換え型タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象（TC）、上から二番目の線（矢印）は左で分析の陽性検出を示すが、可視帯を持たない右側の矢印は分析の陰性を示す。L1組み換え型タンパク質の濃度は左から右へ6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0 μg/mLである。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析が375 ng/mLまたはそれ以下の濃度でHPV L1組み換え型タンパク質を検出できることを示す。

【0151】

実施例として、側方流動が臨床サンプルにおけるHPV L1タンパク質を検出できることを示すため、図30Bは、図30Aにおいて示したのと同じ膜上にストリップしたラビット抗L1ポリクローナル抗体を用いた、臨床サンプルにおけるHPV L1タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象（TC）、上から二番目の線（矢印）はSCC患者の血清サンプルからのL1タンパク質の陽性検出を示す（左側）。可視帯を持たないPCRによってHPV陰性とわかった血清は、分析の陰性対照として用いる（右側）。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析がHPV陰性血清と比較してSCC血清サンプルからHPV L1タンパク質を検出できることを示す。

【0152】

側方流動が臨床サンプルにおけるHPV L1タンパク質を検出できることを示すため、図30Cは、膜上にストリップしたマウス抗HPV E6モノクローナル抗体および検出のために結合した金粒子を用いた、HPV E6組み換え型タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象（TC）、上から二番目の線（矢印）は左で分析の陽性検出を示すが、可視帯を持たない右側の矢印は分析の陰性を示す。E6組み換え型タンパク質の濃度は左から右へ10, 2, 0 μg/mLである。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析が2 μg/mLまたはそれ以下の濃度でHPV E6タンパク質を検出できることを示す。

【0153】

さらに側方流動が臨床サンプルにおけるHPV E6タンパク質を検出できることを示すため、図30Dは、図30Cにおいて示したのと同じ膜上にストリップしたマウス抗H

10

20

30

40

50

HPV E6モノクローナル抗体を用いた、臨床サンプルにおけるHPV E6タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象(TC)、上から二番目の線(矢印)はSCC血清サンプルからのE6タンパク質の陽性検出を示す(左側の第1および第2)。可視帯を持たないPCRによってHPV陰性とわかった血清は、分析の陰性対照として用いる(右側)。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析がHPV陰性血清と比較してSCC血清サンプルからHPV E6タンパク質を検出できることを示す。

【0154】

図30Eは、膜上にストリップした他のマウス抗HPV E6モノクローナル抗体および検出のために結合した金を用いた、HPV E6組み換え型タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象(TC)、上から二番目の線(矢印)は左で分析の陽性検出を示すが、可視帯を持たない右側の矢印は分析の陰性を示す。E6組み換え型タンパク質の濃度は左から右へ875, 438, 0 μg/mLである。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析が435 μg/mLまたはそれ以下の濃度でHPV E6タンパク質を検出できることを示す。

10

【0155】

側方流動が臨床サンプルにおけるHPV E7タンパク質を検出できることを示すため、図30Fは、膜上にストリップしたマウス抗HPV E7モノクローナル抗体および検出のために結合した金粒子を用いた、HPV E7組み換え型タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象(TC)、上から二番目の線(矢印)は左で分析の陽性検出を示すが、可視帯を持たない右側の矢印は分析の陰性を示す。E7組み換え型タンパク質の濃度は左から右へ0, 660, 66, 6.6, 0.66 μg/mLである。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析が660 ng/mLまたはそれ以下の濃度でHPV E6タンパク質を検出できることを示す。

20

【0156】

さらに側方流動が臨床サンプルにおけるHPV E7タンパク質を検出できることを示すため、図30Gは、図30Fにおいて示したのと同じ膜上にストリップしたマウス抗HPV E7モノクローナル抗体を用いた、臨床サンプルにおけるHPV E7タンパク質を検出するワンステップ側方流動の結果を示す。上側の線で示した試験対象(TC)、上から二番目の線(矢印)はPCRによってHPV陽性とわかっている血清サンプルからのE7タンパク質の陽性検出を示す(左側)。可視帯を持たないPCRによってHPV陰性とわかった血清は、分析の陰性対照として用いる(右側)。これらのデータは、ワンステップHPV側方流動分析がHPV陰性血清と比較してSHPV陽性とわかっている血清からHPV E7タンパク質を検出できることを示す。

30

【0157】

本願明細書で得られたHPV初期および/または後期遺伝子由来の抗体および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感染が起こる信頼でき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一つは、子宮頸癌、扁平上皮および腺癌の両方と*k o l i o c y t o s i s ; h y p e r k e r o t o s i s*; 上皮内癌または上皮病変を含む前癌状態等の発癌HPV感染に関連する内皮細胞異常の診断である。

40

【0158】

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。

【 図 1 A 】

Figure 1A



【 図 1 B 】

Figure 1B



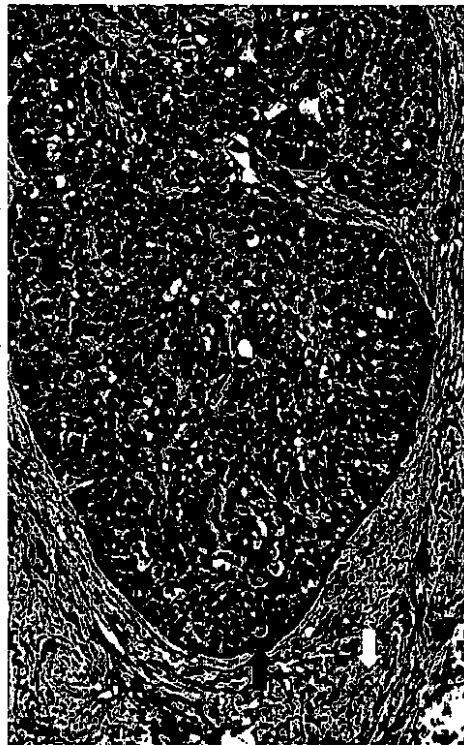
【 図 1 C 】

Figure 1C



【 図 1 D 】

Figure 1D



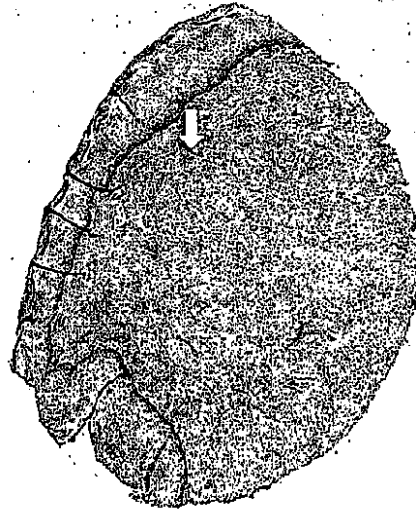
【 2 A 】

Figure 2A



【 2 B 】

Figure 2B



【 2 C 】

Figure 2C



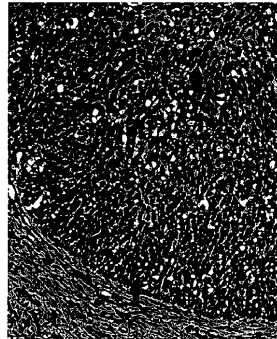
【 3 A 】

Figure 3A



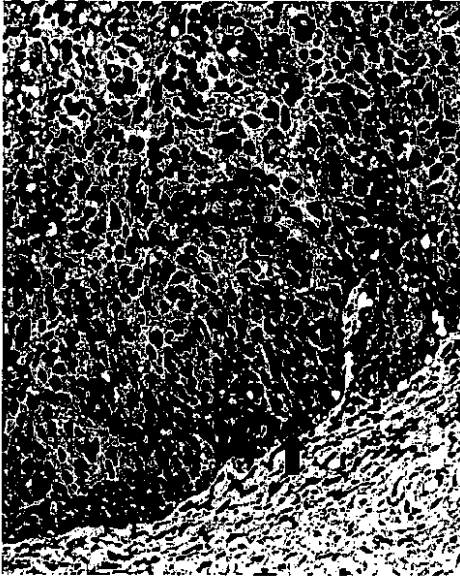
【 3 B 】

Figure 3B



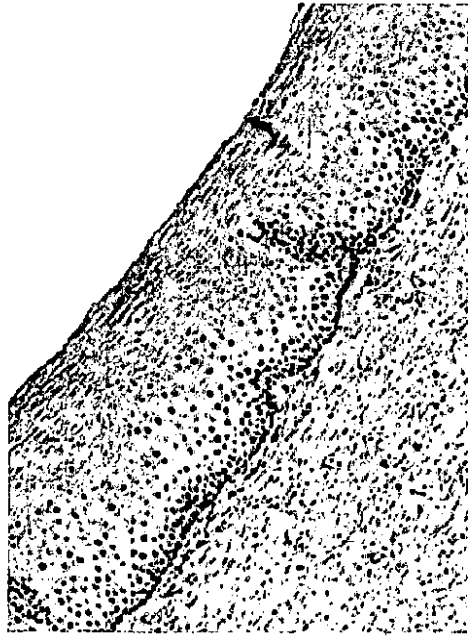
【 図 4 A 】

Figure 4A



【 図 4 B 】

Figure 4B



【 図 4 C 】

Figure 4C

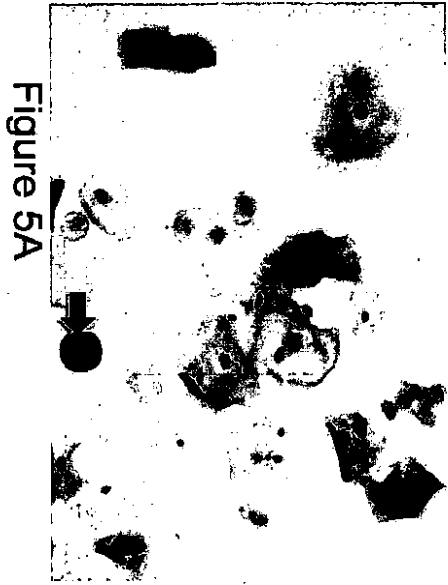


【 図 4 D 】

Figure 4D



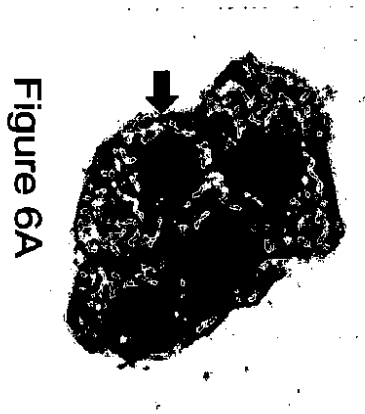
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 7 A 】

Figure 7A



【 7 B 】

Figure 7B



【 7 C 】

Figure 7C



【 7 D 】

Figure 7D



【 図 7 F 】

Figure 7F



【 図 7 G 】

Figure 7G



【 図 7 H 】

Figure 7H



【 図 8 】

Figure 8



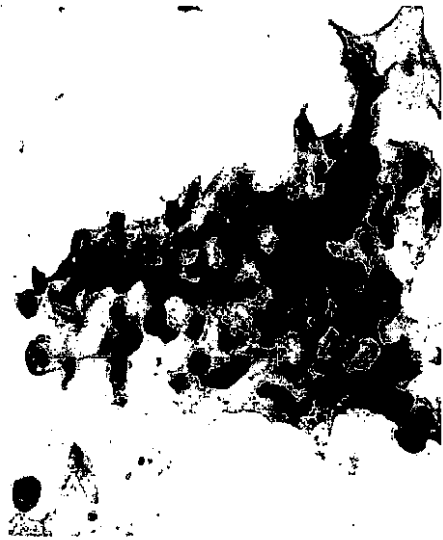
【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



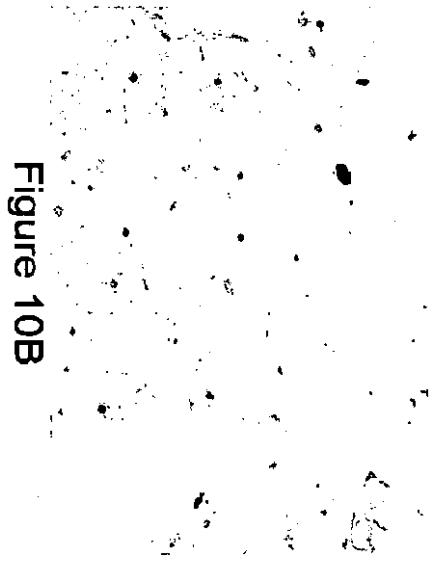
【 図 9 C 】



【 図 10 A 】



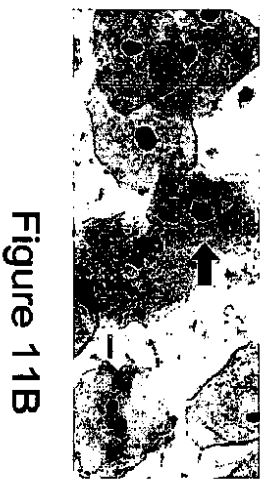
【 図 1 0 B 】



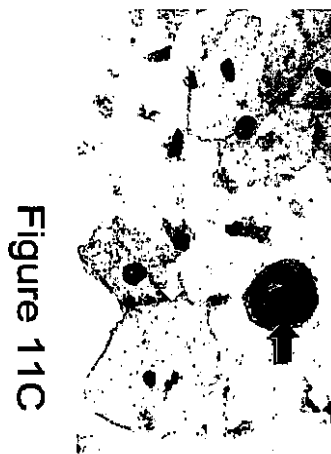
【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 C 】



【 12 A 】



Figure 12A

【 12 B 】



Figure 12B

【 12 C 】

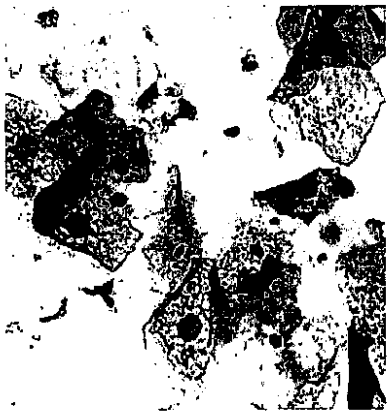


Figure 12C

【 12 E 】

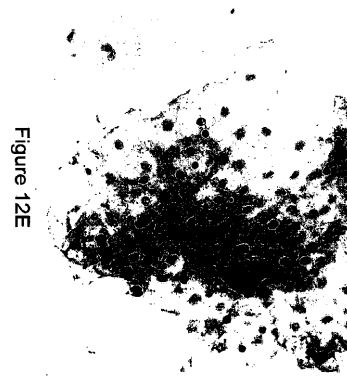


Figure 12E

【 12 D 】



Figure 12D

【 12 F 】

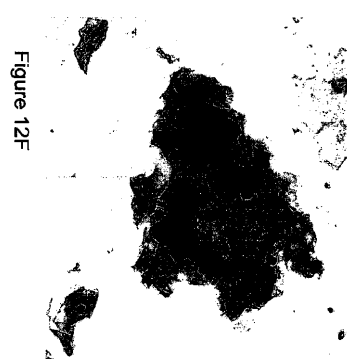
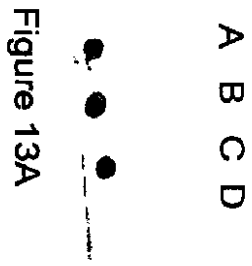
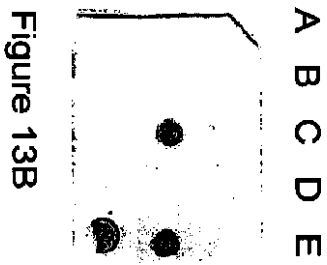


Figure 12F

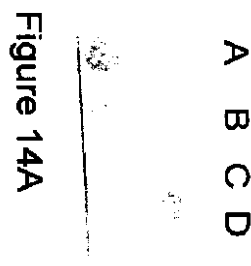
【 13 A 】



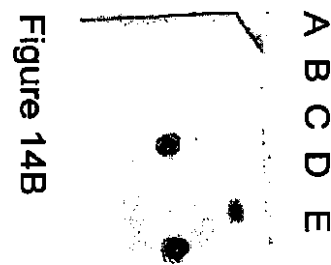
【 13 B 】



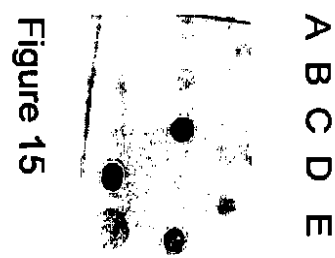
【 14 A 】



【 14 B 】



【 15 】



【 17 】

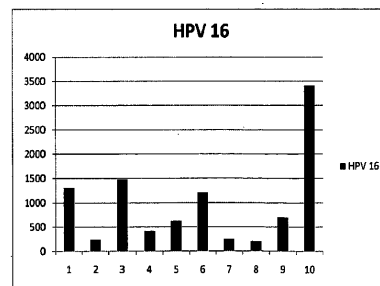


Figure 17

【 16 】

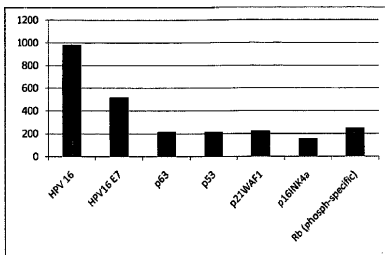


Figure 16

【 18 】

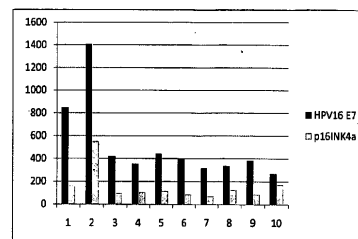


Figure 18

【 図 19 】

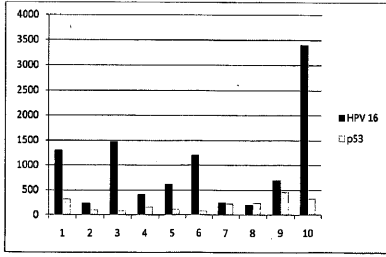


Figure 19

【 図 21 】

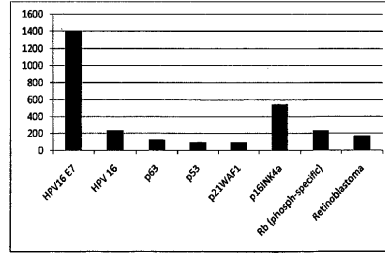


Figure 21

【 図 20 】

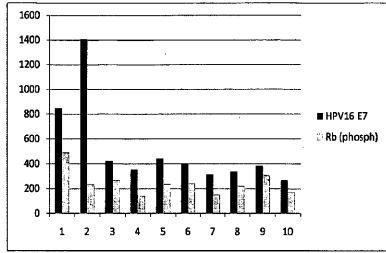


Figure 20

【 図 22 】

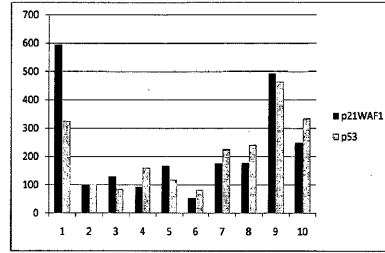


Figure 22

【 図 23 】

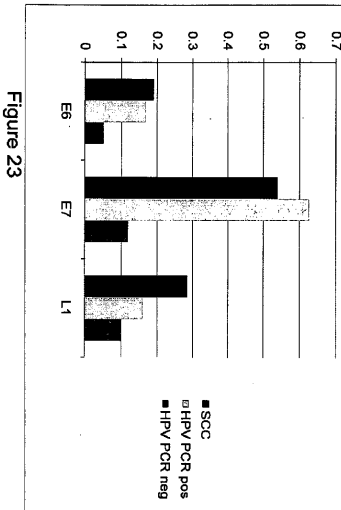


Figure 23

【 図 24 】

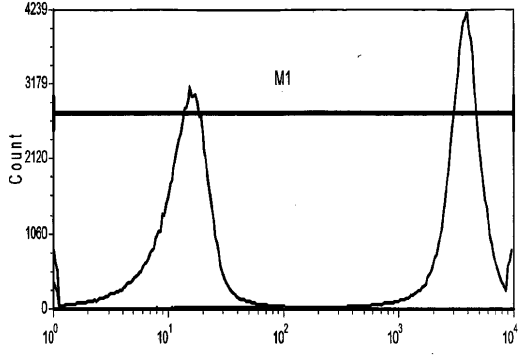


Figure 24

【 図 25 】

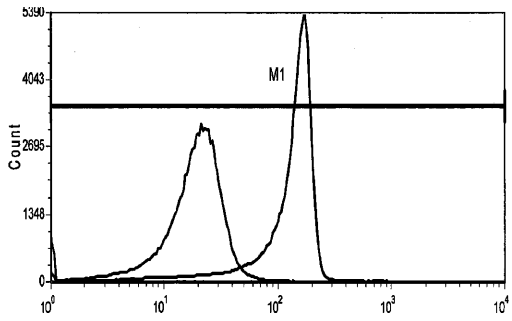


Figure 25

【 図 2 6 】

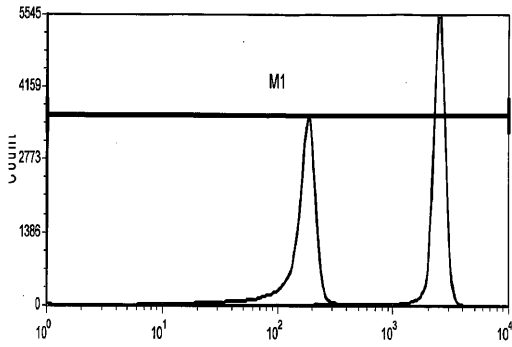


Figure 26

【 図 2 8 】

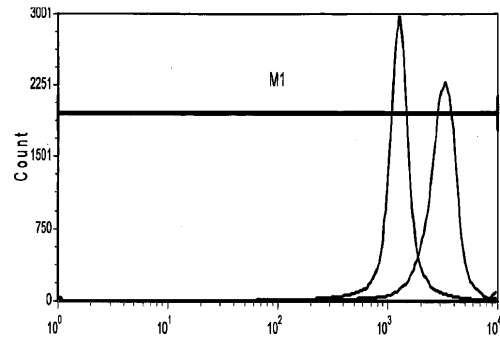


Figure 28

【 図 2 7 】

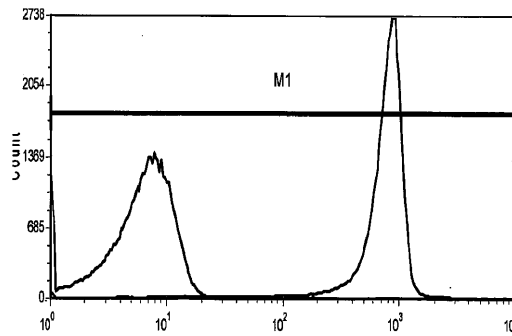


Figure 27

【 図 2 9 】

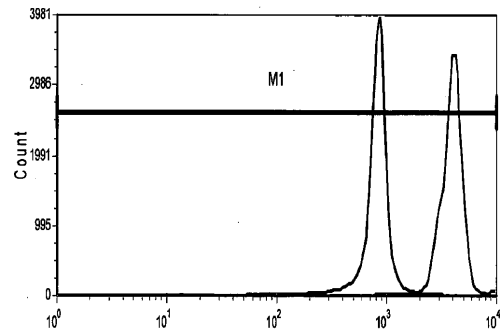


Figure 29

【 図 3 0 A 】

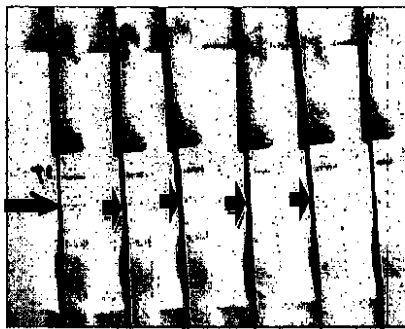


Figure 30A

【 図 3 0 C 】



Figure 30C

【 図 3 0 B 】

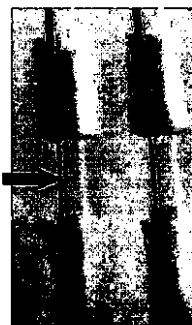


Figure 30B

【 図 3 0 D 】

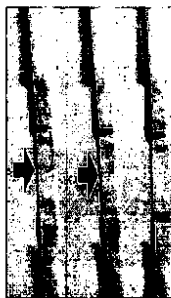


Figure 30D

【 図 3 0 E 】



Figure 30E

【 図 3 0 G 】

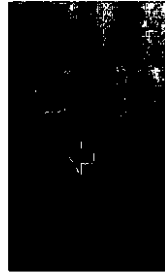


Figure 30G

【 図 3 0 F 】



Figure 30F

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/03537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53 (2009.01) USPC - 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - G01N 33/53 (2009.01) USPC - 435/7.1; 435/287.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - G01N 33/53 (2009.01) - see keyword below USPC - 435/7.1; 435/287.2 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGFPB,EPAB,JPAB); Medline, Google Search terms: diagnosis, detect, papillomavirus, HPV, infection, nuclear, staining, monoclonal, antibody, early, viral, protein, late, purified, LSIL, HSIL, CINs, cytoplasm, invasive, SCC, anti-HPV, E6, E7, L1, immunohistochemistry, slide, flow cytometry, kit		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2006/0269967 A1 (CHEN et al.) 30 November 2006 (30.11.2006), [0005], [0006], [0008], [0016], [0022], [0040], [0043], [0044], and [0055]	1-2, 14 3-13, 15-16
X — Y	US 2008/0044809 A1 (Cheng) 21 February 2008 (21.02.2008), Abstract, para [0009], [0021], [0025], [0027], [0028], [0042], [0060], [0061], [0062], [0068], [0082], [0157], and [0182]	34, 36-37 4-13, 15
Y	VOLGAREVA et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. BMC Cancer 2004, Vol.4(58), p. 1-10. Abstract; pg 4, col 2; Fig. 1; and Table 1	3, 12
Y	US 2003/0190602 A1 (PRESSMAN et al.) 09 October 2003 (09.10.2003), para [0010], [0015], [0112], [0117], [0156], [0201], and [0257]	15-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2009 (25.09.2009)		Date of mailing of the international search report 08 OCT 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-1774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/03537

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.: 32
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 1-16, 34, 36, and 37 are drawn to a method of detecting papillomavirus infection in a human subject, or kit for detecting papillomavirus infection in a human subject.

Group II: Claims 17-31, 33, and 35-37 are drawn to a method of detecting one or more papillomavirus proteins in a human subject, a lateral flow through device, or a kit for detecting papillomavirus infection in a human subject.

*****Continued in 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.: 1-16, 34, 36, and 37

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 09/03537

Continuation of:

Box No III (unity of invention is lacking)

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 special technical feature of Group I is staining of a nuclear portion of a human cell.

The special technical feature of Group II is lysing cells and/or immunocytochemistry and detecting using a solid support.

The technical feature that links the listed Groups is detecting papillomavirus infection by immunological assay using an antibody. However, this does not represent an improvement over the prior art of US 2006/0269967 A1 (CHEN et al.) which teaches such a feature (para [0007]; [0022]; [0044]).

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.2 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

Continued from Item 4 of first sheet: Claim 32 has been held unsearchable because it is a multiple dependent claim and not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 33/543 5 2 1	
	G 0 1 N 37/00 1 0 1	
	G 0 1 N 37/00 1 0 2	

(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) 2G045 AA25 BB01 BB13 BB25 CB21 DA36 DA77 FA37 FB03 FB07
 FB12 FB17 GC15

