

(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2010-507780

(P2010-507780A)

(43) 公表日 平成22年3月11日(2010.3.11)

(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	Z N A L	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02		
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543	5 1 5 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/09	A	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)				

(21) 出願番号 特願2009-533290 (P2009-533290)
 (86) (22) 出願日 平成18年10月21日 (2006.10.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年6月2日 (2009.6.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/041748
 (87) 国際公開番号 W02008/048276
 (87) 国際公開日 平成20年4月24日 (2008.4.24)

(71) 出願人 501489694
 アーバー ビータ コーポレーション
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 940
 86, サニーベール, ルーサーン ドライ
 ブ 772
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ルー, ピーター エス.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 85, サニーベール, ルーサン ドラ
 イブ 772

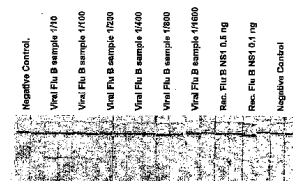
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型インフルエンザウイルスの検出

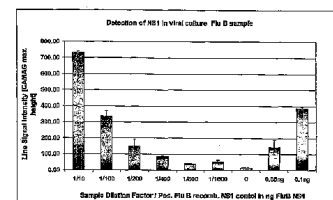
(57) 【要約】

本発明は、B型インフルエンザをNS1タンパク質から検出する方法を提供する。NS1タンパク質は、臨床試料中に検出可能なレベルで存在しており、B型インフルエンザに汎特異性でありA型インフルエンザウイルスまたは他のウイルスに結合しない抗体を用いて検出できる。一実施形態において、本発明は、患者がB型インフルエンザウイルスに感染しているかどうかを特定するための方法を提供し、この方法は、B型インフルエンザウイルスのNS1タンパク質が患者試料中に存在しているかどうか判定するステップであって、存在から、該患者がB型インフルエンザウイルスに感染していることが示されるステップを含む。一局面において、この患者試料は、血液、組織、鼻分泌物、肺滲出液、排泄腔試料、糞便試料、咽頭スワブおよび唾液からなる群より選択される。

Lateral flow assay strips



Signal quantification via CAMAG reader



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者が B 型インフルエンザウイルスに感染しているかどうかを特定するための方法であって、

B 型インフルエンザウイルスの NS 1 タンパク質が患者試料中に存在しているかどうか判定するステップであって、存在から、該患者が B 型インフルエンザウイルスに感染していることが示されるステップ

を含む方法。

【請求項 2】

前記判定するステップが、

10

B 型インフルエンザウイルス NS 1 タンパク質に特異的に結合する薬剤と患者試料を接触させるステップと、

該薬剤と該 NS 1 タンパク質との特異的な結合を検出するステップであって、特異的な結合から B 型インフルエンザウイルスの存在が示されるステップと

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記判定するステップが、前記 NS 1 タンパク質をコードする mRNA の存在を判定し、該 mRNA の存在から該 NS 1 タンパク質の存在を推測するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

20

前記薬剤が、NS 1 タンパク質に特異的に結合する抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体が、B 型インフルエンザの様々な株に汎特異性である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が、B 型インフルエンザの単一株に単一特異性である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記接触させるステップが、B 型インフルエンザウイルス NS 1 タンパク質の様々なエピトープに特異的に結合する第 1 および第 2 の薬剤と前記患者試料を接触させるステップを含み、該第 1 の薬剤が支持体に固定されており、前記検出するステップが、該第 1 および第 2 の薬剤が該 NS 1 タンパク質に特異的に結合しているサンドイッチを検出して前記ウイルスの存在を示す、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記第 1 および第 2 の薬剤が第 1 および第 2 の抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 および / または第 2 の薬剤がポリクローナル抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

40

前記第 1 および / または第 2 の薬剤が B 型インフルエンザの様々な株に汎特異性である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記患者試料が、血液、組織、鼻分泌物、肺滲出液、排泄腔試料、糞便試料、咽頭スワブおよび唾液からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料が A 型インフルエンザウイルスに感染しているかどうか判定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

A 型インフルエンザウイルス NS 1 タンパク質の存在または不在から A 型インフルエン

50

ザウイルスの存在または不在を判定する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

患者試料中の B 型インフルエンザウイルスの同定および亜型判定のためのキットであって、

B 型インフルエンザウイルス NS 1 タンパク質に特異的に結合する薬剤を含み、該薬剤が固体支持体に固定されている、キット。

【請求項 1 5】

前記薬剤が抗体である、請求項 1 4 に記載のキット。

【請求項 1 6】

B 型インフルエンザウイルスを検出および / または定量化するための、B 型インフルエンザウイルスの NS 1 タンパク質の使用。

【請求項 1 7】

C 型インフルエンザウイルスを検出および / または定量化するための、C 型インフルエンザウイルスの NS 1 タンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

インフルエンザはオルトミクソウイルス科の RNA ウイルスによって引き起こされる。これらのウイルスには 3 つの型があり、インフルエンザの 3 つの異なった型、すなわち A 型、B 型および C 型を引き起こす。インフルエンザウイルスの A 型ウイルスは、哺乳動物（ヒト、ブタ、フェレット、ウマ）および鳥に感染する。これは、世界的パンデミックを引き起こしたウイルス型であるため、人類にとって非常に重要である。B 型インフルエンザウイルス（単に B 型インフルエンザとしても知られている）はヒトのみに感染する。これは、たまに流感の局所的な大流行を引き起こす。C 型インフルエンザウイルスも、ヒトのみに感染する。これは、若いときにほとんどの人に感染し、めったに重大な病気を引き起こさない。

【0002】

「Binax NOW Flu A および Flu B（商標）」（Binax 社、米国 Maine 州 Portland 所在）、「Directigen Flu A + B（商標）」（Becton Dickinson 社、米国 New Jersey 州 Franklin Lakes 所在）、「Flu OIA（商標）」（BioStar 社、米国 Colorado 州 Boulder 所在）、「QuickVue（商標）」（Quidel 社、米国 California 州 San Diego 所在）、「Influenza AB Quick（商標）」（デンカ生研社、日本国所在）、および「Expect Flu A & B」（Remel 社、米国 Kansas 州 Lenexa 所在）などの、インフルエンザ抗原の現在の迅速免疫診断試験は、報告によれば、インフルエンザ A 型を検出するか、またはインフルエンザ A 型と B 型とを識別することができる。これらの試験フォーマットの複雑さは、特別の訓練を要するものでありうる。加えて、陽性試験結果を得るためには、通常、かなりの量のビリオン粒子が必要であり、このことから、それらの使用が、ウイルス脱粒がその最高レベルにある短い期間に制限される。アッセイ感度も様々であり、ある種のアッセイにおける最大で 20 % の偽陰性試験結果が現在の重大な懸念となっている（例えば、「WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis」、2005 年 7 月を参照）。逆転写酵素 PCR（RT-PCR）ベースの診断が性能の前進をもたらしたが、手間がかかり、高度に訓練された人員を必要とし、オンサイトまたは実地試験が困難となっている。逆転写酵素の相対的な非能率性のため、ウイルス RNA を効果的に検出するには、かなりの量のウイルス（例えば 10^4 ビリオン粒子）と 20 ものプライマーとが必要となりうる。残念ながら、RT-PCR は、流行の状況での対象の高スループットスクリーニングにも、農業またはポイントオブケアの状況での実地利用にも容易には適合しない。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

加えて、新規なインフルエンザ株の複雑さ、多様性および迅速な出現が高リスク株の診断を困難にしており、それゆえ、現在のところ迅速な対応はほとんど不可能である。疫学者にとっては、高い突然変異率および遺伝的再集合から生じる多様性によって、どこにPCR用の新規な診断プライマーの適時な導入を行えば、新規な株が発生および反応するのか予期するのが困難となっている。その結果、（現在のところ）インフルエンザの多様性によって、複合PCRアプローチの必要性が決定づけられている。

【 0 0 0 4 】

本発明者らのひとは、病原性形態のA型インフルエンザで、NS1タンパク質が、典型的な非トリ型のヒトインフルエンザ（すなわちB型またはC型インフルエンザ）とは異なった形態で存在しているかもしれないと報告している。非特許文献1。B型インフルエンザによる感染は現在、A型インフルエンザによるものほど深刻ではないが、このウイルスに感染している対象を、他のインフルエンザに感染している対象およびインフルエンザに類似した症候を示す他の障害を患っている対象の両方から識別するために、このウイルスに感染している対象を同定する改良法の必要性が依然として存在している。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 非特許文献 1 】 L u 、 S c i e n c e （ 2 0 0 6 年 4 月 2 1 日 ） 3 1 2 巻、 3 3 7 頁

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、患者がB型インフルエンザウイルスに感染しているかどうかを特定する方法を提供する。そのような方法は、B型インフルエンザウイルスのNS1タンパク質が患者試料中に存在しているかどうか判定するステップであって、存在から、患者がB型インフルエンザウイルスに感染していることが示されるステップを含む。一部の方法では、判定するステップは、B型インフルエンザウイルスNS1タンパク質に特異的に結合する薬剤と患者試料を接触させるステップと、薬剤とNS1タンパク質との特異的な結合を検出するステップであって、特異的な結合からB型インフルエンザウイルスの存在が示されるステップを含む。一部の方法では、判定するステップは、上記NS1タンパク質をコードするmRNAの存在を判定し、mRNAの存在から上記NS1タンパク質の存在を推測するステップを含む。薬剤は、場合によっては、NS1タンパク質に特異的に結合する抗体である。抗体は、場合によっては、インフルエンザB型の様々な株に汎特異性（p a n s p e c i f i c）である。抗体は、場合によっては、B型インフルエンザの単一株に単一特異性である。場合によっては、接触させるステップは、B型インフルエンザウイルスNS1タンパク質の様々なエピトープに特異的に結合する第1および第2の薬剤と患者試料を接触させるステップを含み、上記第1の薬剤が支持体に固定されており、検出するステップは、第1および第2の薬剤がNS1タンパク質に特異的に結合しているサンドイッチを検出して上記ウイルスの存在を示す。第1および第2の薬剤は、場合によっては、第1および第2の抗体である。第1および/または第2の薬剤は、場合によっては、ポリクローナル抗体である。第1および/または第2の薬剤は、場合によっては、B型インフルエンザの様々な株に汎特異性である。一部の方法では、患者試料が、血液、組織、鼻分泌物、肺滲出液、排泄腔試料、糞便試料、咽頭スワブおよび唾液からなる群より選択される。

【 0 0 0 7 】

一部の方法は、試料がA型インフルエンザウイルスに感染しているかどうか判定するステップをさらに含む。一部のそのような方法では、A型インフルエンザウイルスNS1タンパク質の存在または不在からA型インフルエンザウイルスの存在または不在を判定する。

【 0 0 0 8 】

本発明は、患者試料中のB型インフルエンザウイルスの同定および亜型判定のためのキットをさらに提供する。そのようなキットは、B型インフルエンザウイルスNS1タンパク質に特異的に結合する薬剤を含み、薬剤は固体支持体に固定されている。薬剤は、場合によっては抗体である。

【0009】

本発明は、B型インフルエンザウイルスを検出および/または定量化するための、B型インフルエンザウイルスのNS1タンパク質の使用をさらに提供する。

【0010】

本発明は、C型インフルエンザウイルスを検出および/または定量化するための、C型インフルエンザウイルスのNS1タンパク質の使用をさらに提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】2株のB型インフルエンザのNS1アミノ酸配列。

【図2A】B型インフルエンザのNS1に対する様々なモノクローナル抗体を用いたELISAアッセイにおける、2株のB型インフルエンザからの組換え体NS1の検出を示す。対照として、いくつかの株のA型インフルエンザのNS1が含まれている。B型インフルエンザのNS1に対する抗体はいずれも、A型インフルエンザのNS1とは交差反応しなかった。

【図2B】B型インフルエンザのNS1に対する様々なモノクローナル抗体を用いたELISAアッセイにおける、2株のB型インフルエンザからの組換え体NS1の検出を示す図である。対照として、いくつかの株のA型インフルエンザのNS1が含まれている。B型インフルエンザのNS1に対する抗体はいずれも、A型インフルエンザのNS1とは交差反応しなかった。

20

【図3】様々な組合せの捕獲抗体および検出抗体を用いたラテラルフローアッセイ(lateral flow assay)における、2株のB型インフルエンザの組換え体NS1の検出。

【図4】B型インフルエンザのNS1を検出するための、捕獲抗体および検出抗体の適した組合せを示すチャート。

【図5】臨床試料中のB型インフルエンザのNS1の検出を示す図である。

【発明を実施するための形態】

30

【0012】

(定義)

結合剤、例えば抗体と、NS1タンパク質との「特異的結合」は、捕獲剤または検出剤が、様々なウイルス分析物の混合物中に存在する特定のウイルス分析物に優先的に結合する能力を指す。例えば、本出願に記載の抗体は、A型インフルエンザのNS1には特異的に結合せずに、B型インフルエンザのNS1に特異的に結合する。特異的結合は、約 10^{-6} M未満、好ましくは約 10^{-7} M未満、そして最も好ましくは約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)を意味する。

【0013】

「捕獲剤/分析物複合体」は、分析物、例えばインフルエンザウイルスNS1タンパク質と捕獲剤の特異的な結合から生じる複合体である。捕獲剤および分析物は、特異的な結合に適した条件下で、特異的に、すなわち相互に結合し、そのような物理化学的条件は、例えば、塩濃度、pH、界面活性剤濃度、タンパク質濃度、温度、および時間に関して表現するのが好都合である。本条件は、例えば溶液中で、あるいはその代わりに結合要素の1つが固相に固定されている場合に、結合が起こることを可能にするのに適している。そのように適した代表的条件は、例えば、HarlowおよびLane、「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory社、米国New York州Cold Spring Harbor所在(1989年)に記載されている。適した条件は、約 10^{-6} M未満、好ましくは約 10^{-7} M未満、そして最も好ましくは約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)

40

50

）を有する結合相互作用をもたらすことが好ましい。

【0014】

「固相」は、1または複数種の反応体が静電的に、疎水的に、または共有結合で結合しうる表面を意味する。代表的な固相には、例えば、ナイロン6、ナイロン66、ポリスチレン、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、ガラスビーズ、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ブタジエン-スチレンコポリマー、シラスティックゴム、ポリエステル、ポリアミド、セルロースおよび誘導体、アクリレート、メタクリレート、ポリビニル、塩化ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニル、ポリスチレンのコポリマー、シリカゲル、シリカウェーハガラス、アガロース、デキストラン、リポソーム、不溶性の金属タンパク質 (protein metal) およびニトロセルロースが含まれる。代表的な固相には、ビーズ、管、細片、円板、濾紙およびプレートなどとして形成されたものが含まれる。フィルターは、分析物を、例えば濾液として捕獲するか、または捕捉によって作用するか、または共有結合によって作用する働きをしうる。使用者に配給するための固相捕獲試薬は、「捕獲試薬」でコーティングされた固相から構成され得、生物学的な試料中におけるインフルエンザNS1分析物への捕獲試薬の結合を保存および/または最大化するように（例えば、窒素雰囲気下で）容器に入れることができる。

10

【0015】

生物学的な試料には、組織の流体、組織切片、空気中または水中に保持されている生物学的な物質、ならびにそこから、例えばバイオテラの脅威などを評価するために、例えば濾過および遠心法などによって収集された生物学的な物質が含まれる。代替の生物学的な試料は、胎児または卵、卵黄、および羊水から採取できる。代表的な生物学的流体には、尿、血液、血漿、血清、脳脊髄液、精液、肺洗浄液、糞便、痰、粘液、および生物学的な物質を保持している水などが含まれる。あるいは、生物学的な試料には、鼻咽頭または口咽頭スワブ、鼻腔洗浄液、気管、肺、気嚢、腸、脾臓、腎臓、脳、肝臓および心臓からの組織、痰、粘液、生物学的な物質を保持している水、排泄腔スワブ、痰、鼻粘液および口腔粘液などが含まれる。代表的な生物学的な試料には、食糧、例えば肉、加工食品、家禽およびブタなどの試料も含まれる。生物学的な試料には、外来患者診療所、病院、クリニック、および食料備蓄施設（例えば、レストラン、屠殺場、冷蔵施設およびスーパーマーケットの包装など）からの汚染溶液（例えば食品加工溶液など）およびスワブ試料も含まれる。生物学的な試料には、in-situの組織および体液（すなわち試験用に収集したのではない試料）が含まれてもよく、例えば、本方法は、例えば、点眼剤、結膜に直接適用する試験細片を用いた、眼内のウイルス感染の存在もしくは重度の検出、または、例えば、試験対象の口または鼻咽頭内に指示薬カプセルを入れることによる肺感染の存在もしくは程度を検出の際に有用となりうる。あるいは、スワブまたは試験細片を口内に入れることができる。生物学的な試料は、対象の細胞のいかなる組織、臓器または細胞群に由来するものでもよい。一部の実施形態では、擦過検体、生検、または洗浄液を対象から得る。生物学的な試料には、血液、尿、痰、および口腔液などの体液、ならびに鼻の洗浄液、スワブ、または吸引液、気管吸引液、下疳スワブ、糞便試料などの試料が含まれる。対象とする個々の病原体を検出するのに適した生物検体、例えば、呼吸器疾患に関連した高危険性A型インフルエンザウイルスの場合には鼻腔スワブ、洗浄液、もしくは吸引液、または気管の吸引液などの鼻咽頭の検体、あるいは口腔スワブなどを収集する方法は、当業者によく知られている。場合によっては、生物学的な試料は、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、およびマイコスタチンなどの抗生物質類を含有する等張液中に懸濁してもよい。

20

30

40

【0016】

（発明の詳細な説明）

検出可能なレベルの、B型インフルエンザウイルスのインフルエンザNS1タンパク質は、鼻分泌物などの体分泌物中に見出すことができる。本発明は、A型インフルエンザには特異的に結合せず、様々な株のB型インフルエンザに汎反応性である、B型インフルエンザに対する抗体を提供する。そのような抗体は、B型インフルエンザの存在を、そのN

50

S 1 タンパク質の存在から検出することを可能にする。

【0017】

I . インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科に属し、それらの核タンパク質 (NP) およびマトリックスタンパク質 (M1) の抗原性の相違に基づいて、A、B および C の群に分類されている。株へのさらなる亜型判定は、通常、2 種のビリオン糖タンパク質、すなわち赤血球凝集素 (HA; H) およびノイラミニダーゼ (NA; N) に存在する抗原の型の評価に基づいている。HA および NP は、宿主細胞表面へのビリオンの付着を媒介する病原因子である。M1 タンパク質は、ウイルスのアセンブリーおよび脱粒で機能すると考えられており、NP は、RNA 複製および転写で機能している。これらのビリオンタンパク質に加えて、非構造タンパク質 1 および 2 (NS1、NS2) と呼ばれる他の 2 種の非構造タンパク質、すなわち非ビリオンタンパク質がウイルス感染細胞内で発現される。非構造ウイルスタンパク質 NS1 は、スプライシングならびに細胞性 mRNA の核外輸送および翻訳の刺激の調節と、宿主インターフェロン能力の相殺とを含めた多機能を有する。NS1 タンパク質は、インフルエンザウイルスで同定および配列決定されており、その配列は、NCBI データベース内に見出すことができる。B 型インフルエンザの例示的な 2 株に由来する NS1 タンパク質の配列を図 1 に示す。その 2 株は 93% の配列同一性を示す。他のインフルエンザ株の NS1 タンパク質とは、例えば図 1 に示す配列を用いて、既知のインフルエンザ亜型で NS1 タンパク質として認識されているタンパク質のうちの 1 つに最も大きな配列類似性を有するタンパク質を意味する。

10

20

【0018】

II . 診断および治療に使用するための抗体

本発明は B 型インフルエンザの NS1 タンパク質に対する抗体を提供する。そのような抗体の一部は、少なくとも 2 株もしくは 5 株、またはすべてもしくは実質的にすべての既知の株の B 型インフルエンザに由来する NS1 タンパク質に特異的に結合する点で汎反応性である。他の抗体は、1 株の B 型インフルエンザのみに特異的に結合する点で単一特異性である。通常、そのような抗体は、すべての株の A 型インフルエンザに対して特異的な結合を行わない。抗体は、ポリクローナル抗体でも、様々なエピトープ特異性を有する別個のモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のプールでもよい。モノクローナル抗体は、タンパク質の抗原含有断片から、抗体の型に応じた標準的手順によって作製される (例えば、Kohler ら、Nature、256 巻、495 頁、(1975 年); ならびに Harlow および Lane、"Antibodies, A Laboratory Manual" (C. S. H. P. 社、米国 New York 州所在、1988 年); Queen ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86 巻、10029 ~ 10033 頁 (1989 年) および国際公開第 90/07861 号; Dower ら、国際公開第 91/17271 号; ならびに、McCafferty ら、国際公開第 92/01047 号 (それぞれを参照によりすべての目的で本明細書に援用する) を参照)。

30

【0019】

B 型インフルエンザの複数の株で免疫感作することによって、または 1 株で免疫感作し、別の株で追加免疫することによって、汎特異性の抗体を産生するように免疫感作を偏らせることができる。あるいは、B 型インフルエンザ NS1 の高度に保存された領域に由来する断片を免疫原として用いることができる。逆に、単一特異性抗体を産生させるには、単一株の NS1 または非保存領域に由来する NS1 断片で免疫感作を行うことが好ましい。

40

【0020】

「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は、完全な抗体およびそれらの結合性断片が含まれるように使用される。通常、別々になっている重鎖、軽鎖 Fab、Fab' F(ab')₂、Fab c および Fv を含めた断片は、それらの由来である完全な抗体と、抗原断片への特異的な結合に関して競合する。断片は、組換え DNA 技法によって、また

50

は完全な免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的分離によって産生される。「抗体」という用語には、他のタンパク質と化学的に結合されているか、またはそれらとの融合タンパク質として発現された１または複数本の免疫グロブリン鎖が含まれる。「抗体」という用語には、二重特異性抗体も含まれる。

【 0 0 2 1 】

I I I . 他 の 結 合 剤

N S 1 タンパク質の検出での使用には、抗体が好ましいが、B 型インフルエンザの N S 1 に特異的親和性を有するいかなる結合剤も抗体代用物として使用できる。代用物には、B 型インフルエンザの N S 1 に対してスクリーニングされたランダム化ファージディスプレイライブラリーから得られたペプチドが含まれる。代用物にはアプタマーも含まれる。アプタマーは、結合ポケットを形成することによって特異的なリガンドを認識する、ランダム配列の巨大な集団から *in vitro* で選択された R N A 分子または D N A 分子である。アロステリックリボザイムは、それらの活性が、活性部位から離れて位置するアプタマードメインへのエフェクター分子の結合によって調節されている R N A 酵素である。これらの R N A は、特定のエフェクターの存在または不在によって制御されている精密分子スイッチとして働く。アプタマーは、核酸、タンパク質および生物全体にさえ結合できる。アプタマーは抗体とは異なるが、それでも、それらは様々な診断フォーマットで抗体の特性を模倣する。したがって、アプタマーは、抗体の代わりに、または抗体と組み合わせて、一般的、または特定の N S 1 領域の存在を同定するのに使用できる。

10

20

【 0 0 2 2 】

I V . 診 断 試 験

B 型インフルエンザに感染している疑いのある試料は、B 型インフルエンザウイルスの N S 1 タンパク質を検出することによって、それが存在しているかどうか試験する。そのタンパク質は、B 型インフルエンザの N S 1 タンパク質に特異的に結合する抗体または他の捕獲試薬を用いて、下記に、より詳細に記述するフォーマットで検出することができる。B 型インフルエンザの N S 1 タンパク質の存在は、試料が B 型インフルエンザウイルスに感染していることを示す。そのような試験は、単独で、または A 型および / もしくは C 型インフルエンザ用の他の試験と組み合わせて行うことができる。A 型インフルエンザおよび C 型インフルエンザに関する試験も、これらの株に適した特異性を有する抗体または他の捕獲試薬を用いて、これらの株の N S 1 タンパク質が存在しているかどうか検出することによって実施できる。A 型インフルエンザを検出する方法、および、とりわけ、その病原型および非病原型を識別する方法が、2006 年 7 月 3 日出願の同時係属出願である米国特許出願第 11 / 481,411 号 (参照により、本明細書に全体として、すべての目的に関して組み込まれている) に記載されている。

30

40

【 0 0 2 3 】

本発明の方法は、通常、B 型インフルエンザの N S 1 に汎特異性の抗体または他の結合試薬を用いて行う。この方法は、型を識別せずに、インフルエンザの一部またはすべての株を検出する。この方法は、B 型インフルエンザ株を相互に識別する抗体を用いて行うこともできる。この場合、通常、単一のアッセイで 1 パネルの抗体が使用され、このアッセイは、B 型インフルエンザの存在だけでなく、どの株が存在するかも同定する。

【 0 0 2 4 】

V . 診 断 試 験 用 の フォーマット

本発明は、異なった様々なタイプの生物学的な試料中の B 型インフルエンザウイルスを同定するアッセイ法で有用な診断用捕獲試薬および検出試薬を提供する。そのようなフォーマットには、免疫沈降反応、ウエスタンブロットティング、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、競合アッセイおよび免疫測定アッセイ (*immunometric assay*) が含まれる。Harlow および Lane、*「Antibodies, A Laboratory Manual」* (C S H P、N Y、1988 年)、米国特許第 3,791,932 号、第 3,839,153 号、第 3,850,752 号、第 3,879,262 号、第 4,034,074 号、第 3,791,932 号、第 3,817,837 号、第 3

50

、 8 3 9 , 1 5 3 号、第 3 , 8 5 0 , 7 5 2 号、第 3 , 8 5 0 , 5 7 8 号、第 3 , 8 5 3 , 9 8 7 号、第 3 , 8 6 7 , 5 1 7 号、第 3 , 8 7 9 , 2 6 2 号、第 3 , 9 0 1 , 6 5 4 号、第 3 , 9 3 5 , 0 7 4 号、第 3 , 9 8 4 , 5 3 3 号、第 3 , 9 9 6 , 3 4 5 号、第 4 , 0 3 4 , 0 7 4 号ならびに第 4 , 0 9 8 , 8 7 6 号を参照。

【 0 0 2 5 】

免疫測定アッセイまたはサンドイッチアッセイが好ましいフォーマットである（米国特許第 4 , 3 7 6 , 1 1 0 号、第 4 , 4 8 6 , 5 3 0 号、第 5 , 9 1 4 , 2 4 1 号および第 5 , 9 6 5 , 3 7 5 号を参照）。そのようなアッセイは、固相に固定された 1 種の抗体または抗体の集団と、溶液中の別の抗体または抗体の集団とを用いる。通常、その溶液抗体または抗体集団は標識されている。抗体集団を用いる場合、その集団は通常、標的抗原内の異なったエピトープ特異性に結合する抗体を含有する。したがって、同じ集団を、固相抗体および溶液抗体の両方に用いることができる。モノクローナル抗体を用いる場合、異なった結合特異性を有する第 1 および第 2 のモノクローナル抗体を固相および溶液相に用いる。固相抗体および溶液抗体は、標的抗原に、順次または同時に接触させることができる。固相抗体を最初に接触させる場合、そのアッセイは、フォワードアッセイ（forward assay）であると言われる。逆に、溶液抗体を最初に接触させる場合、そのアッセイは、リバーサアッセイ（reverse assay）であると言われる。標的を両方の抗体と同時に接触させる場合、そのアッセイは、同時アッセイと呼ばれる。標的を抗体と接触させた後に、通常約 1 0 分から約 2 4 時間までの間で変動し、通常約 1 時間である時間、試料をインキュベートする。その後、検出試薬として使用された（1 または複数種の）抗体に特異的に結合しなかった、試料の成分を除去するために、洗浄ステップを行うことができる。固相抗体および溶液抗体を別々のステップで結合させる場合、それらの結合ステップのいずれか、または両方の後に、洗浄を行うことができる。洗浄の後に、通常、標識された溶液抗体の結合を介して固相に連結されている標識を検出することによって、結合を定量化する。通常、抗体または抗体集団の所与の対、および所与の反応条件に関して、既知の濃度の標的抗原を含有する試料から検量線を作成する。その後、検量線の内挿によって、試験される試料中の抗原の濃度を決定する。平衡状態で結合した標識溶液抗体の量から、または平衡に達する前の一連の時点における、結合した標識溶液抗体の動態測定によって、分析物を測定できる。そのような曲線の勾配が試料中の標的濃度の尺度となる。

【 0 0 2 6 】

競合アッセイも使用できる。一部の方法では、抗体検出試薬との結合に関して、試料中の標的抗原が、外因的に添加された標識標的抗原と競合する。抗体に結合した標識標的抗原の量は、試料中の標的抗原の量と反比例している。抗体は、試料からの結合複合体の分離を容易にするために、検出前に固定することができ（不均一アッセイ）、または、均一アッセイフォーマットで行う場合には、分離が不要となりうる。他の方法では、検出試薬として使用される抗体を標識する。抗体が標識される場合、その結合部位は、試料中の標的抗原、および例えば固相に固定された標的抗原でありうる、外因的に供給される形態の標的抗原への結合に関して競合する。標識抗体は、試料中の、上記標識抗体と同じ標的抗原に結合する抗体を検出するのに、さらに別の競合的フォーマットで使用することもできる。上記フォーマットのそれぞれで、検出試薬として使用される抗体が、アッセイされている標的とほぼ同じ濃度の制限量として存在する。

【 0 0 2 7 】

ラテラルフローデバイスが好ましいフォーマットである。家庭用妊娠試験と同様に、ラテラルフローデバイスは、特定の生物製剤で処理されている試験細片に流体を添加することによって働く。液体試料によって運搬され、対応する生物製剤で標識されたリン光体が細片を貫流し、それらが特定の帯域に入ったときに、それらを捕獲することができる。細片上に見出されるリン光体シグナルの量が標的分析物の量に比例する。

【 0 0 2 8 】

B 型インフルエンザを含有している疑いがある試料をラテラルフローデバイスに添加す

る。試料は、拡散によって移動できるようになっており、線または有色帯域がインフルエンザBの存在を示す。ラテラルフローは通常、3つの特定領域、すなわち試料添加領域、NS1に対する1または複数種の抗体を含有している捕獲領域、および各帯域が1つまたは複数の標識を含有している1つまたは複数の帯域を含有する読み取り領域を含有している固体支持体（例えばニトロセルロース膜）を含有している。ラテラルフローに、陽性対照および陰性対照を含有させることもできる。したがって、ラテラルフローデバイスは、例えば次の通りに使用できる。すなわち、生物学的な試料のアリコートを試験細片の一端に接触させることによって、B型インフルエンザのNS1タンパク質を、生物学的な試料中の他のウイルス性タンパク質および細胞性タンパク質から分離し、その後、例えばラテラルフローなどの毛細管現象によって、タンパク質を試験細片上で移動させる。1または複数種の抗体および/またはアプタマーが、捕獲試薬および/または検出試薬として含有されている。ラテラルフローで分離、検出および定量化する方法およびデバイスは、例えば、参照により全体が本明細書に援用される、米国特許第5,569,608号、第6,297,020号および第6,403,383号に記載されている。一例として、試験細片は、試料を添加するために近位の領域（試料添加領域）、ならびにNS1タンパク質に対する抗体および緩衝試薬およびその抗体と、移動している生物学的な試料中の任意のB型インフルエンザNS1タンパク質との結合相互作用を確立するのに適した添加物を含有する遠位の試験領域を含みうる。別の例では、試験細片は、B型インフルエンザの異なった2株のNS1に対する異なった抗体を含有する2箇所の試験領域、すなわち、それぞれが異なったB型インフルエンザ分析物と特異的に相互作用できる2箇所の試験領域を含む。

10

20

【0029】

上記方法での使用に適した検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的もしくは化学的手段、または他の手段によって検出可能ないかなる部分も含まれる。例えば、適した標識には、標識されたストレプトアビジン結合体で染色するためのビオチン、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミンおよび緑色蛍光タンパク質など）、放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、およびELISAで一般的に使用される他の酵素）、およびコロイド状金または色ガラスまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレンまたはラテックスビーズ）などの比色分析標識が含まれる。そのような標識の使用を記載している特許には、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号および第4,366,241号が含まれる。「Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals」（第6版、Molecular Probes社、米国Oregon州Eugene所在）も参照のこと。放射標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンタを用いて検出でき、蛍光標識は、発せられた光を検出する光検出器を用いて検出でき、酵素標識は通常、その酵素に基質を与え、基質への酵素の作用によって生成した反応生成物を検出することによって検出され、比色分析標識は、発色した標識を単純に可視化することによって検出される。

30

40

【0030】

試料中のB型インフルエンザNS1タンパク質のレベルは、定量化すること、および/または対照と比較することができる。適した陰性対照試料は、例えば、健康であることが分かっている個体、例えばインフルエンザウイルス感染を有していないことが分かっている個体から得られる。特異性対照は、既知のA型インフルエンザ感染またはC型インフルエンザ感染を有する個体、またはインフルエンザ以外のウイルスに感染している個体から収集できる。対照試料は、試験される対象と遺伝的な関係がある個体から得ることができるが、遺伝的に関係のない個体からも得ることができる。適した陰性対照試料は、感染のより早期、すなわち試験試料が採取された時点より早い時点に個体から収集された試料でもよい。陽性対照として、B型インフルエンザの組換え体NS1を用いることができる。

50

【0031】

生物学的な試料中のNS1レベルが、様々な異なった可能な免疫検定法フォーマットでこれらの抗原を検出することを可能にするのに十分であることを、ウエスタンブロットは示している。しかし、特定の免疫検定法フォーマットで検出するのに、特定の生物学的な試料中のNS1レベルが限定的であると判明した場合には、*in vitro*で細胞を感染させることによって、生物学的な試料中の生ウイルスを増幅させることができる。すなわち、ウイルス増幅試料のNS1タンパク質は、約6時間から約12時間以内に検出可能となる。生物学的な試料中およびウイルス増幅試料のNS1抗原の収率は、プロテアーゼ阻害剤およびプロテアソーム阻害剤に含めることによって改善することができる。

【0032】

あるいは、NS1タンパク質をmRNAレベルで検出することができる。試料から得られたRNAを逆転写させて、増幅させる。場合によっては、増幅の過程で標識を添加する。その後、増幅された核酸を、少なくとも1株のB型インフルエンザウイルスのNS1をコードする核酸に実質的または完全に相補的であることが知られている核酸プローブとハイブリッド形成させる。通常、標識の存在からハイブリッド形成を検出する。B型インフルエンザのNS1タンパク質をコードする核酸に相補的なプローブにハイブリッド形成する増幅された核酸の存在は、試料中におけるB型インフルエンザの存在を示す。抗体を用いる場合と同様に、プローブは、B型インフルエンザの様々な株に汎特異性のものか、または非特異性のものを選択できる。ハイブリッド形成アッセイは、アレイフォーマットで行うことができる。そのようなフォーマットは、場合によっては様々な株のB型インフルエンザのNS1タンパク質をコードする核酸に対するいくつかのプローブをアレイに含めることを可能にする。A型またはC型インフルエンザのNS1タンパク質のプローブも含めることができ、同様に、他のウイルスまたは他の病原体に対するプローブも含めることができる。

【0033】

VI. 試料調製法

検出可能な濃度のインフルエンザタンパク質、好ましくはNS1を含有しているか、含有しているかもしれないと考えられるいかなる試料も使用できる。使用できる試料の例は、例えば、肺滲出液、細胞抽出物（気道上皮内層、鼻）、血液、粘液、および鼻腔スワブである。鼻腔スワブ中に、高濃度のNS1を見出すことができる。したがって、NS1を同定するための好ましい試料は鼻分泌物である。

【0034】

抗体へのNS1の結合は、0.03%および0.01%を含めた、最大0.05%までのSDSの存在下で起こる。したがって、鼻分泌物または他の体分泌物がラテラルフローフォーマットで容易に用いられそうにない場合、それをSDSで処理することができる。好ましくは、添加されるSDSの量が、最大0.01%まで、より好ましくは0.03%まで、さらに好ましくは0.05%までの最終濃度である。

【0035】

VII. 診断用および治療用キット

本発明の方法を実行するためのキットを提供する。そのキットは、B型インフルエンザのNS1に特異的に結合する1つまたは複数の結合剤、通常は抗体を含有している。本キットは、場合によっては、実施例に開示する試薬、緩衝剤、添加剤の組成物または試薬のうち1つまたは複数の含有している。そのキットは、生物学的な試料中の他の潜在的干渉物質からインフルエンザウイルスのNS1を分離するデバイスまたは系などの手段を含みうる。本キットは、望ましい場合には、アッセイを行うのに有用な1つもしくは複数の様々な構成要素、例えば、1つもしくは複数のアッセイ容器、1もしくは複数の対照試薬もしくは校正試薬、アッセイを行うための1つもしくは複数の固相表面、1もしくは複数の緩衝剤、添加物、検出試薬もしくは抗体、または、例えば、アッセイを行う際に使用するべき各成分の量およびアッセイの結果を評価するための指針を示す添付文書および/もしくは容器標識として、B型インフルエンザを検出するためのキットを用いる方法を詳

述する1つまたは複数の印刷された説明書のうちの1つまたは複数のさらに含みうる。本キットは、例えば、試験細片、サンドイッチE L I S A、ウエスタンブロットアッセイおよびラテックス凝集などを含めた、様々な異なったタイプのアッセイフォーマットを行うのに有用な構成要素を含有しうる。

【0036】

V I I I . 抗体アレイ

本発明は、抗体アレイをさらに提供する。そのようなアレイは、アレイの異なった領域に、それぞれB型インフルエンザのNS1に対する特異性を有する複数の異なった抗体を含有している。その異なった抗体は、B型インフルエンザの様々な株への特異性を有するように選択できる。複数の株に汎特異性である抗体を含めることもできる。A型またはC型インフルエンザのNS1タンパク質の抗体を含めることもできる。そのようなアレイは、B型インフルエンザの検出、株相互の識別、ならびにA型、B型およびC型インフルエンザの識別に有用である。

10

【0037】

抗体アレイ用の多数のフォーマットが提唱されている。米国特許第5,922,615号は、膜表面に固定された抗体の複数の異なった帯域を用いた、アレイ内の複数の標的抗原を検出するデバイスを記載する。米国特許第5,458,852号、第6,019,944号、第6,143,576号および米国特許出願第08/902,775号は、膜上ではなくデバイス内に固定された複数の異なった抗体帯域を有する、複数の標的抗原をアッセイするための診断デバイスを記載する。国際公開第99/67641号は、マイクロスフェアが光ファイバーの末端に固定された後に、個々のマイクロスフェア表面に固定された特異的な結合剤（抗体を含める）の解読および同定を可能にするタグを有するように作製されたマイクロスフェアのアレイを記載する。米国特許第5981180号では、この場合も、結合剤（抗体を含める）を固定するのにマイクロスフェアが使用され、マイクロスフェアは、それらを試料から分離せずに、マイクロスフェアに結合した特異的な結合剤を同定するために、マイクロスフェア内に含有されている2種の異なったフルオロフォアの相対量を検出することによって相互に識別される。

20

【0038】

本明細書に引用されたすべての刊行物および特許を、個々の刊行物または特許のそれぞれを参照により本明細書に援用すると明確かつ個別に示したのと同じように、参照により本明細書に援用する。G I Dまたはアクセッション番号によって参照されたG e n b a n k記録、とりわけ、いかなるポリペプチド配列、ポリヌクレオチド配列またはそれらのアノテーションも、参照により本明細書に援用する。本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な改変および等価物の置換を行うことができる。例えば、主としてB型インフルエンザに関して本発明を説明したが、C型インフルエンザを検出するのに、必要な変更を加えて、同様な戦略を用いることができる。別のことが文脈から明らかでない限り、いかなる特徴、ステップまたは実施形態も、他の任意の特徴、ステップまたは実施形態と組み合わせて用いることができる。

30

【実施例】

【0039】

40

(実施例1)

F L U - BのNS1に対するモノクローナル抗体の単離

F l u - B亜型のNS1タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を調製した。抗体は、汎特異性（すなわち、複数の株のF l u - Bに結合する）または単一特異性（すなわち、1株のF l u - Bに結合し、他のものに結合しない）でありうる。

【0040】

2種のF l u - B亜型について、F l u - B NS1のGSTおよびMBP融合タンパク質を作製した（B / B A / 78、A V C名称：タンパク質#522、G e n b a n k 325112）および（B / Y a g a m a t a / 222 / 2002、A V C名称：タンパク質#523、G e n b a n k 50300312）。クローニングベクターは、P h a r m

50

a c i a 社 (G S T) または New E n g l a n d B i o l a b s 社 (M B P) から入手した。NS1コード領域は、DNA2.0 (米国 C a l i f o r n i a 州 M e n l o P a r k 所在) によるオーバーラップオリゴヌクレオチドを用いて合成した。

【 0 0 4 1 】

1 . C F A 、次に I F A および P B S において F l u - B M B P - N S 1 融合タンパク質を1用量あたり10 ~ 100 μ g の範囲の用量を用いてマウスの免疫感作を行った。

【 0 0 4 2 】

2 . 対応する G S T - N S 1 融合タンパク質を用いた最後の追加免疫の3日後に、脾細胞およびリンパ球を採取し、K o h l e r および M i l s t e i n (N a t u r e 、 1 9 7 5 年) に記載の F O X - N Y 骨髓腫細胞と融合させた。

【 0 0 4 3 】

3 . ハイブリドーマは、最初に F l u - B M B P - N S 1 を用いて、E L I S A でスクリーニングした (図 2 A および 2 B) 。陽性ウェルをクローン化し、M B P および G S T タグのいずれかを有する F l u - B N A 1 タンパク質の両方に対して再スクリーニングを行った。m A b は汎反応性または亜型反応性に分類した。

【 0 0 4 4 】

4 . 反応性と、ラテラルフロー細片上での抗 F l u - B N S 1 m A b の使用への適合性を確認するために、ラテラルフロー細片上の異なった位置で、両方の F l u - B N S 1 タンパク質 (# 5 2 2 および # 5 2 3) でコーティングされたラテラルフロー細片を用いて、さらにスクリーニングを行った。これらのアッセイで、金標識された抗マウス I g 2 次 m A b を介した検出を行った。

【 0 0 4 5 】

5 . 両方の F l u - B N S 1 タンパク質 (A V C # 5 2 2 および # 5 2 3) で反応性を示した抗 F l u - B m A b を捕獲能力および検出能力、ならびに相互との適合性に関してラテラルフローサンドイッチ型アッセイで試験した。両方の型の F l u - B N S 1 タンパク質の候補捕獲 / 選択対を選択して、組換え体 F l u - B N S 1 を検出する感受性のレベルに関して、同じ型のラテラルフローサンドイッチアッセイを用いて試験した。

【 0 0 4 6 】

6 . 最後に、その抗体が臨床検体中の N S 1 を検出する能力に関して調べる。

【 0 0 4 7 】

このワークフローによって、ヒト臨床検体を認識する抗体が得られる。

【 0 0 4 8 】

(実施例 2)

ラテラルフロー

上述の方法に従って産生された抗 B 型インフルエンザ N S 1 モノクローナル抗体を用いて、B 型インフルエンザの N S 1 を検出するラテラルフロー試験を開発した。ストライパー (s t r i p e r) を用いて、抗 B 型インフルエンザ N S 1 モノクローナル抗体を約 0 . 7 m g / m l の濃度で H F 0 7 5 M i l l i p o r e 膜に沈着させた。捕獲剤として沈着させた抗体の一部の例には、以下のもの、すなわち F 8 9 1 F 4 、 F 9 4 3 A 1 および F 8 9 4 D 5 が含まれる。1 m g / m l のヤギ抗マウス抗体 (G A M) で構成される対照バンドも沈着させた。容積 100 μ l の A V C F l u B 緩衝液中で、F l u B N S 1 タンパク質を、F 9 4 3 A 1 (F 9 4 3 A 1 が捕獲剤として使用されない場合) などの金結合体化抗 N S 1 モノクローナル抗体と合わせた。使用された F l u B N S 1 タンパク質は、組換え体である A V C I D 5 2 2 (B / B A / 7 8 N S 1) および A V C I D 5 2 3 (B / Y M / 2 2 2 / 2 0 0 2) 、または B 型インフルエンザに感染していることが分かっている患者からの臨床試料であった。

【 0 0 4 9 】

抗 F l u B N S 1 抗体のストライプを入れた (s t r i p e d) 膜を、F l u B N S 1 / 抗 N S 1 タンパク質溶液中に挿入し、毛細管現象およびウィッキングパッド (w i c k i n g p a d) によって流動を開始させた。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

抗 F l u B N S 1 捕獲剤および検出剤のいくつかの組合せをいくつかの実験で用いた。以下は、一例のプロトコールである。細片試験は、ヤギ抗マウス / F 8 9 1 F 4 抗 F l u B N S 1 モノクローナル抗体で事前にストライプを入れた細片 ; 9 0 % M 4 ウイルス輸送培地、1 0 % の 1 0 × A V C F l u B 緩衝液 ; N S 1 タンパク質である M B P - F l u B N S 1 (A V C 5 2 2 および A V C 5 2 3) の保存液 ; 金結合体 F 9 4 3 A 1 抗体 ; および M a x i S o r p E L I S A プレートを用いて行った。この手順は以下の通りに行った。

【 0 0 5 1 】

1) N S 1 タンパク質の保存液を 9 0 % M 4 ウイルス輸送培地、1 0 % の 1 0 × A V C F l u B 緩衝液で希釈した。 10

【 0 0 5 2 】

2) N S 1 の保存液は、9 0 % M 4 / 1 0 % の 1 0 × A V C F l u B 緩衝液で希釈することによって、0 . 5 n g / μ L まで希釈した。

【 0 0 5 3 】

3) 4 μ L の金結合体抗体を、緩衝液 1 0 0 μ L 毎に添加した。

【 0 0 5 4 】

4) 9 8 μ L の抗体 / 緩衝液混合物を、E L I S A プレート内の別々のウェルに添加した。 20

【 0 0 5 5 】

5) 望ましい最終タンパク質濃度 (例、1 n g F l u B N S 1) を得るように、N S 1 希釈液 2 μ L を、緩衝液を含有しているウェルに添加した (1 ウェルあたり 1 種の N S 1) 。

【 0 0 5 6 】

6) 1 ウェルは、「N S 1 を含まない」陰性対照として働くように、抗体および緩衝液のみのままとした。

【 0 0 5 7 】

7) ウェルの内容物を混和させるため、E L I S A プレートを何度か軽く叩いた。

【 0 0 5 8 】

8) 事前にストライプを入れた細片をウェル内に添加し、発色する間観察する。 30

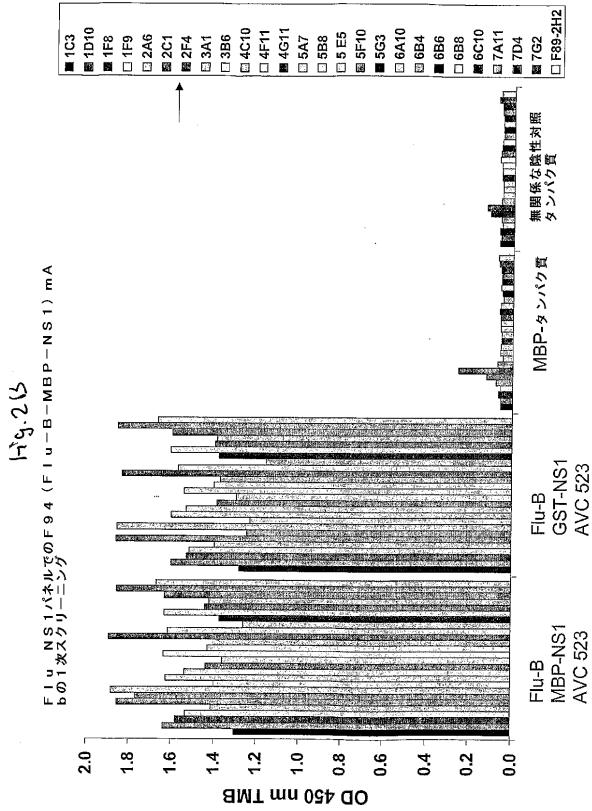
【 0 0 5 9 】

約 1 5 分後 (すべての液体が吸収されたが、細片がまだ乾いていないとき) に、細片をウェルから取り出して、スキャンしてコンピューター内に取り込む。

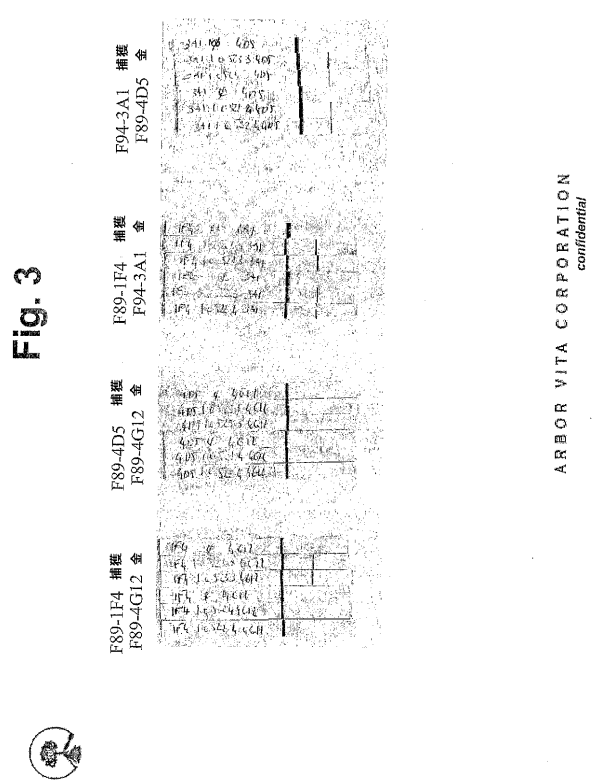
【 0 0 6 0 】

図 3 は、様々な対のモノクローナル抗体を、2 株の B 型インフルエンザ、すなわち B / B A 7 8 (株 5 2 2 としても知られている) および B / Y a g a m a t a / 2 2 2 / 2 0 0 2 (株 5 2 3 としても知られている) での捕獲試薬および検出試薬として試験した結果を示す。4 つの異なったパネルが、抗体の 4 つの組合せを示す。各パネルで、トラック 3 および 6 が陰性対照である。トラック 1 および 2 は、株 5 2 2 からの組換え体 N S 1 であり、トラック 4 および 5 は、株 5 2 3 からの組換え体 N S 1 である。第 1 のパネルのトラック 1 および 2 にはなく、トラック 4 および 5 にある追加のバンドの存在は、F 8 9 - F 4 捕獲抗体 F 8 9 - 4 G 1 2 検出抗体の組合せが、株 5 2 3 は検出するが、株 5 2 2 は検出しなことを示している。他のパネルも同様に分析することができる。この実験および他の同様な実験からの結果を図 4 にまとめる。図 4 は、どの抗体が捕獲抗体として役立ち、どれが検出抗体として役立つことができるか、そして、それらの抗体が両方の株の B 型インフルエンザ (5 2 2 および 5 2 3) に汎特異性であるか、または 5 2 2 もしくは 5 2 3 に単一特異性であるかを示す。例えば、F 8 9 - 1 F 4 抗体は、捕獲抗体としても、検出抗体としても役立つことができ、汎特異性である。F 9 4 - 4 C 1 0 は、検出抗体としては働くが、捕獲抗体としては働かず、B 型インフルエンザ 5 2 3 に特異的である。F 8 9 - 1 F 4 および F 9 4 - 3 A 1 は、ラテラルフローフォーマットでの使用に好ましい抗 40 50

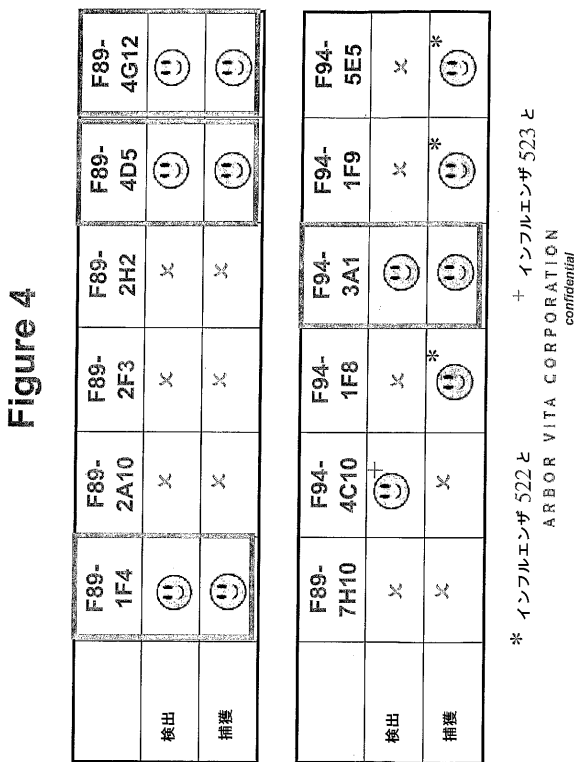
【図 2 B】



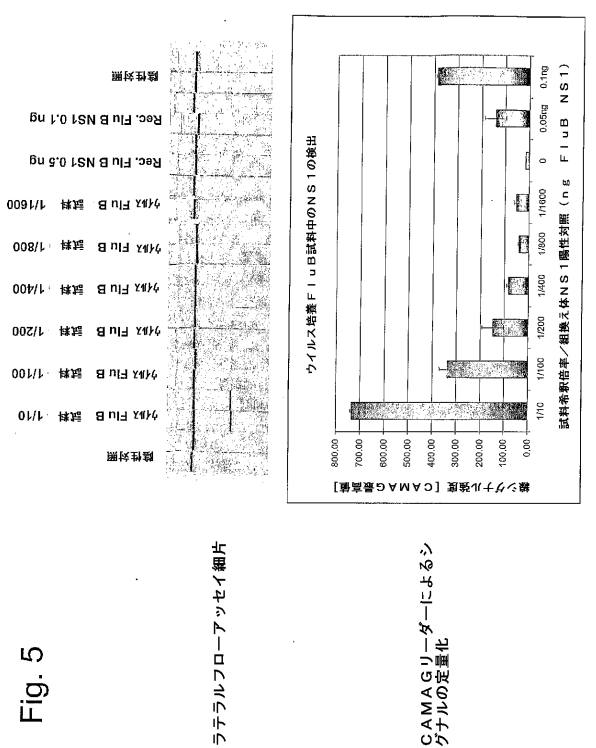
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

2010507780000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/41748
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8): A61K 39/145 USPC: 424/206.1 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) USPC: 424/206.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/209.1, 211.1, 256.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: influenza, NS1 protein, detect\$, antibod\$, mRNA, patient, epitope Google Scholar: Peter S. Lu, influenza, Arbor Vita		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7,060,430 B2 (PALESE et al.) 13 June 2006 (13.06.2006), summary of the invention; col 5, in 63 to col 7, in 4; col 13, in 60 to in 67; col 17, in 4 to col 20, in 2; col 21, in 62 to col. 26, in 49; col 28, in 53 to col 29, in 5; col 29, in 43 to col 30, in 2; col 30, in 6 to in 24; col 31, in 41 to in 56	1-4, 12-17
Y	US 2004/0241638 A1 (THONNARD) 2 December 2004 (01.12.2004), para [0146]	5-11
Y	US 6,890,710 B2 (PALESE et al.) 21 October 2003 (21.10.2003), col 9, in 62 to col 11, in 58; col 11, in 60 to col. 13, in 58	11
Y		5-10
<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 19 May 2007 (19.07.2007)		Date of mailing of the international search report 03 AUG 2007
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 OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

特許法第30条第1項適用申請有り

(72)発明者 ベルマレス, マイケル ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94085, サニーベール, ルーサン ドライブ 772

(72)発明者 シュバイツァー, ヨハネス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94085, サニーベール, ルーサン ドライブ 772

(72)発明者 シルバー, ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94085, サニーベール, ルーサン ドライブ 772

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 CA02 HA14

4B063 QA13 QA18 QA19 QQ10 QQ53 QR36 QR55 QR79 QS34