

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4489351号  
(P4489351)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/10 (2006.01)

C O 7 K 16/10

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

G O 1 N 33/569 (2006.01)

G O 1 N 33/569 H

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 13 (全 52 頁)

(21) 出願番号 特願2002-564544 (P2002-564544)  
 (86) (22) 出願日 平成13年12月5日(2001.12.5)  
 (65) 公表番号 特表2004-536568 (P2004-536568A)  
 (43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/043179  
 (87) 国際公開番号 W02002/064615  
 (87) 国際公開日 平成14年8月22日(2002.8.22)  
 審査請求日 平成16年11月18日(2004.11.18)  
 (31) 優先権主張番号 09/731,126  
 (32) 優先日 平成12年12月6日(2000.12.6)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-2809  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-2806  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-2808  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-2810

(73) 特許権者 391008788  
 アボット・ラボラトリーズ  
 ABBOTT LABORATORIES  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット  
 パーク アボット パーク ロード 1 O  
 O  
 (74) 代理人 100062007  
 弁理士 川口 義雄  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100140523  
 弁理士 渡邊 千尋  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト免疫不全ウイルスに対するモノクローナル抗体およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト免疫不全ウイルス - 1 (H I V - 1) タンパク質 p 2 4 およびヒト免疫不全ウイルス - 2 (H I V - 2) タンパク質 p 2 6 の共有エピトープに結合するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 9 なるハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項2】

ヒト免疫不全ウイルス - 1 タンパク質 p 2 4 およびヒト免疫不全ウイルス - 2 タンパク質 p 2 6 の共有エピトープに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株であって、該細胞株が、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 9 であるハイブリドーマ細胞株。

【請求項3】

H I V - 1 p 2 4 抗原および H I V - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる 1 以上の抗原の、該 1 以上の抗原を含有する疑いのある試験サンプル中における存在を検出するための方法であって、

(a) 該試験サンプルを、請求項1に記載されたモノクローナル抗体と、抗体/抗原複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、

(b) 該複合体を検出する工程を含んでなり、

該複合体の存在が、該試験サンプル中の H I V - 1 p 2 4 抗原および H I V - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの抗原の存在を示すことを特徴とする前記

方法。

【請求項 4】

工程 (a) のモノクローナル抗体が標識されている、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

工程 (b) が以下の工程 (i) 及び (ii) を含む請求項 3 に記載の方法、

(i) 工程 (a) で生じた抗体 / 抗原複合体に、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗体を含むコンジュゲートを、該コンジュゲートが該結合抗原に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え、

(ii) 該シグナル生成化合物により生成されたシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうる抗原の存在を検出する工程を含んでなり、

該シグナルの存在が、該試験サンプル中の HIV - 1 p 2 4 抗原および HIV - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの抗原の存在を示すことを特徴とする前記方法。

10

【請求項 6】

工程 (i) の抗体が、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 6、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 8、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 1 0 及び A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 7 よりなる群から選ばれるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む請求項 3 に記載の方法、

(a) 1) 固体支持体に結合した請求項 1 に記載のモノクローナル抗体、2) 該試験サンプル、および 3) シグナル生成化合物が結合している HIV - 1 抗原および HIV - 2 抗原に結合する抗体を含む指示試薬を接触させて、混合物を形成させ、

(b) 該混合物を、抗体 / 抗原 / 抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートし、

(c) 該シグナル生成化合物により生成された測定可能なシグナルの存在を検出する工程を含んでなり、

該シグナルの存在が、HIV - 1 p 2 4 抗原および HIV - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる該試験サンプル中の 1 以上の抗原の存在を示すことを特徴とする前記方法。

20

【請求項 8】

工程 (a) の指示試薬の抗体が、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 6、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 8、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 1 0 及び A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 7 よりなる群から選ばれるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体である、請求項 7 記載の方法。

30

【請求項 9】

試験サンプル中の HIV - 1 p 2 4 抗原および HIV - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる 1 以上の抗原の存在を測定するためのキットであって、(a) 請求項 1 に記載のモノクローナル抗体と、(b) 検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗体を含むコンジュゲートとを含んでなる前記キット。

【請求項 10】

工程 (b) の抗体が、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 6、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 8、A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 1 0 及び A . T . C . C . 寄託番号 P T A - 2 8 0 7 よりなる群から選ばれるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体である、請求項 9 記載のキット。

40

【請求項 11】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含んでなる診断試薬。

【請求項 12】

1) HIV - 1 抗体および HIV - 2 抗体よりなる群から選ばれる 1 以上の抗体、ならびに 2) HIV - 1 p 2 4 抗原および HIV - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる 1 以上の抗原を、該抗体の 1 以上および該抗原の 1 以上を含有する疑いのある試験サンプ

50

ル中で検出する方法であって、

a) 該試験サンプルを、H I V - 1 抗体に結合する少なくとも 1 つの H I V - 1 抗原と、H I V - 1 抗原 / H I V - 1 抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、

b) 該試験サンプル中の H I V - 1 抗体の存在を示す、該 H I V - 1 抗原 / H I V - 1 抗体複合体を検出し、

c) 該試験サンプルを、H I V - 2 抗体に結合する少なくとも 1 つの H I V - 2 抗原と、H I V - 2 抗原 / H I V - 2 抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、

d) 該試験サンプル中の H I V - 2 抗体の存在を示す、該 H I V - 2 抗原 / H I V - 2 抗体複合体を検出し、

e) 該試験サンプルを、請求項 1 に記載されたモノクローナル抗体と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、及び

f) 該試験サンプル中の H I V - 1 p 2 4 抗原および H I V - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの抗原の存在を示す該複合体を検出する工程を含んでなる前記方法。

#### 【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法であって、  
工程 b) が、

( i ) 生じた H I V - 1 抗原 / H I V - 1 抗体複合体に、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗原を含むコンジュゲートを、該コンジュゲートが該結合抗体に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え、及び

( i i ) 該シグナル生成化合物により生成された該試験サンプル中の H I V - 1 抗体の存在を示すシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうる H I V - 1 抗体を検出する工程を含み、

工程 d) が、

( i ) 生じた H I V - 2 抗原 / H I V - 2 抗体複合体に検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗原を含むコンジュゲートを、該コンジュゲートが該結合抗体に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え、及び

( i i ) 該シグナル生成化合物により生成された、該試験サンプル中の H I V - 2 抗体の存在を示すシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうる H I V - 2 抗体を検出する工程を含み、

工程 f) が、

( i ) 生じた抗体 / 抗原複合体に、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗体を含むコンジュゲートを、該コンジュゲートが該結合抗原に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え、

( i i ) 該シグナル生成化合物により生成された、該試験サンプル中の H I V - 1 p 2 4 抗原および H I V - 2 p 2 6 抗原よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの抗原の存在を示すシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうる抗原の存在を検出する工程を含んでなる前記方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) の検出において使用しうる新規モノクローナル抗体に関する。これらの抗体は、並外れて高い感度、著しく広い範囲の特異性を示し、新規共有非交差反応性エピトープに結合する。特に、本発明のモノクローナル抗体は、患者のサンプル中の H I V - 1 抗原および H I V - 2 コア抗原を検出するために使用することができる。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

10

20

30

40

50

後天性免疫不全症候群（エイズ（AIDS））は、HIV感染個体から性的接触により又はHIVに汚染された血液もしくは血液製剤への曝露により伝染する不治の感染症である。HIV-1は、以前はヒトT細胞リンパ球向性ウイルス3型（HTLV-III）、リンパ節疾患随伴ウイルス（LAV）およびエイズ関連レトロウイルス（ARV）と呼ばれていたウイルスを含む。HIVは、形態学的特徴、ゲノムおよびヌクレオチド配列に基づけば細胞変性レトロウイルスの一群（すなわち、レンチウイルス属）に関連したレトロウイルスである（Gondar, Science (1985) 277: 177-179; Stephan, Science (1986) 231: 589-594; Korb, B. (編)ら, Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory (Los Alamos, New Mexico) 発行; 総説としては、Schochetman, G. および George, J. R., (1994) AIDS Testing. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg)。HIVは、いくつかの構造タンパク質を含有する包膜ウイルスである。特に重要なのは、該ウイルスのコアが、pol前駆体およびgag前駆体（Pr55gag）へと切断される高度にプロセシングされたgag-polポリタンパク質前駆体（Pr180gag-pol）からの切断産物の縮合により形成されることである。ついでコア前駆体Pr55gagは、p17（ミリスチル化gagタンパク質）、p24（主要構造タンパク質）、p7（核酸結合タンパク質）およびp9（プロリンリッチタンパク質）へと切断される。該エンベロープは、エンベロープポリタンパク質前駆体gp160の切断産物である2つの構造タンパク質gp120（エンベロープ糖タンパク質）およびgp41（膜貫通タンパク質）を含有する。

#### 【0003】

HIV感染の最も一般的なマーカーは、ウイルス構造タンパク質に対する抗体（Dawson, J. Infect. Dis. (1988) 157: 149-155; Montagnier, Virology (1985) 144: 283-289; Barin, Science (1985) 228: 1094-1096; Schulz, T. F. ー, Lancet (1986) 2: 111-112; Sarngadharan, Science (1984) 224: 506-508; Allan, Science (1985) 228: 1091-1093）、および検出可能なウイルスコア抗原の形態のウイルス血症（抗原血症）（Kessler, JAMA (1987) 258: 1196-1199; Phair, JAMA (1987) 258: p1218; Allain, The Lancet (1986) ii: 1233-1236; Kenny, The Lancet (1987) 1(8532): 565-566; Wall, The Lancet (1987) 1(8532): p566; Stute, The Lancet (1987) 1(8532): p566; Goudsmit, The Lancet (1986) ii: 177-180; von Sydow, Brit. Med. J. (1988) 296: 238-240; Bowen, Ann. of Int. Med. (1988) 108: 46-48）または検出可能なウイルス核酸（Mellors, Science (1996) 272: 1167-1170; Saag, Nat. Med. (1996) 2: 625-629; Mulder, J. Clin. Microbiol. (1994) 32: 292-300; Zhang, AIDS (1991) 5(6): 675-681; Simmonds, J. Virology (1990) 64(2): 864-872）である。例えば、米国においては、抗体または抗原を検出するための試験による血液および血液製剤のスクリーニングが要求される（Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. §§301以下参照, Public Health Service Act 42 U.S.C. §§21以下参照）。最近、HIV血清転換ウィンドウの最大減少を得るた

10

20

30

40

50

めにために、核酸試験が実施されている(www.fda.gov)。さらなる具体例として、核酸試験の欧州における実施に加えて、欧州諸国は、抗体および抗原を同時に検出する試験を評価し使用することを開始している(Lyら, J. Clin. Microbiol. (2000) 38(6): 2459-2461; Gurtlerら, J. Virol. Methods (1988) 75: 27-38; Weberら, J. Clin. Microbiol. (1998) 36(8): 2235-2239; Couroucéら, La Gazette de la Transfusion (1999) N155-Mars-Avril, Van Binsbergenら, J. Virol. Methods (1999) 82: 77-84)。抗体および抗原の検出を組合せた血清学的アッセイは、抗体のみを検出するアッセイより優れた血清転換感度を示す。なぜなら、抗体より前に出現する抗原の検出は血清転換ウィンドウを減少させるからである。初期形態のHIV組合せアッセイは、Gallardaら, 1992, WO93/21346, Assay for Detection of HIV Antigen and Antibodyに記載されている。

#### 【0004】

HIV感染後数週間以内に、個体は、一般には、広範なウイルス血症および急性症状により特定される臨床期に入る。この期間中、血清転換の前に、血清または血漿試料においてHIV p24コア抗原が一時的に検出されうる(抗原血症)(Devareら (1990) In, Human Immunodeficiency Virus: Innovative Techniques. Monograph in Virology, J. L. Melnick(編), Basel, Karger, vol. 18: 105-121; Kesslerら, JAMA (1987) 258: 1196-1199; Phair, J. P., JAMA (1987) 258: p1218; Allainら, The Lancet (1986) ii: 1233-1236; Kennyら, The Lancet (1987) 1(8532): 565-566; Wallら, The Lancet (1987) 1(8532): 566; Stute, R., The Lancet (1987) 1(8532): 566; Goudsmitら, The Lancet (1986) ii: 177-180; von Sydowら, Brit. Med. J. (1988) 296: 238-240; Bowenら, Ann. of Int. Med. (1988) 108: 46-48)。血清転換後、該コアタンパク質は、循環中の免疫複合体内の抗体により拘束されるらしく、コアタンパク質の検出を困難にし、免疫複合体破壊技術を要する(Schupbachら, AIDS (1996) 10: 1085-1090; Kageyamaら, J. Virol. Methods (1988) 22: 125-131; Mathiesenら, J. Virol. Methods (1988) 22: 143-148; Steindlら, J. Immunol. Methods (1998) 217: 143-151; Eulerら, Clin. Exp. Immunol. (1985) 59: 267-275; Guptaら, New Eng. J. Med. (1984) 310: 1530-1531; Griffithら, J. Clin. Microbiol. (1995) 33: 1348-1350)。該初期ウイルス血症期の後および該疾患の残りの期間を通じて、該ウイルスは一般には定常状態レベルを確立する(Coffin

#### 【0005】

HIV-1 O群、HIV-1 M群およびHIV-2の分離体からのコアタンパク質は抗原性において類似している。なぜなら、それらはアミノ酸配列の相同性領域を共有しているからである。1つの群または型のコアタンパク質に対して惹起されたヒト(またはマウス)免疫ポリクローナル血清(すなわち、免疫グロブリン)は、異なる群または型のコアタンパク質に対して交差反応する(Clavelら, Science (1986) 233: 343-346; Guyaderら, Nature (1987) 326: 662-669; Barinら, Lancet (1985) 2: 1387-1389; Ka

10

20

30

40

50

nkiら, Science (1986) 232: 238 - 243; Kankiら, Science (1987) 236: 827 - 831; Clavelら, Nature (1986) 324: 691 - 695; Huntら, AIDS Res. Human Retroviruses (1997) 13: 995 - 1005; Gurtlerら, J. Virol. Methods (1995) 51: 177 - 184; Maucclere, P. AIDS (1997) 11: 445 - 453)。しかし、ヒト(またはマウス)免疫ポリクローナル血清とは対照的に、1つのHIV群または型のコアタンパク質に対して産生または惹起されたマウスまたはヒトモノクローナル抗体は、異なるHIV群または型のコアタンパク質に対して反応しうる(Mehtraら, 米国特許第5, 173, 399号; Butmanら, 米国特許第5, 210, 181号; Butmanら, 米国特許第5, 514, 541号)または反応し得ない(Mehtraら, 米国特許第5, 173, 399号; Butmanら, 米国特許第5, 210, 181号; Butmanら, 米国特許第5, 514, 541号)。しかし、しばしば、マウスモノクローナル抗体の交差反応性も共有反応性も(Tijssen, 1993 In, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. R. H. BurdonおよびP. H. van Knippenberg編, vol. 15. Elsevier, Amsterdam)考慮も教示もされていない(Kortrightら, 米国特許第4, 888, 290号; Kortrightら, 米国特許第4, 886, 742号)。HIV-1およびHIV-2コアタンパク質が同時に検出された際には(Butmanら, 米国特許第5, 210, 181号; Butman, 米国特許第5, 514, 541号)、少なくとも3つのモノクローナル抗体の組合せが必要であったうえ、HIV-1コアタンパク質に対する得られた定量的感度は、HIV-2コアタンパク質に対するものより遥かに大きかった。このことは、該モノクローナル抗体が交差反応性エピトープを同定し、共有エピトープを同定しなかったことを示している。典型的には、モノクローナル抗体は、免疫抗原(エピトープ)または共有エピトープに対する親和性より低い親和性を交差反応性抗原(エピトープ)に対して示し(Karush, F. (1978) In, Comprehensive Immunology, R. A. Good, S. B. Day編, 5: 85 - 116. New York/London: Plenum; Mariuzzaら, Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139 - 159; Tijssen, (1993) In, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. R. H. BurdonおよびP. H. van Knippenberg編, Vol. 15. Elsevier, Amsterdam)、該交差反応性抗原に対しては、感度が低い。

#### 【0006】

共有エピトープは、特に関連しているが異なる配列のタンパク質中では容易には同定されない。エピトープ中の単一のアミノ酸変化は、そのエピトープへのモノクローナル抗体の結合を阻止または修飾しうる(Mariuzzaら, Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139 - 159)。また、タンパク質中では、該エピトープ以外の部位におけるアミノ酸の変化(または相違)は、タンパク質のフォールディング(折りたたみ)の変化により該エピトープを変化させて(Mariuzzaら, Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139 - 159; Laverら, Cell (1990) 61: 553 - 556)、該エピトープへの抗体の結合を改変しうる。この点において、HIV-1 M群、HIV-1 O群およびHIV-2のコアタンパク質は関連しているが同一ではなく(Korber, 前掲)、HIVコアタンパク質間には交差反応性エピトープが存在することは公知だが、共有エピトープが存在することは確認も教示もされていない。

#### 【0007】

多数の科学文献が可変性のメカニズムに関する説明を与えようと努めているが(Meyerhansら, Cell (1989) 58: 901 - 910; Wain-Hobso

10

20

30

40

50

n, Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1992) 176: 181-193; Hollandら, Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1992) 176: 1-20; Gao, F.ら, Nature (1999) 397: 436-441; Sharpら, Biol. Bull. (1999) 196: 338-342; Robertsonら, Nature (1995) 374: 124-126; Zhu, J. Virology (1995) 69: 1324-1327)、HIVの広範な遺伝的(したがって抗原性)可変性は予測されていない。HIVの遺伝的(したがって抗原性)可変性の決定は、後にHIVの核酸およびアミノ酸配列の変異に基づく系統学的分類につながった多数の実験的観察に基づいているに過ぎない(Korber, 前掲)。同様に、HIV(コア)タンパク質間の共有エピトープを予測することはできない。なぜなら、(a)まず、コアタンパク質配列が発見されなければならず、(b)発見されたら、遺伝的変異が、共有エピトープの同定に更なる複雑性および不確実さを与え、(c)交差反応性エピトープを共有エピトープから区別するためには、エピトープの発見および特徴づけが要求されるからである。HIV-1 M群、HIV-1 O群およびHIV-2間の共有エピトープは、1994年にHIV-1 O群が発見されて初めて決定された(Gurtlerら, J. Virology (1994) 68: 1581-1585; Haeseveldeら, J. Virology (1994) 68: 1586-1596; Charneauら, Virology (1994) 205: 247-253)。

#### 【0008】

可変性HIVコアタンパク質の同等の定量的検出のためのモノクローナル抗体の親和性の役割は一般的には教示されていない(Mehtraら, 米国特許第5,173,399号; Gallardaら, WO93/21346; Zolla-Paznerら, 米国特許第5,731,189号; Mestanzaら, EP 0519866A1; Butmanら, 米国特許第5,210,181号; Butmanら, 米国特許第5,514,541号; Kortrightら, 米国特許第4,888,290号; Kortrightら, 米国特許第4,886,742号)。タンパク質抗原に対して惹起されたモノクローナル抗体の平均親和性は $4.5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$ である(Mariuzzara, Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139-159; Karush, F. (1978) In, Comprehensive Immunology, R. A. Good, S. B. Day 編, 5: 85-116. New York/London: Plenum)。さらに、共有エピトープに対するモノクローナル抗体を得る可能性を高めるための免疫方法は教示されていない。

#### 【0009】

モノクローナル抗体の予測不可能な2つの特徴(すなわち、親和性および共有反応性)を組合せることによってのみ、関連しているが同一ではない同等量のHIVコアタンパク質を検出するために使用しうるモノクローナル抗体を得ることを理論的に予想することが可能である。モノクローナル抗体の単なる交差反応性は、HIVコアタンパク質の同等な定量的検出を達成するには不十分であると考えられる。それよりむしろ、所望の結果を得るためには共有反応性と高い親和性との組合せが要求される。関連コアタンパク質に対するモノクローナル抗体の親和性は、免疫コアタンパク質で測定されたものより実質的に低い。その場合、該エピトープは、十中八九、交差反応性であり、該交差反応性エピトープに対する該抗体の親和性は、診断的に関連した(すなわち、25 pg p24/ml血清または血漿、Courouceら, La Gazette de la Transfusion (1999) N 155-Mars-Avril)濃度の該交差反応性コアタンパク質の検出のための該抗体の利用を著しく制限する。

#### 【0010】

現在のところ、HIV-1 M群、HIV-1 O群およびHIV-2コアタンパク質の同等の定量的検出を達成するために2つのモノクローナル抗体のみを使用するイムノアッセイの公知の記載はない。したがって、そのようなイムノアッセイは、明らかに、望ましい。ポリクローナル血清(免疫グロブリン)と組合せられた2以上のモノクローナル抗体

10

20

30

40

50

は、H I V - 1 コアタンパク質を又は同時にH I V - 1 およびH I V - 2 コアタンパク質を検出するためのイムノアッセイの基礎となる (M e h t a ら, 米国特許第 5 , 1 7 3 , 3 9 9 号; B u t m a n ら, 米国特許第 5 , 2 1 0 , 1 8 1 号; B u t m a n ら, 米国特許第 5 , 5 1 4 , 5 4 1 号; K o r t r i g h t ら, 米国特許第 4 , 8 8 8 , 2 9 0 号; K o r t r i g h t ら, 米国特許第 4 , 8 8 6 , 7 4 2 号; G a l l a r d a ら, W O 9 3 / 2 1 3 4 6 ) 。したがって、前記を考慮すると、先行文献は、( a ) H I V - 1 M 群およびH I V - 2 コアタンパク質の同等の定量的検出のための2つのモノクローナル抗体に限定されたイムノアッセイを記載も教示もしておらず、( b ) H I V - 1 M 群、H I V - 1 O 群およびH I V - 2 コアタンパク質の同等の定量的検出のための2つのモノクローナル抗体に限定されたイムノアッセイを記載も教示もしておらず、( c ) H I V - 1 M、O 群およびH I V コアタンパク質の非同等検出を招く交差反応性抗原を認識するモノクローナル親和性障壁を克服するための方法を教示しておらず、( d ) H I V - 1 M 群、H I V - 2 O 群およびH I V - 2 からの診断的に関連した及び同等の量の非同ーコアタンパク質を検出するための方法および手段としての、共有エピトープに対する高親和性モノクローナル抗体を教示していない。

10

## 【 0 0 1 1 】

本明細書に言及されているすべての米国特許、特許出願および刊行物の全体を、参照により本明細書に組み入れることとする。

## 【 発明の開示 】

## 【 0 0 1 2 】

20

## ( 発明の概要 )

本発明は、モノクローナル抗体、ならびに血清、血漿または他の体液中の後天性免疫不全症候群 ( エイズ ) の原因因子であるヒト免疫不全ウイルス 1 型 ( M および O 群 ) および 2 型の検出においてこれらの抗体を使用する方法に関する。特に、本発明は、同等量の H I V - 1 コアタンパク質 ( p 2 4 ) および H I V - 2 コアタンパク質 ( p 2 6 ) を検出するために、非交差反応性共有エピトープを同定する適合性で高親和性の特有のマウスモノクローナル抗体を使用する診断方法を含む。また、そのような抗体は、H I V 抗原を検出するアッセイにおいて及びH I V 抗原とH I V 抗体とを同時に検出する組合せアッセイにおいて使用することができる。本発明の好ましい実施形態においては、H I V - 1 M 群、H I V - 1 O 群およびH I V - 2 からの同等量のコアタンパク質を検出するためには、2つの相補的な高親和性で広特異的なマウスモノクローナル抗体が必要である。

30

## 【 0 0 1 3 】

本発明のモノクローナル抗体は、診断に関連したフェムトモル量のH I V コアタンパク質を検出するのに十分な高い親和性 ( K e q 値 ) を有するが、それらは、H I V - 1 M 群、H I V - 1 O 群およびH I V - 2 からの関連しているが同一でない同等量のコアタンパク質の検出のための広い特異性 ( すなわち、共有反応性 ) をも有する。

## 【 0 0 1 4 】

特に、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス - 1 O およびM群タンパク質 p 2 4 ならびにヒト免疫不全ウイルス - 2 タンパク質 p 2 6 に特異的に結合するモノクローナル抗体を含む。これらのモノクローナル抗体は、例えば、1 2 0 A - 2 7 0、1 1 5 B - 1 5 1、1 0 3 - 3 5 0、1 1 5 B - 3 0 3、1 1 7 - 2 8 9 および 1 0 8 - 3 9 4 である。本発明はまた、これらの抗体を産生するハイブリドーマを含む。

40

## 【 0 0 1 5 】

さらに、本発明はまた、H I V - 1 抗原およびH I V - 2 抗原よりなる群から選ばれる1以上の抗原の、該抗原の1以上を含有する疑いのある試験サンプル中の存在を検出するための方法を含む。該方法は、a) 該試験サンプルを、ヒト免疫不全ウイルス - 1 タンパク質 p 2 4 およびヒト免疫不全ウイルス - 2 タンパク質 p 2 6 上の共有エピトープに特異的に結合する少なくとも1つのモノクローナル抗体 ( 例えば、1 2 0 A - 2 7 0 ) と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、b) 該複合体を検出する工程を含んでなり、該複合体の存在が、該試験サンプル中のH I V - 1 抗原およびH

50



ＩＶ－２抗原よりなる群から選ばれる少なくとも１つの抗原の存在を示すことを特徴とする。工程（ａ）のモノクローナル抗体は、例えば、本明細書に記載のモノクローナル抗体の任意のものでありうる。それは標識されていても標識されていなくてもよい。好ましくは、１つのモノクローナル抗体のみを、該試験サンプルと接触させる。

【００１６】

本発明はまた、ＨＩＶ－１抗原およびＨＩＶ－２抗原よりなる群から選ばれる１以上の抗原の、該抗原の１以上を含有する疑いのある試験サンプル中の存在を同時に検出するための方法を含む。該方法は、ａ）該試験サンプルを、ヒト免疫不全ウイルス－１タンパク質２４およびヒト免疫不全ウイルス－２タンパク質ｐ２６に特異的に結合する少なくとも１つのモノクローナル抗体と、抗体／抗原複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、ｂ）生じた抗体／抗原複合体にコンジュゲート（共役体）を、該コンジュゲートが該結合抗原に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え（ここで、該コンジュゲートは、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗体を含む）、ｃ）該シグナル生成化合物により生成されたシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうる抗原の存在を検出する工程を含んでなり、該シグナルの存在が、該試験サンプル中のＨＩＶ－１抗原およびＨＩＶ－２抗原よりなる群から選ばれる少なくとも１つの抗原の存在を示すことを特徴とする。工程（ａ）の少なくとも１つのモノクローナル抗体は、例えば、１２０Ａ－２７０、１１５Ｂ－１５１、１１７－２８９、１０３－３５０、１０８－３９４または１１５Ｂ－３０３でありうる。好ましくは、１つのモノクローナル抗体、特に１２０Ａ－２７０を使用する。該コンジュゲートの工程（ｂ）の抗体は、例えば、１２０Ａ－２７０、１１５Ｂ－１５１、１１７－２８９、１０３－３５０、１０８－３９４または１１５Ｂ－３０３であることが可能であり、好ましくは、１１５Ｂ－１５１である。好ましくは、モノクローナル抗体１２０Ａ－２７０（または１１７－２８９）およびモノクローナル抗体１１５Ｂ－１５１は、１２０Ａ－２７０（または１１７－２８９）が該固相上に存在するか該コンジュゲート中に存在するか又は１１５Ｂ－１５１が固相上に存在するか該コンジュゲート中に存在するかにかかわらず、ペアとして使用する。

【００１７】

さらに、本発明はまた、ＨＩＶ－１抗原およびＨＩＶ－２抗原よりなる群から選ばれる１以上の抗原の、これらの抗原の１以上を含有する疑いのある試験サンプル中の存在を検出するための方法を含む。該方法は、（ａ）１）固体支持体に結合した、ＨＩＶ－１ ｐ２４抗原およびＨＩＶ－２ ｐ２６抗原に特異的に結合する少なくとも１つのモノクローナル抗体、２）該試験サンプル、および３）シグナル生成化合物が結合しているＨＩＶ－１抗原およびＨＩＶ－２抗原に特異的に結合する抗体を含む指示試薬を同時に接触させて、混合物を形成させ、（ｂ）該混合物を、抗体／抗原／抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートし、（ｃ）該シグナル生成化合物により生成された測定可能なシグナルの存在を検出する工程を含んでなり、該シグナルの存在が、該試験サンプル中のＨＩＶ－１抗原およびＨＩＶ－２抗原よりなる群から選ばれる１以上の抗原の存在を示すことを特徴とする。工程（ａ）の少なくとも１つのモノクローナル抗体は、例えば、１２０Ａ－２７０、１１５Ｂ－１５１、１１７－２８９、１０８－３９４、１１５Ｂ－３０３または１０３－３５０であることが可能であり、好ましくは、１２０Ａ－２７０である。工程（ｂ）のコンジュゲートの抗体は、例えば、１２０Ａ－２７０、１１５Ｂ－１５１、１１７－２８９、１０８－３９４、１１５Ｂ－３０３または１０３－３５０であることが可能であり、好ましくは、１１５Ｂ－１５１である。この場合も、本発明の任意の１以上のモノクローナル抗体は該固相上で、本発明の任意の他のモノクローナル抗体（該コンジュゲートまたは液相中）と共に使用されうることに注目することが重要である。モノクローナル抗体の或るペアが好ましいが、該固相上に１つのモノクローナル抗体のみを存在させるのが好ましい。

【００１８】

本発明はまた、試験サンプル中のＨＩＶ－１抗原およびＨＩＶ－２抗原よりなる群から

選ばれる 1 以上の抗原の存在を測定するためのキットであって、a) ヒト免疫不全ウイルス - 1 タンパク質 p 2 4 およびヒト免疫不全ウイルス - 2 タンパク質 p 2 6 に特異的に結合する少なくとも 1 つのモノクローナル抗体と、(b) 検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗体を含むコンジュゲートとを含んでなるキットを含む。工程 (a) の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体は、例えば、1 2 0 A - 2 7 0、1 1 5 B - 1 5 1、1 1 7 - 2 8 9、1 0 8 - 3 9 4、1 1 5 B - 3 0 3 または 1 0 3 - 3 5 0 であることが可能であり、好ましくは、1 2 0 A - 2 7 0 である。工程 (b) の抗体は、例えば、1 2 0 A - 2 7 0、1 1 5 B - 1 5 1、1 1 7 - 2 8 9、1 0 8 - 3 9 4、1 1 5 B - 3 0 3 または 1 0 3 - 3 5 0 であることが可能であり、好ましくは、1 1 5 B - 1 5 1 である。

10

**【0019】**

本発明はまた、1 2 0 A - 2 7 0、1 1 5 B - 1 5 1、1 1 7 - 2 8 9、1 0 3 - 3 5 0、1 0 8 - 3 9 4 および 1 1 5 B - 3 0 3 よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を含んでなる診断試薬を含む。

**【0020】**

また、本発明は、配列番号 1 ~ 6 に示すアミノ酸配列を有する単離されたエピトープまたはペプチドを含む。

**【0021】**

本発明はまた、患者のサンプル中の HIV - 1 および/または HIV - 2 に対する抗体および抗原の両方を同時に検出する方法を含む。1 つのそのような方法は、1) HIV - 1 抗体および HIV - 2 抗体よりなる群から選ばれる 1 以上の抗体、ならびに 2) HIV - 1 抗原および HIV - 2 抗原よりなる群から選ばれる 1 以上の抗原を、該抗体の 1 以上および該抗原の 1 以上を含有する疑いのある試験サンプル中で検出することを含み、a) 該試験サンプルを、HIV - 1 抗体に結合する少なくとも 1 つの HIV - 1 抗原と、HIV - 1 抗原 / HIV - 1 抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、b) 該 HIV - 1 抗原 / HIV - 1 抗体複合体を検出し (該複合体の存在は、該試験サンプル中の HIV - 1 抗体の存在を示す)、c) 該試験サンプルを、HIV - 2 抗体に結合する少なくとも 1 つの HIV - 2 抗原と、HIV - 2 抗原 / HIV - 2 抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、d) 該 HIV - 2 抗原 / HIV - 2 抗体複合体を検出し (該複合体の存在は、該試験サンプル中の HIV - 2 抗体の存在を示す)、e) 該試験サンプルを、ヒト免疫不全ウイルス - 1 タンパク質 p 2 4 およびヒト免疫不全ウイルス - 2 タンパク質 p 2 6 に特異的に結合する少なくとも 1 つのモノクローナル抗体と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、f) 該複合体を検出する (該複合体の存在は、該試験サンプル中の HIV - 1 抗原および HIV - 2 抗原よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの抗原の存在を示す) 工程を含んでなる。この場合も、HIV - 1 および HIV - 2 抗原検出 (例えば、1 2 0 A - 2 7 0 および 1 1 5 B - 1 5 1) に関してモノクローナル抗体の或るペアを使用することが好ましい。

20

30

**【0022】**

本発明に含まれるもう 1 つの方法は、1) HIV - 1 抗体および HIV - 2 抗体よりなる群から選ばれる 1 以上の抗体、ならびに 2) HIV - 1 抗原および HIV - 2 抗原よりなる群から選ばれる 1 以上の抗原を、該抗体の 1 以上および該抗原の 1 以上を含有する疑いのある試験サンプル中で検出することを含み、a) 該試験サンプルを、HIV - 1 抗体に結合する少なくとも 1 つの HIV - 1 抗原と、HIV - 1 抗原 / HIV - 1 抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、b) 生じた HIV - 1 抗原 / HIV - 1 抗体複合体にコンジュゲート (共役体) を、該コンジュゲートが該結合抗体に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え (ここで、該コンジュゲートは、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗原を含む)、c) 該シグナル生成化合物により生成されたシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうる HIV - 1 抗体を検出し (該シグナルの存在は、該試験サンプル中の HIV - 1 抗体の存在を示す)、d) 該試験サンプルを、HIV - 2 抗体に結合する少なくと

40

50

も1つのH I V - 2抗原と、H I V - 2抗原/H I V - 2抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、e)生じたH I V - 2抗原/H I V - 2抗体複合体にコンジュゲート(共役体)を、該コンジュゲートが該結合抗体に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え(ここで、該コンジュゲートは、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗原を含む)、f)該シグナル生成化合物により生成されたシグナルを検出することにより、該試験サンプル中に存在しうるH I V - 2抗体を検出し(該シグナルの存在は、該試験サンプル中のH I V - 2抗体の存在を示す)、g)該試験サンプルを、ヒト免疫不全ウイルス-1タンパク質24およびヒト免疫不全ウイルス-2タンパク質p26に特異的に結合する少なくとも1つのモノクローナル抗体と、抗体/抗原複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、h)生じた抗原/抗体複合体にコンジュゲート(共役体)を、該コンジュゲートが該結合抗原に結合するのを可能にするのに十分な時間にわたり及び条件下で加え(ここで、該コンジュゲートは、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した抗体を含む)、i)該シグナル生成化合物により生成されたシグナルを検出することにより、該サンプル中に存在しうる抗原の存在を検出する(該シグナルの存在は、該試験サンプル中のH I V - 1抗原およびH I V - 2抗原よりなる群から選ばれる少なくとも1つの抗原の存在を示す)工程を含んでなる。この場合も、該アッセイにおいて使用しうるモノクローナル抗体の好ましいペアは前記のとおりであるが、他のペアを使用することも可能である。

【0023】

(発明の詳細な記載)

本発明は、H I V - 1タンパク質p24およびH I V - 2タンパク質p26に対する新規モノクローナル抗体、これらのモノクローナル抗体を使用するための方法、ならびにこれらの抗体を含有するキットに関する。より詳しくは、本発明は、本発明において120A-270(例えば、クローン108)、115B-151(例えば、クローン423)および117-289(例えば、クローン555)と称されるモノクローナル抗体に関する。また、本発明は、本発明において103-350(例えば、クローン474)、108-394(例えば、クローン470)および115B-303(例えば、クローン620)と称されるモノクローナル抗体を含む。

【0024】

本発明は、前記のモノクローナル抗体を含むだけでなく、これらの抗体を産生する新規ハイブリドーマ細胞株をも含む。より詳しくは、細胞株はモノクローナル抗体120A-270を産生し、細胞株PTA-2809はモノクローナル抗体115B-151を産生し、細胞株PTA-2806はモノクローナル抗体117-289を産生し、細胞株PTA-2808はモノクローナル抗体103-350を産生し、細胞株PTA-2807はモノクローナル抗体108-394を産生し、細胞株PTA-2810はモノクローナル抗体115B-303を産生する。モノクローナル抗体120A-270を産生する細胞株以外の抗体産生細胞株は、American Type Culture Collection(ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110にブダペスト条約の条項に基づき2000年12月13日付けで寄託されており、前記のATCC番号が付与されている。

【0025】

本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントは、H I V - 1(MおよびO群)およびH I V - 2の同時検出のためのイムノアッセイにおいて使用することができる(本発明の目的においては、「フラグメント」は、結合特性に関して完全抗体と機能的に同様に反応するモノクローナル抗体のサブユニットと定義される)。特に、イムノアッセイ(例えば、サンドイッチアッセイ)においてモノクローナル抗体120A-270および115B-151またはモノクローナル抗体117-289および115B-151を組合せて使用する場合には、少なくとも、患者のサンプル中のH I V - 1 MおよびO群のサブタイプA、B、C、D、E、F、GおよびOからのコア抗原(p24)ならびにH I V - 2コア抗原(p26)を検出することが可能である。実際のところ、前記のモノクロー

ナル抗体の組合せを用いて、25ピコグラム未満（すなわち、ピコグラムコア抗原 / ml 血清または血漿）の量のHIV-1 p24抗原およびHIV-2 p26抗原を検出することができる。したがって、本発明のモノクローナル抗体は高い感度および広い特異性を有する。特に、これらの抗体の特有の特性は、それらが、ほぼ同等の親和性（すなわち、同等の定量的感度）を有する関連しているが同一ではないコア抗原を認識するというものであり、このことは、それらが、典型的な予想される交差反応性エピトープを認識して交差反応性を示すのではなく、予想不可能な共有エピトープを認識して共有反応性を示すことを示している（本発明の目的においては、「交差反応性」は、異なる抗原上の構造的に異なる決定基への抗体の結合性と定義される。交差反応性エピトープ（すなわち、抗原）に対する抗体親和性は、免疫原性エピトープ（すなわち、抗原）または共有エピトープに対するものより低い。「共有反応性」は、異なる抗原上の構造的に同一の決定基への抗体の結合性と定義される。共有エピトープに対する抗体親和性は、免疫原性エピトープ（すなわち、免疫原）に対する親和性と同等である）。また、モノクローナル抗体のペアが適合性であること、すなわち、該ペアの各モノクローナル抗体が、該コアタンパク質上の異なるエピトープまたは抗原決定基にマッピングされることに注目すべきである。該ペアの一方の抗体の結合は、該ペアの他方の抗体の結合を妨げない。

#### 【0026】

本発明の1つの実施形態（好ましい実施形態）においては、モノクローナル抗体120A-270またはそのフラグメントを固相（例えば、微粒子、マイクロタイターウェル、ビーズなど）上にコーティングするが、115B-151もしくは117-289またはそのフラグメントを使用することも可能である。ついで該試験サンプルを該モノクローナル抗体またはそのフラグメントと接触させると、該患者サンプル中にp24抗原またはp26抗原が存在すれば、抗体 / 抗原複合体が第1混合物として形成される（例えば、該患者がHIV-1およびHIV-2の両方を有する場合には、モノクローナル抗体 / p24抗原複合体およびモノクローナル抗体 / p26抗原複合体の両方が形成されうる）。ついで、(b)シグナル生成化合物に結合した(a)プローブ抗体、例えばモノクローナル抗体115B-151（これは、120-270が結合するエピトープとは異なるそれに適合性のエピトープに結合する）を含むコンジュゲートを加える。すると抗体 / 抗原 / 抗体プローブ複合体が第2混合物として形成される。ついで、生成したシグナルの存在を検出しそれにより該抗体 / 抗原 / 抗体プローブ複合体の存在を検出することにより、HIV-1および / またはHIV-2抗原を検出する。生成したシグナルは該サンプル中の抗原の量に比例するため、該試験サンプル中の抗原の量も計算することが可能である。

#### 【0027】

形成された複合体を検出するもう1つの方法は、シグナル生成化合物に結合した第3抗体を含むコンジュゲートを使用するものである。特に、前記の抗体 / 抗原 / 抗体複合体が形成されたら（すなわち、後者の抗体は未標識の第2抗体である）、溶液中の該「第2」未標識抗体に結合するコンジュゲートを加えることが可能である。該コンジュゲートは、例えば、検出可能なシグナルを生成しうるシグナル生成化合物に結合した結合第2抗体（例えば、抗115B-151抗体、または該プローブ抗体に対する抗体）に結合しうる抗原または抗抗体を含みうる。したがって該シグナルの検出は、該サンプル中の該複合体、したがって該抗原の存在を示す。生成したシグナルは、実際に、該サンプル中に存在する抗原の量に比例する（例えば、米国特許第6,015,662号を参照されたい）。該アッセイの設計は、使用する抗体の親和性および特異性、得られる結果の精度、簡便さ、固相の性質などに左右される（種々の抗原アッセイ形態の考察には、米国特許第5,104,790号を参照されたい）。

#### 【0028】

また、該イムノアッセイにおいて使用した初期捕捉抗体は、該固相に共有結合または非共有結合（例えば、イオン結合、疎水結合など）されうることに注目すべきである。共有結合のための連結剤は当技術分野で公知であり、固相の一部であることが可能であり、あるいはコーティングの前にそれに誘導体化されうる。イムノアッセイにおいて使用する固

10

20

30

40

50

相の具体例としては、多孔性および非多孔性物質、ラテックス粒子、磁気粒子、微粒子、ビーズ、膜、マイクロタイタープレートおよびプラスチックチューブが挙げられる。所望により、固相物質、および該コンジュゲート中の抗原または抗体を標識する方法の選択は、所望のアッセイ形態の性能特性に応じて決定される。

#### 【 0 0 2 9 】

前記のとおり、該コンジュゲート（または指示試薬）は、シグナル生成化合物または標識に結合した抗体（または、該アッセイに応じて恐らくは抗抗体）を含む。このシグナル生成化合物または「標識」はそれ自体が検出可能であるか、または1以上の追加的化合物と反応して検出可能な産物を生成しうる。シグナル生成化合物の具体例には、色素原、放射性同位体（例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ および $^{14}\text{C}$ ）、化学発光性化合物（例えば、アクリジニウム）、粒子（可視性または蛍光性）、核酸、錯化剤または触媒、例えば酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼおよびリボヌクレアーゼ）が含まれる。酵素（例えば、アルカリホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ）を使用する場合には、色素原、蛍光原または発光原基質の添加は検出可能なシグナルの生成をもたらす。他の検出系、例えば、時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応）およびラマン分光も有用である。

#### 【 0 0 3 0 】

該モノクローナル抗体が使用されうるもう1つのタイプのアッセイは、1) 1つのモノクローナル抗体（固体支持体に結合しているもの）、2) 該試験サンプル、および3) シグナル生成化合物が結合しているモノクローナル抗体またはそのフラグメント（例えば、 $\text{HIV}-1$ および $\text{HIV}-2$ 抗原に特異的に結合する $115\text{B}-151$ ）を含む指示試薬を同時に接触させて、混合物を形成させる。ついで該混合物を、抗体/抗原/抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートする。該試験サンプル中に存在し該固相上に捕捉された $\text{HIV}-1$ および/または $\text{HIV}-2$ 抗原の存在は、実際にそれらが存在する場合には、該シグナル生成化合物により生成された測定可能なシグナルを検出することにより測定される。該試験サンプル中に存在する抗原の量は、生成したシグナルに比例する。このアッセイまたは前記のアッセイにおいては、本発明のモノクローナル抗体は、捕捉相として又は溶液中の指示試薬の一部として（すなわち、該試薬は抗体およびシグナル生成化合物を含む）使用することができる。そのような診断方法（前記および後記のものを含む）は当技術分野においてよく知られている（*Immunological Methods*, Vols. IおよびII, 1979および1981, LefkowitzおよびPernis編, Academic Press, New York; *Monoclonal Antibodies*, 1982, Kennettら編, Plenum Press, New York; ならびに*Handbook of Experimental Immunology*, 1978, Weir編, Blackwell Scientific Publications, St. Louis, MOを参照されたい）。

#### 【 0 0 3 1 】

本発明のモノクローナル抗体は、好ましくは、単一捕捉抗体として単独で、あるいは単一プローブおよび/または共役抗体として単独で使用しうることに注目すべきである。しかし、それらは前記アッセイにおいてペア（2つ組）またはトリオ（3つ組）で使用することも可能である。さらに、本発明のモノクローナル抗体（およびそのフラグメント）の組合せを、本発明のモノクローナル抗体のエピトープ特異性以外の $\text{HIV}-1$ および/または $\text{HIV}-2$ のエピトープに対する特異性を有する他のモノクローナル抗体と共に使用することができる。したがって、該モノクローナル抗体は、 $\text{HIV}-1$ および/または $\text{HIV}-2$ 抗体の混合物または「カクテル」中の成分として作用しうる。したがって、例えば、このカクテルは、 $\text{HIV}-1$ の $p24$ および $\text{HIV}-2$ の $p26$ を検出する本発明のモノクローナル抗体（例えば、 $120\text{A}-270$ ）、ならびに膜貫通タンパク質または細胞外糖タンパク質中の $\text{HIV}$ エンベロープ抗原決定基を検出するモノクローナル抗体を含

みうる。このように、１以上のウイルス（例えば、ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２）の種々のタンパク質からの幾つかの抗原決定基を同時に検出することが可能である。

【００３２】

また、本発明のモノクローナル抗体は、１）抗原、例えば前記のもの（例えば、p 2 4 および p 2 6）および２）ＨＩＶに対する抗体（例えば、エンベロープ抗原（例えば、ＨＩＶ－１ M および O 群 gp 4 1 ならびにＨＩＶ－２ gp 3 6）の使用による）を検出する組合せアッセイにおいて使用しうることに注目すべきである。本発明のモノクローナル抗体を使用する任意のそのような組合せアッセイが本発明の範囲内に含まれるとみなされる。

【００３３】

前記イムノアッセイにより試験されうる生物学的流体の具体例には、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、涙、鼻洗浄液、または組織および細胞の水溶性抽出物が含まれる。該試験サンプルはまた、不活性化全ウイルスまたは部分精製もしくは組換え p 2 4 もしくは p 2 6 抗原を含みうる。

【００３４】

前記モノクローナル抗体は、適当に標識された場合には、組換え的に誘導されたＨＩＶ－１ p 2 4 およびＨＩＶ－２ p 2 6 への結合に関する血清サンプル中のＨＩＶ－１および－２コア抗体に対する競合プローブとして使用しうることに注目すべきである。

【００３５】

また、本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントは、各モノクローナル抗体の適当な標識と共に固定細胞または固定組織を使用する検出系において使用することができる。特に、該組織サンプルを、本発明のモノクローナル抗体の１つに結合したシグナル生成化合物を含むコンジュゲートと接触させて、混合物を形成させる。ついで該混合物を、抗原／抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートする。該サンプル中に存在する抗原の存在を、生成したシグナルを検出することにより測定する。また、ＨＩＶ－１ p 2 4 抗原およびＨＩＶ－２ p 2 6 抗原を例えば親和性クロマトグラフィーにより精製するために、該抗体を使用することができる。

【００３６】

さらに、本発明の抗体をマトリックスに結合させ、例えば細胞培養または生物学的組織（例えば、血液および肝臓）からの特定のＨＩＶ－１および／またはＨＩＶ－２抗原の親和性精製のために使用することができる。例えば、該モノクローナル抗体を基質または支持体に結合させ、あるいは基質または支持体上に固定化することができる。ついで、該ＨＩＶ抗原決定基を含有する溶液を該固定化抗体に、該抗体と p 2 4 および p 2 6 決定基を含有するポリペプチドとの免疫複合体の形成に適した時間にわたり及び条件下で接触させる。未結合物質を該結合免疫複合体から分離する。ついで該複合体または抗原断片を該支持体から分離する。

【００３７】

本発明のモノクローナル抗体の１以上、好ましくは、前記で示唆されるペアが、キットの形態における使用に特に適している。該キットは、バイアルまたはボトルのような１以上の容器を含むことが可能であり、各容器は、モノクローナル抗体のペアまたはモノクローナル抗体のカクテルを含有しうる。これらのキットはまた、該アッセイを実施するために必要な他の試薬（例えば、洗浄液、加工および指示試薬）のバイアルまたは容器を含有しうる。

【００３８】

さらに、本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体の１以上と、ＨＩＶ感染個体に投与されうる医薬上許容されるアジュバント（例えば、フロイントアジュバント）とを含むワクチンを含む（すなわち、受動免疫）。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、未感染ハイリスク個体（例えば、医療従事者）への投与に予防的に働きうる。

【００３９】

本発明のモノクローナル抗体はまた、ＨＩＶタンパク質 p 2 4 および p 2 6 のエピトー

10

20

30

40

50

プマッピングのための研究手段として働きうることに注目すべきである。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、抗原決定基の標的化領域を含有するH I V臨床分離体のタンパク質およびタンパク質前駆体に結合するだけでなく、該抗体は、該抗原決定基を含有する組換えタンパク質および該タンパク質の合成類似体にも結合することに注目すべきである。したがって、例えば、本発明のモノクローナル抗体は、H I V - 1のp 2 4およびH I V - 2のp 2 6の組換えタンパク質および合成類似体が関わる結合実験において使用することができる。

#### 【 0 0 4 0 】

また、未標識の本発明の抗体を凝集アッセイにおいて使用することが可能であり、あるいは、免疫グロブリンに特異的な抗体のような該モノクローナル抗体と反応性である標識抗体と組合せて使用することが可能である。

10

#### 【 0 0 4 1 】

本発明はまた、H I V - 1および/またはH I V - 2に感染した哺乳動物を治療するための方法であって、すぐ後に説明する医薬組成物の形態の本発明のモノクローナル抗体の1以上の有効量を、そのような治療を要する哺乳動物に投与することを含んでなる前記方法を含む。医薬的に有効な量（有効量）は、該医薬組成物中に含まれている場合に、H I Vの複製を抑制して後天性免疫不全症候群（エイズ）を治療するのに有効である該化合物の任意の量であって、該対象に毒性となる量より低い量を意味する。

#### 【 0 0 4 2 】

また、本発明は、本発明のモノクローナル抗体の1以上と医薬上許容される担体とを含んでなる医薬組成物を含む。医薬担体は、1以上のモノクローナル抗体を患者に運搬するのに適した任意の適合性で無毒性の物質である。例えば、滅菌水、アルコール、脂肪、ろう及び不活性固体を担体として使用することができる。また、該組成物は、p 2 4および/またはp 2 6以外のH I Vのタンパク質または糖タンパク質に結合するモノクローナル抗体を含有しうる。さらに、該医薬組成物は、単独で又は他の抗レトロウイルス剤（M i t s u y aら、N a t u r e 3 2 5 : 7 7 3 - 7 7 8 ( 1 9 8 7 )を参照されたい）と共に投与することができる。本発明の医薬組成物は、経口的または非経口的（すなわち、皮下、筋肉内または静脈内）に投与することができる。

20

#### 【 0 0 4 3 】

さらに、本発明のモノクローナル抗体の1以上は、例えば治療用の又はアッセイ対照もしくは校正体としてのキメラ抗体を得るために使用しうることに注目すべきである。

30

#### 【 0 0 4 4 】

表5に記載のデータから明らかに示されるとおり、本発明のモノクローナル抗体のすべてはH I V - 1のp 2 4およびH I V - 2のp 2 6の両方に結合するため、例えば、該モノクローナル抗体の任意の1以上は、前記の診断アッセイ、キット、組成物および方法において使用することができる。明らかに、最強の結合特異性および能力（p 2 4およびp 2 6に対して）を有するものが好ましい。

#### 【 0 0 4 5 】

本発明は、以下の非限定的な実施例により例示されうる。

#### 【 実施例 1 】

40

#### 【 0 0 4 6 】

##### 免疫原の選択

該免疫方法は、H I V - 1 O群およびH I V - 1 M群抗原（これは、H I V - 1の両群のコア抗原中の両方の共有エピトープの認識へと免疫応答を導くためのものである）を含むものであった。動物宿主において抗H I V - 1 p 2 4応答を生成させるために、3つの異なるH I V - 1免疫原を種々の組合せで使用した。A b b o t t L a b o r a t o r i e s ( A b b o t t P a r k , I L )で製造された2つのH I V - 1 M群抗原は変性全ウイルス溶解物から誘導されたものであり、一方、天然H I V - 1 M群p 2 4 ( p 2 4 M )タンパク質は該ウイルス溶解物から精製されたものである。

#### 【 0 0 4 7 】

50

該第3免疫原は、HIV-1 O群分離体HAM112のgag遺伝子から誘導された組換えp24抗原(rp24-O)であった。HAM112からのp24遺伝子をラムダPLベクター中にクローニングし、大腸菌(E. coli)中で発現させた。該組換え抗原の構築、大規模化および精製は、大腸菌(E. coli)中で製造された組換えタンパク質に関する公開されている方法(Seetharam, R. および Sharma, S. K. (編), 1991. 'Purification and Analysis of Recombinant Proteins', Marcel Dekker, New York, NY.)に従い行った。公開されている結果に対する該アミノ酸配列の照合は該産物の完全性を証明した(Van den Haeseveldeら, 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. J. Viro. 68:1586)。

10

#### 【実施例2】

#### 【0048】

##### マウスの免疫

ハイブリドーマの発生に関して選択したモデル動物は、3つの系統のマウス、すなわち、CAF1、RBF/dnおよびBALB/cであった。該マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) から購入した6~8週齢の雌であった。高親和性を有するHIV-1 p24モノクローナル抗体を産生させるために、2つの異なる免疫方法を用いた。rp24-Oまたはp24-Mまたはrp24Oとp24Mとの両方の混合物で皮下(s.c.)または筋肉内(i.m.)に2回免疫したマウスから、抗p24モノクローナル抗体(Mab)103-350-474、108-394-470、115B-303-620、115B-151-423および117-289-555を分泌するハイブリドーマが産生された。該マウスを、親和性成熟のために4~12ヶ月間休養させ、融合の3日前に免疫原で脾臓内(i.s.)で追加免疫した。腹腔内(i.p.)投与と皮下投与とを交互に行って低用量の精製天然p24-Mで毎週、6回にわたり高度免疫化したBALB/cマウスからは、120A-270-108が産生された。

20

#### 【0049】

該免疫方法を以下に詳しく説明する。

30

#### 【0050】

ハイブリドーマ103-350-474は細胞融合体#103から製造した。第1日に、0.2mlのフロイント完全アジュバント(CFA)(Difco Laboratories, Detroit, MI)中の10ugのrp24O抗原をCAF1マウス#1555に皮下投与した。第56日に、0.2mlの不完全フロイントアジュバント(IFA)(Difco Laboratories, Detroit, MI)中の10ugのrp24O抗原を該マウスに筋肉内(i.m.)投与した。第74日に、間接酵素結合免疫アッセイ(EIA)による抗HIV-1抗体力価の評価のために該マウスから採血した。第186日に、正常食塩水中の25ugのHIV-1 M群ウイルスライセートで該マウスをi.s.で追加免疫した。

40

#### 【0051】

ハイブリドーマ108-394-470は細胞融合体#108から製造した。第1日に、0.2mlのCFA中の10ugのrp24-O抗原をCAF1マウス#1556にs.c.投与した。第56日に、0.2mlのIFA中の10ugのrp24O抗原を該マウスにi.m.投与した。第74日に、間接EIAによる抗HIV-1抗体力価の評価のために該マウスから採血した。第270日に、正常食塩水中の45ugの精製天然HIV-1 M群p24で該マウスをi.s.で追加免疫した。

#### 【0052】

ハイブリドーマ115B-151-423および115B-303-620は細胞融合

50



体 # 1 1 5 B から製造した。第 1 日に、0 . 2 m l の C F A 中の 1 0 u g の r p 2 4 O 抗原を C A F 1 マウス # 1 5 6 3 に s . c . 投与した。第 2 1 0 日に、0 . 2 m l の I F A 中の 1 0 u g の r p 2 4 O と 1 0 u g の p 2 4 M との混合物を該マウスに s . c . 投与した。第 2 3 5 日に、間接 E I A による抗 H I V - 1 抗体力価の評価のために該マウスから採血した。第 3 7 5 日に、正常食塩水中の 1 0 u g の r p 2 4 O と 1 0 u g の p 2 4 M との混合物で該マウスを i . s . で追加免疫した。

【 0 0 5 3 】

ハイブリドーマ 1 1 7 - 2 8 9 - 5 5 5 は細胞融合体 # 1 1 7 から製造した。第 1 日に、0 . 2 m l の C F A 中の 1 0 u g の r p 2 4 O 抗原を R B f / d n マウス # 1 5 4 5 に s . c . 投与した。第 5 6 日に、0 . 2 m l の I F A 中の 1 0 u g の r p 2 4 O の混合物を該マウスに i . m . 投与した。第 7 4 日に、間接 E I A による抗 H I V - 1 抗体力価の評価のために該マウスから採血した。第 3 9 2 日に、正常食塩水中の 4 5 u g の r p 2 4 O と精製天然 p 2 4 M との混合物で該マウスを i . s . で追加免疫した。

【 0 0 5 4 】

ハイブリドーマ 1 2 0 A - 2 7 0 - 1 0 8 は、1 0 u g の精製天然 p 2 4 M 抗原と 4 u g のエス・ティフィムリウム ( S . t y p h i m u r i u m ) 抽出物 ( R I B I I m m u n o c h e m i c a l s , R i B i I m m u n o C h e m R e s e a r c h , H a m i l t o n , M o n t a n a ) とを含有する 0 . 2 m l の免疫原を第 1 日に i . p . で、第 7 日に s . c . で及び第 1 4 日に i . p . で投与した高度免疫化 B A L B / c マウス # 7 の細胞融合体 # 1 2 0 A から製造した。第 2 1 日に、間接 E I A による抗 H I V - 1 p 2 4 抗体力価の評価のために該マウスから採血した。第 2 8 、3 5 および 4 2 日に、それぞれ s . c . 、i . p . および s . c . で 0 . 2 m l の R I B I アジュバント中の 5 u g の精製天然 p 2 4 M 抗原を該マウスに投与した。第 4 9 日に、間接 E I A による抗 H I V - 1 抗体力価の評価のために該マウスから再度採血した。第 7 7 日 ( 融合の 3 日前 ) に、正常食塩水中の 5 0 u g の精製天然 p 2 4 M 抗原で該マウスを i . s . で追加免疫した。

【 実施例 3 】

【 0 0 5 5 】

免疫マウスの抗 p 2 4 抗体力価の評価

間接結合および直接サンドイッチ酵素結合イムノアッセイ ( E I A ) を用いて、該免疫マウスからの抗 H I V - 1 抗体力価を評価した ( 直接サンドイッチ E I A は、高親和性抗体のみを検出するために一定量のコア抗原で行った ) 。ナイーブまたは免疫マウスからの血清を、5 % ウシ血清アルブミン ( B S A ) と保存剤としての 0 . 0 3 % アジ化ナトリウムとを含有する 1 0 m M リン酸ナトリウムバッファー ( P B S ) ( p H 7 . 4 ) 中で系列希釈した。詳細なアッセイ方法は後記で説明する。該免疫マウスからの抗 p 2 4 抗体力価の評価を、該間接結合 E I A からのものは表 1 a に、該直接サンドイッチ E I A からのものは表 1 b に示す。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

## 【表 1】

表1a. 間接EIAによる抗p24抗体力価の評価

A490nmで測定

融合体#	動物 ID	血清希釈度	rp24-0	p24-M	BSA 対照
103	CAf1 #1555	1/24,300	1.219	1.156	0.008
108	CAf1 #1556	1/24,300	1.157	1.109	0.005
117	RBf/dn #1545	1/900	0.462	0.600	0.019
120A	BALB/c #7	1/100,000	NT	1.709	0.025
	前採血ms血清	1/900	0.036	0.093	0.018

10

20

表1b. 直接サンドイッチEIAによる抗p24抗体力価の評価

A490nmで測定

融合体#	動物 ID	血清希釈度	M ライゼー	O ライゼー
115B	CAf1 #1563	1/8,100	0.540	0.401
120A	BALB/c #7	1/1,000	1.579	0.762
	前採血ms血清	1/1,000	0.163	0.162

30

## 【 0 0 5 7 】

該直接結合EIAの場合には、簡単に説明すると、該希釈血清を、PBS中の100ulの3ug/ml p24M（すなわち、M群からのp24）またはrp24O（すなわち、群からの組換えp24）抗原またはp24Mとrp24Oとの混合物で直接的にコーティングされたマイクロタイターウェルと反応させ、PBS中の2% ウシ血清アルブミン（BSA）でブロッキングした。マイクロタイタープレートシェーカー（Lab-Line Instruments, Melrose, IL）上、室温（RT）で1時間インキュベートした後、マイクロタイタープレート洗浄器（Skanwash, Skatron Instruments, Sterling, VA）を使用して該プレートを蒸留水で3回洗浄した。100ulの0.2ug/mlのヤギ抗マウスIgG+IgM-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRPO）（KRL, Gaithersburg, MD）コンジュゲート（共役体）を該プレートの各ウェルに加えた。室温で30分間インキュベートした後、該プレートを3回洗浄した（前記のとおり）。酵素基質o-フェニレンジアミン：2HCl（OPD）溶液を各ウェルに加えて、暗所中、室温で5分間にわたり呈

40

50

色反応を進行させた。各ウェルに1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ を加えることにより、該反応を停止させた。該プレートを、マイクロタイタープレートリーダー(Titer tek multiwell EIA reader, ICN, Huntsville, AL)中、490nmで測定した。

#### 【0058】

該間接サンドイッチEIAの場合には、マイクロタイターウェルを100 $\mu\text{l}$ /ウェルのPBS中の10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗マウスIgG+M抗体(KPL)で2~8で一晚にわたりコーティングした。該プレートを、プレート洗浄器(Skanwash, Skatron Instruments, Sterling, VA)を使用して蒸留水で3回洗浄し、PBS中の2% BSAで室温で30分間ブロッキングした。培養液の100 $\mu\text{l}$ 部分を該ウェルに加え、該プレートを、プレートシェーカー上、室温で1時間インキュベートした。培養液中に分泌した抗p24抗体を、固相上にコーティングされたヤギ抗マウスIgG+Mにより捕捉した。洗浄後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHIV-1ウイルスライゼートの100 $\mu\text{l}$ 部分を各ウェルに加え、該プレートを、プレートシェーカー上、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウサギ抗p24抗体の100 $\mu\text{l}$ 部分を各ウェルに加え、該プレートを、プレートシェーカー上、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗ウサギIgG-HRPO(KPL)の100 $\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、該プレートを室温で30分間インキュベートした。最終洗浄後、色素原OPDを前記のとおりに加えた。

#### 【実施例4】

#### 【0059】

##### 細胞融合

融合前の追加抗原刺激の3日後、マウスを屠殺にし、それらの脾臓を単個細胞にまで破壊した。該単個細胞浮遊液を0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ で処理して、赤血球を除去し、ついでSP2/0:脾臓細胞の比が10:1となるようSP2/0細胞と混合した。該混合細胞を遠心分離し、無血清培地で1回洗浄し、ついで再び遠心分離した。該上清を該細胞ベレットから除去した。融合誘導因子ポリエチレングリコール(PEG)を使用して、免疫脾臓細胞と骨髓腫細胞系SP2/0(HPR neg.)とのハイブリッドを形成させた[KohlerおよびMilstein, Nature(1975)256:494, 総説は、Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications Hurrell編(CRC Press, Inc., 19820]。簡単に説明すると、脾臓細胞とSP2/0細胞との融合は、該ベレットを、無血清イスコエ(Iscove)変法ダルベッコ培地(IMDM)中の40% PEG(M.W.1450, American Type Culture Collection, Manassas, VA)に2分間さらすことにより達成された。20mlの無血清IMDMを5分間にわたり加えることにより、該PEGおよび細胞浮遊液をゆっくり希釈し、ついで遠心分離により該細胞を集めた。該上清をデカントし、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)と共に20% ウシ胎仔血清(Hyclone, Logan, Utah)を含有する30mlのIMDMと交換して、ハイブリドーマを選択した。1匹の未免疫BALB/cマウスからの脾臓細胞も支持細胞層として加えた。該細胞を3個の96ウェル組織培養プレート中で0.1ml/ウェルでプレートティングした。3日後、更に0.1mlのHAT培地を各ウェルに加えた。その後、1週間間隔で、該培地の半分を、HATと共に20% ウシ胎仔血清を含有するIMDMと交換し、ハイブリッドを更に7~14日間にわたり増殖させた。

#### 【0060】

該ハイブリッドのいくつかは、SP2/0細胞と融合した、HIV-1に対する抗体を産生する脾臓細胞から構成されていた。簡単に説明すると、該融合誘導因子は脾臓細胞とSP2/0細胞膜との融合を促進して、両方の細胞の核を含有するヘテロカリオンを形成した。最終的には、異なる核が融合して、同調有糸分裂能を有する単一の核を生成した。該融合細胞が分裂するにつれて、各核の染色体を失うことにより該ハイブリッドは安定化

する。該融合細胞を複数の96ウェルプレート中に $10^5 \sim 10^6$ 細胞/ウェルでプレATINGした。SP2/0：脾臓細胞融合から形成したハイブリッド細胞は、HAT培地中で培養することにより選択的に増殖した。すべての未融合SP2/0またはSP2/0：SP2/0融合細胞はアミノプテリンにより増殖が妨げられ、未融合脾臓細胞または脾臓：脾臓融合細胞は培養内で死滅した。脾臓細胞：SP2/0ハイブリッドのみが該HAT培地中で増殖することとなる。

【実施例5】

【0061】

p24モノクローナル抗体のスクリーニング、クローニングおよび特定

10～14日後、ハイブリドーマ細胞増殖を含有するウェルからの培養液を、HIV-1 p24に対する抗体に関してスクリーニングした。間接EIAを用いて、細胞融合体#103、#108、#115Bおよび#117からの培養液をスクリーニングした。また、高親和性を有する抗HIVコアタンパク質モノクローナル抗体を選択するために、直接サンドイッチEIAアッセイを用いて、融合体#115Bおよび120Aのクローニングならびに細胞融合体#120Aからの潜在的に有用なクローンをスクリーニングした。直接EIAおよび間接EIAは共に、実施例2の抗血清力価評価の節に記載されている。本出願に記載のハイブリドーマからの一次スクリーニングデータを表2aおよび2bに示す。

【0062】

【表2】

表2a. 間接結合EIAによりスクリーニングされた一次融合体

A490nmで測定

ハイブリット #	使用したHIV Ag	サンプル	ブランク対照
103-350	p24-M 溶解物	0.921	0.030
108-394	p24-M 溶解物	0.497	0.000
115B-151	p24-M 溶解物	0.662	0.012
115B-303	p24-M 溶解物	0.467	0.003
117-289	p24-M 溶解物	0.295	0.000

表2b. 直接サンドイッチEIAによりスクリーニングされた一次融合体

A490nmで測定

ハイブリット #	使用したHIV Ag	サンプル	陰性対照
120A-270	p24-M 溶解物	0.501	-0.011

## 【 0 0 6 3 】

該一次スクリーニングEIAにおいて強力な陽性シグナルを示すハイブリドーマを、細胞増殖のために24ウェルプレート中に移した。抗p24抗体の存在に関して、培養液を再びアッセイした。限界希釈によるクローニングのために、T25フラスコ中、抗p24陽性ハイブリッドを更に増殖させた。各増殖ハイブリッドを96ウェルプレート中で $10^5 \sim 10^6$ の希釈度でプレーティングし、10～21日間増殖させた。限界希釈からの培養液を抗p24抗体の存在に関してアッセイした。ハイブリドーマの命名法は、3個の数字を使用する番号付けの系に基づくものであり、第1の数字は融合の番号であり、第2の数字は親ハイブリッドの番号であり、第3の数字はサブクロンの番号である。各96ウェル組織培養プレートは連続的に1～96に番号付けされている。例えば、ハイブリドーマ#103-350-474は第103の融合に由来する。該親ハイブリッドは、それがウェル#50中の第3の融合プレートに由来するため、#350である。該サブクロンは、それがウェル#74の第4のクローニングプレートに由来するため、#474である。該クローンは、J. W. Goding in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press, N. Y., 1983)に概説されているガイドラインを使用して限界希釈により得た。本出願に記載のハイブリドーマに関する一次クローニングデータを表3aおよび3bに示す。

## 【 0 0 6 4 】

## 【表3】

表3a. 間接結合EIAによりスクリーニングされた一次クローン

A490nmで測定

クローン#	使用したHIV Ag	サンプル	ブランク対照
103-350-474	p24-M 溶解物	0.489	0.021
108-394-470	p24-M 溶解物	0.466	0.000

表3b. 直接サンドイッチEIAによりスクリーニングされた一次クローン

A490nmで測定

クローン#	使用したHIV Ag	サンプル	ブランク対照
115B-151-423	p24-M 溶解物	0.846	0.000
115B-303-620	p24-M 溶解物	0.991	0.006
117-289-555	p24-M 溶解物	0.830	0.011
120A-270-108	p24-M 溶解物	0.371	-0.021

## 【 0 0 6 5 】

抗p24 MabのイソタイプをSBA Clonotyping System (S

outhern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) で決定した。簡単に説明すると、マイクロタイターウェルプレートをやぎ抗マウスIgG+M抗体(KPL)の100μl部分で2～8 で18～24時間にわたりコーティングした。該ウェルを洗浄し、PBS中の2% BSAで室温で30分間ブロッキングした。洗浄後、培養液の100μl部分を該ウェルに加え、該プレートを、プレートシェーカー上、室温で2時間インキュベートした。洗浄後、ウサギ抗マウスイソタイプ特異的抗体の100μl部分を該ウェルに加え、プレートシェーカー上、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、100μlのヤギ抗ウサギIgG-HRPO(KPL)を該ウェルに加え、プレートシェーカー上、室温で更に30分間インキュベートした。最終洗浄後、色素原OPDを前記のとおりに加えた。Mab 103-350-474、108-394-470、115B-151-423、115B-303-620、117-289-555および120A-270-108のイソタイプを表4に要約する。

10

【0066】

【表4】

表4. モノクローナル抗体イソタイプ

Mab ID	イソタイプ	軽鎖
103-350-474	IgG2a	カッパ
108-394-470	IgG2b	カッパ
115B-151-423	IgG1	カッパ
115B-303-620	IgG2b	カッパ
117-289-555	IgG1	カッパ
120A-270-108	IgG1	カッパ

20

30

【0067】

HIV-1/2抗原に対するMabの特異的反応性を、前節に記載のとおり直接サンドイッチEIAにおいて試験した。結果を表5に要約する。

【0068】

## 【表 5】

表5. HIV-1/2 p24/p26との抗HIV-1 p24 Mabの反応性

以下のものとの反応性

Mab ID	p24-M	p24-0 溶解物	HIV-2 溶解物
103-350-474	++	++	++
108-394-470	++	++	+
115B-151-423	++	++	++
115B-303-620	++	++	++
117-289-555	++	++	++
120A-270-108	++	++	++

++ = 非常に強力

## 【0069】

表5に示した結果を考慮すると、本発明のモノクローナル抗体のすべてはHIV-1/2 p24/p26抗原と反応する(HIV-1 O群およびHIV-2 NIH-Zウイルス溶解物はABI (Gaithersburg, MD)から購入した)。

## 【実施例6】

## 【0070】

抗体の製造および精製

更なる特徴づけ及び試験のために大量のMabを製造するために、抗p24ハイブリドーマ細胞系をT250フラスコ中で更に増殖させ、無血清培地H-SFM (Life Technologies, Grand Island, NY)に切り換えた。該ハイブリドーマ細胞系がH-SFMに適応したら、それを大規模抗体製造用のローラーボトル(回転びん)中に播いた。培養液を該ローラーボトルから回収し、濾過系により濃縮した。該ローラーボトル由来抗体を、PerSeptive Biosystems (Cambridge, MA)からのプロテインAカラム上で精製した。

## 【実施例7】

## 【0071】

抗p24モノクローナル抗体の親和性測定

精製された抗p24 Mab 103-350-474、108-294-470、115B-303-620、115B-151-423、117-289-555および120A-270-108の親和性を、表面プラズモン共鳴(SPR)に基づくBIAcoreイムノセンサー(immunosensor)装置(Pharmacia, Uppsala, Sweden)により測定した。簡単に説明すると、ヤギ抗マウスIgG(Fc)抗体を、EDAC化学によりアミノセンサーチップに共有結合させた。各マウスIgGモノクローナル抗体を該センサーチップ中に注入し、該固定化ヤギ抗マウスIgG抗体により捕捉させた。未結合マウスモノクローナル抗体を該チップから洗い落とした。表面プラズモン共鳴(SPR)シグナルのベースライン測定値を各モノクローナル抗体に関して

10

20

30

40

50

記録した。精製されたHIV-1 p24タンパク質を該センサーチップ中に注入し抗p24モノクローナル抗体と反応させると、SPRシグナルは増加し始めた。結合曲線の傾きは各モノクローナル抗体の会合定数に比例した。結合が達成された後、洗浄工程を導入した。抗p24モノクローナル抗体からのp24の解離速度はSPRシグナルの減少に比例した。測定の各サイクルの後、次の測定のために抗p24モノクローナル抗体を該センサーチップから除去するために、HClバッファーを該センサーチップ中に適用した。オン・レート( on - rate )およびオフ・レート( off - rate ) SPRシグナルに基づき、各モノクローナル抗体の会合(  $K_a$  )、解離(  $K_d$  )および相対親和性(  $K$  )定数を求めた。データを表6に要約する。

【0072】

【表6】

表6. 結合定数

クローン #	$K_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K$ (M <sup>-1</sup> )
103-350-474	$8.3 \times 10^5$	$5.1 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^9$
108-394-470	$8.1 \times 10^5$	$4.2 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^9$
115B-151-423	$1.3 \times 10^6$	$2.0 \times 10^{-4}$	$6.5 \times 10^9$
115B-303-620	$8.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^{-4}$	$3.2 \times 10^9$
117-289-555	$3.5 \times 10^5$	$3.3 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^9$
120A-270-108	$8.1 \times 10^5$	$8.8 \times 10^{-4}$	$9.2 \times 10^9$

【実施例8】

【0073】

#### p24モノクローナル抗体のエピトープマッピング

マウスモノクローナル抗体により認識されるHIV-1 p24上のエピトープを、2組の13個のp24合成ペプチドを使用して同定した(図1a)。共有エピトープに特有でありうるラセン構造(インビボ)の選択非遮断領域を提示するために、ペプチドの設計はp24抗原の三次元構造(Gittiら, Science 273:231(1996); Gambleら, Science 278:849(1997))に基づくものであった。これらのペプチドは該コアタンパク質上の全てのラセン領域(A~J)を網羅した。モノクローナル抗体をM群(クレードB)およびO群(Ham112)ペプチドの両方に対して反応させた。ペプチドを、HIV-1 M群クレードB p24を表すM1~M13、またはHIV-1 O群(Ham112分離体)p24を表すO1~O13と命名した。各ペプチドはまた、マレイミド修飾キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と反応して未共役ペプチドの他に2通りのKLH共役ペプチドを形成する追加的なシステインをそのC末端に含有していた。KLH共役ペプチドは、エピトープの提示および認識(モノクローナル結合)に必須でありうるコンホメーション構造を安定化しそれをとるのを補助するために作製した。KLH共役ペプチドは、M群ペプチドに関してはKM1~KM13と、O群ペプチドに関してはKO1~KO13と命名した。

【0074】

合成ペプチドの組へのモノクローナル抗体(Mab)の結合は間接ELISAアッセイ

10

20

30

40

50



により測定した。簡単に説明すると、遊離またはK L H共役合成ペプチドをマイクロタイタープレートのウェル上にコーティングした。該ペプチドコート化ウェルを、約1 u g / m l の濃度に調製したM a bと共にインキュベートした。結合M a bを酵素またはアクリジニウム標識ヤギ抗マウスI g G抗体により検出した。代表的なデータを図2 aおよびbに示す。M a b 1 0 3 - 3 5 0 - 4 7 4、1 1 1 7 - 2 8 9 - 5 5 5、1 1 5 B - 3 0 3 - 6 2 0および1 2 0 A - 2 7 0 - 1 0 8により認識されるエピトープが以下のとおり

【0075】

モノクローナル抗体1 0 3 - 3 5 0 - 4 7 4は、p 2 4のヘリックスD領域に対応するK L H共役M群およびO群ペプチド# 4 ( K M 4 / K O 4 ) に特異的に結合した。該エピトープは、見掛け二次コンホメーション要件を有する直鎖状である。1 0 3 - 3 5 0 - 4 7 4が遊離(未共役)ペプチドに対して反応した場合には、一貫した結合はほとんど又は全く検出されなかった。一方、二次コンホメーションペプチド構造を促すためにペプチドを担体タンパク質(K L H)に共役させると、1 0 3 - 3 5 0 - 4 7 4は、一貫して、K M 4 / K O 4 ペプチドに対して強力(高いS / N)な結合を示した。該エピトープが直鎖状であると考えられるのは、該抗体は小さな合成ペプチドに結合するが最適なエピトープは特異的な二次ラセン構造を要しうるからである。したがって、該エピトープは、最も広義には、アミノ酸6 3 - 8 9を含むと定められ、最も狭義には、アミノ酸6 3 - 8 0を要すると推定され、これはヘリックスD領域にマッピングされる。さらに、MおよびO p 2 4間の該抗体の交差反応性は、ヘリックスDにおける最大配列相同性を有するp 2 4領域が、十中八九、該エピトープの形成に関与していることを示している。太字で示した残基が、十中八九、該エピトープの形成の鍵となるが、隣接アミノ酸が関与する又は隣接アミノ酸を要する二次構造の可能性も排除できない。

【0076】

【化1】

(K) M4 ペプチド 63-89:

CQAAMQ MLKET INEEA AEWDR VHPVH AG ( 配列番号 :1)

(K) O4 ペプチド 63-89:

CQGALQ VLKEV INEEA ADWDR SHPPV VG ( 配列番号 :2)

【0077】

モノクローナル抗体1 1 7 - 2 8 9 - 5 5 5は、主要相同性領域(M H R)の一部であるヘリックスH領域に対応するM群およびO群M 1 0 / O 1 0ペプチドの両方に特異的に結合した。該抗体は遊離(未共役)M 1 0 / O 1 0ペプチドに容易に結合するため、該エピトープは直鎖状であると考えられる。M群およびO群 p 2 4の両方への結合が予想される。太字で示した残基が該エピトープの形成の鍵となるらしい。

【0078】

## 【化2】

M10 ペプチド 151-176:

CLDIRQ GPKEP FRDYV DRFYK TLRAEQ ( 配列番号 :3)

O10 ペプチド 152-177:

CLDIKQ GPKEP PRDYV DRFYK TLRAEQ ( 配列番号 :4)

10

## 【0079】

モノクローナル抗体 115B-303-620は、p24のヘリックスJ~K領域に対応するM12およびO12ペプチドに特異的に結合した。該エピトープは、M12/O12の遊離(未共役)ペプチドに対する強力(高いS/N)な結合に基づけば、直鎖状であると考えられる。太字で示した残基が該エピトープの形成の鍵となると考えられるが、隣接アミノ酸が関与する又は隣接アミノ酸を要する二次構造の可能性も排除できない。

## 【0080】

## 【化3】

M12 ペプチド:

CKTIL KALGP AATLE EMMTA ( 配列番号 :5)

20

O12 ペプチド:

CKQIL KALGP GATLE EMMvA ( 配列番号 :6)

## 【0081】

モノクローナル抗体 120A-270-108は、モノクローナル抗体 117-289-555の場合と同様に、p24のヘリックスHおよびMHR領域にマッピングされた。しかし、120A-270-108は、117-289-555により認識されるエピトープとは異なるエピトープを認識する。117-289-555と120A-270-108との有意な相違は、120A-270-108がKLH共役M10ペプチドに中等度でしか結合しなかったことである。120A-270-108を遊離(未共役)ペプチドに対して反応させた場合には、結合は全く検出されなかった。したがって、120A-270-108の最適エピトープは特異的な二次または三次構造を要する。さらに、117-289-108と120A-270-108とは、異なる適合性群に属する。なぜなら、それらは、お互いからの障害も競合もなくコアタンパク質に同時に結合するからである(以下の表7を参照されたい)。

30

## 【0082】

40

【表 7】

表7. mAbとp24タンパク質(M群および0群の両方)とのサンドイッチ形成

固相中のmAb	液相中のシグナル標識mAb					
	103- 350-474	117- 289-555	115B- 303-620	115B- 151-423	108- 394-470	120A- 270-108
103-350- 474	-	+	+	+	-	-
117-289- 555	+	-	+	+	+	+
115B-303- 620	+	+	-	+	+	+
115B- 151-423	+	+	+	-	+	+
108-394- 470	-	+	+	+	-	-
120A-270- 108	-	+	+	+	-	-
120B-580- 106 ヘリックス A	+	+	+	-	+/-	-

記号+は、p24抗原に対するmAbペアの同時結合の適合性を示す。

## 【0083】

また、M a b 103 - 350または108 - 394とペアになってサンドイッチを形成する117 - 289とは異なり、120A - 270はいずれのM a bともサンドイッチを形成し得ないことが、該適合性研究から示された(表7)。該適合性データは、120A - 270により認識されるエピトープが、117 - 289により認識されるエピトープとは別物であり異なることを明らかに示した。M a b 120A - 270は、十中八九、部分的にはアミノ酸151 - 176により形成されるコンホメーションエピトープを認識する。

## 【0084】

2つのM a b 115B - 151および108 - 394は遊離合成ペプチドには結合せず、115B - 151は1つのKLH共役ペプチドに弱く結合した(図2B)。合成ペプチドに結合しなかったことでは、これらのM a bがコア抗原上のコンホメーションエピト

10

20

30

40

50

ープを認識することを示した。コンホメーションエピトープは、p 2 4 抗原の三次または四次フォールディングにより一緒になる連続的なアミノ酸により形成される。三次または四次構造依存性コンホメーションエピトープは、一般には、小さな合成ペプチドによっては模擬され得ない。

#### 【 0 0 8 5 】

該 1 1 5 B - 1 5 1 および 1 0 8 - 3 9 4 により認識されるコンホメーションエピトープを位置決定するために、1組の大きな重複 p 2 4 ポリペプチドを使用した。重複 p 2 4 ポリペプチドを、p 2 4 スクレオチド配列の特有の部分を持するプラスミド（欠失クローン）から大腸菌（E . c o l i ）内で発現させた（r タンパク質）。6個の欠失クロンの2組を、p 2 4 の構造に基づき設計した。p 2 4 ポリペプチドへのモノクローナル抗体の特異的結合を、ウエスタンブロット法を用いて測定した。簡単に説明すると、大腸菌（E . c o l i ）の抽出物中の発現された（組換え）p 2 4 ポリペプチドを SDS - P A G E に付し、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーした。電気泳動により分離されたタンパク質を含有するメンブレンを p 2 4 M a b （～ 5 u g / m l の濃度）と反応させ、結合モノクローナル抗体を酵素標識ヤギ抗マウス I g G により検出した。図 4 は、M a b 1 1 5 B - 1 5 1 および 1 0 8 - 3 9 4 のウエスタンブロットの結果を例示する。

#### 【 0 0 8 6 】

モノクローナル抗体 1 1 5 B - 1 5 1 は、M 群ポリペプチド F （ 1 - 1 7 2 ）および G （ 1 3 7 - 2 3 1 ）ならびに O 群ポリペプチド N （ 1 - 1 7 3 ）および O （ 1 3 8 - 2 3 2 ）に特異的に結合した。F および G および N および O 間の重複領域（アミノ酸 1 3 7 - 1 7 2 ）が、1 1 5 B - 1 5 1 により認識されるエピトープに寄与している可能性がある。このデータは、アミノ酸 1 3 7 - 1 7 2 を含有する K L H 共役合成ペプチド K M 1 0 および K O 1 0 に対する 1 1 5 B - 1 5 1 の弱いが一貫した結合により裏付けられた（図 2 B ）。（ a ） 1 1 5 B - 1 5 1 は、該エピトープが特異的な二次または三次コンホメーション状態にあることを要したらしいこと、（ b ）それは、p 2 4 とサンドイッチを形成するのに 1 1 7 - 2 8 9 / 1 2 0 A - 2 7 0 と適合性であったこと（表 7 ）、および（ c ）ヘリックス A に対するモノクローナル抗体は 1 1 5 B - 1 5 1 とは不適合性であり強く競合したが、1 1 7 - 2 8 9 とは適合性であったことから、M a b 1 1 5 B - 1 5 1 は 1 1 7 - 2 8 9 および 1 2 0 A - 2 7 0 とは異なっていた。K L H 共役ペプチドに対する弱い結合に加えて、ヘリックス A に対するモノクローナル抗体が 1 1 5 B - 1 5 1 と強く競合したことは、1 1 5 B - 1 5 1 により認識される最適エピトープが、ヘリックス H 内で同定された最小直鎖状エピトープに加えてヘリックス A の一部を含むことを示している可能性がある。

#### 【 0 0 8 7 】

モノクローナル 1 0 8 - 3 9 4 は、M / O p 2 4 の最初の 1 7 2 / 1 7 3 アミノ酸内で形成されるコンホメーションエピトープにマッピングされた。該エピトープは非直鎖状である。なぜなら、H I V - 1 M および O 合成ペプチド（遊離体、または担体タンパク質 K L H との共役体）は 1 0 8 - 3 9 4 と無反応性であったからである。また、1 0 8 - 3 9 4 は、M / O p 2 4 に由来するポリペプチドのうちの最大のもの（F 1 - 1 7 2 / N 1 - 1 7 3 ）としか反応しなかった。M ポリペプチド C （ 1 - 6 5 ）、E （ 1 - 1 3 0 ）および I （ 6 0 - 1 5 0 ）、ならびにポリペプチド L （ 1 - 6 5 ）、M （ 1 - 1 3 1 ）および Q （ 6 0 - 1 5 1 ）は、ポリペプチド F （ 1 - 1 7 2 ）および N （ 1 - 1 7 3 ）中で見出されるのと同じ配列の大きなセグメントを含有するが、1 0 8 - 3 9 4 により認識されるエピトープは、それらの短いポリペプチドからは形成されなかったらしい。これらのデータは、少なくとも最初の 1 7 2 / 1 7 3 アミノ酸を含む p 2 4 の主要部分により形成されるコンホメーションエピトープに符合する。

#### 【 0 0 8 8 】

合成ペプチドおよび p 2 4 欠失クローンを使用するエピトープマッピングからのデータ、ならびに p 2 4 サンドイッチ適合性研究からのデータに基づき、p 2 4 抗原の三次元構

10

20

30

40

50

造上の6個のmAbのエピトープ地図を図5に例示する。該p24分子の構造は、2つのドメイン、すなわち、N末端ドメイン(アミノ酸1-151)およびC末端ドメイン(アミノ酸151-231)により表される。無傷p24分子の構造は未だ決定されていないため、それらの2つのドメイン間の厳密な構造的関係は完全には特徴づけられていない。

#### 【0089】

以下のとおり、6個のmAbがp24抗原にマッピングされた(図5)。

#### 【0090】

モノクローナル抗体103-350-474は、HIV-1 MおよびO p24のヘリックスD領域中に位置する直鎖状エピトープに結合する。該エピトープは、最も広義には、該p24抗原のM群およびO群のアミノ酸63-89を含むと定められ、最も狭義には、アミノ酸63-80を含むと推定される。

10

#### 【0091】

モノクローナル抗体117-289-555は、p24のMHR/ヘリックスH領域中に位置する直鎖状エピトープに結合する。該エピトープは、最も広義には、p24抗原のアミノ酸151-172(M)/152-173(O)を含むと定められ、最も狭義には、アミノ酸162-172(M)/163-173(O)を含むと定められる。

#### 【0092】

モノクローナル抗体115B-303-620は、p24抗原のヘリックスJ~K領域中に位置する直鎖状エピトープに結合する。該エピトープは、該p24抗原のアミノ酸198-217(M)/199-218(O)を含むと定められる。

20

#### 【0093】

モノクローナル抗体115B-151-423は、p24のヘリックスAおよびMHR/ヘリックスH領域の結合部付近に十中八九は存在するコンホメーションエピトープに結合する。

#### 【0094】

モノクローナル抗体108-394-470は、p24のN末端ドメイン(アミノ酸1-151)内に形成されるコンホメーションエピトープに結合する。該コンホメーションエピトープはヘリックスDおよびヘリックスAの結合部付近に存在すると推定される。

#### 【0095】

モノクローナル抗体120A-270-108は、p24のヘリックスD、ヘリックスAおよびMHR/ヘリックスH領域の結合部付近に存在すると推定されるコンホメーションエピトープに結合する。

30

#### 【実施例9】

#### 【0096】

##### モノクローナル抗体でコーティングされた微粒子の製造

1% 固体のカルボキシ修飾ラテックス(CML)微粒子(Bangs Laboratories, Fishers, INから入手)を、スケール5の高に設定された(Roto-Torque, Cole Parmer Instruments, Vernon Hills, IL)上、カルボジイミドEDC[Sigma Chemicals, St. Louis, MOからの1-エチル-3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド塩酸塩]により、50mM MES[2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]バッファ(pH6.1)中、EDC:カルボキシル基=10:1のモル比で室温で5分間にわたり活性化した。エンド・オーバー・エンド・ローテーター上、抗コアMabをEDC前活性化CML微粒子に、1% 固体微粒子の1ml当たり200ugの抗体の比率で、室温で4時間にわたり加えた。十字流(cross flow)シリンジ膜(孔径0.2umおよび表面積12cm<sup>2</sup>、Spectrum, Laguna Hills, CAから入手)と共にAbbottダイアフィルトレーション系(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を使用して、遊離反応物を洗い落とした。Mabコート化微粒子に、10mM PBSおよび5% BSA、0.03% アジ化ナトリウムを含有するバッファをローテーター上で室温で1時間にわたり上塗り(オーバーコ

40

50

ーティング)した。M a bコート化C M L微粒子を、45 のオープンインキュベーター中で20時間にわたり熱ストレスに付し、ついでA b b o t t P r i s m S t a n d - a l o n e 装置 ( A b b o t t L a b o r a t o r i e s , A b b o t t P a r k , I L ) により試験した。

#### 【実施例10】

##### 【0097】

##### アクリジニウム標識抗体コンジュゲートの製造

P B S ( p H 7 . 4 ) 中の抗H I VコアM a bをアクリジニウム - N - ヒドロキシスクシンイミド ( A C R - N H S ) 活性エステルと、エンド・オーバー・エンド・ローテーター ( C o l e P a r m e r I n s t r u m e n t s , V e r n o n H i l l s , I L ) 上、M a b : A C R - N H S = 1 : 15 のモル比で室温で10分間反応させた。1%

C H A P S を含有するP B S ( p H 6 . 3 ) 中で予め平衡化されたG - 25セファデックスカラム ( 15 c m x 1 . 5 c m ) により、A C R 標識M a b コンジュゲートを遊離反応体から分離した。A C R 標識M a b の溶出ピークを、分光光度計 ( S h i m a d z u U V - 2101 P C ) を使用して280nmでの以下の吸光度によりモニターした。A C R 標識m A b タンパク質の濃度 = ( O D 280nm - 0 . 247 x O D 370nm ) / 1 . 38。A C R / m A b のモル比 ( 率 ) = [ O D 370nm / ( O D 280nm - 0 . 247 x O D 370nm ) ] x 15。

#### 【実施例11】

##### 【0098】

##### プリズムイムノアッセイ法および調製

抗p24 m A b - 微粒子 ( 濃縮ストック ) をu P a r t i c l e 希釈剤 ( 5% 子ウシ血清、7.5% スクロース、50mM E D T A、0.1% T w e e n 20および0.1% プロクリン ( p r o c l i n ) を含有する10mM P B S , p H 6 . 5 ) 中で希釈した。抗p24 m A b - A C R コンジュゲートをコンジュゲート希釈剤 ( 40mM E D T A、5% 子ウシ血清、0.5% T r i t o n および0.1% プロクリン を含有する10mM P B S , p H 6 . 3 ) 中で希釈した。2つの洗浄バッファーを該アッセイにおいて使用した。トランスファー洗浄バッファーは、25mM M E S ( p H 5 . 7 )、150mM N a C l、4% T r i t o n X - 100、1% T w e e n 20、0.001% P E G、0.1% プロクリンおよび0.001% 消泡剤を含有していた。コンジュゲート洗浄バッファーは、10mM C A P S ( p H 9 . 9 )、150mM N a C l、5% T r i t o n X - 100、0.1% プロクリンおよび0.001% 消泡剤を含有していた。H I V - 1 p 24 - M、r p 24 - O、H I V - 2 r p 26 およびH I V - 2 ウイルスライセートをH I V - 1 / 2 陰性ヒト血漿中で希釈した。また、陰性対照として正常ヒト血漿を使用した。

##### アッセイ方法：

簡単に説明すると、該装置を始動させる前に、すべての試薬を室温に加温した。トランスファー洗浄バッファー、コンジュゲート洗浄バッファー、抗p24 m A b - A C R コンジュゲートおよび活性化剤を適当な試薬ラインに接続した。該試薬を2回予備注入し、該試薬ライン中に捕捉されている空泡があればそれを叩き出した。100ulのサンプルおよび50ulの試料希釈剤 ( 25mM P B S ( p H 6 . 5 )、1% T r i t o n X - 100、0.4% T w e e n 20、20mM E D T A および0.1% プロクリン ) をサンプルトレイのチャンネルAおよびB反応ウェルに手動で加えた。該トレイを該装置上にローディングし、該アッセイ工程中に該チャンネルを介して絶えず移動させた。該サンプルトレイが該微粒子ステーションに移動した際に、50ulの抗p24 m A b コート化微粒子を各反応ウェルに加えた。該アッセイ工程の残りは、該装置により自動的に行った。該装置のチャンネル温度は37 に維持した。37 で18分間のインキュベーションの後、該サンプルトレイを該トランスファー洗浄ステーションに移動させた。サンプルとu P r t i c l e s との混合物をトランスファーバッファーによりガラス繊維マトリックス上にフラッシュし、トランスファーバッファーで2回洗浄した。50ulの抗

p 2 4 m A b - A C Rコンジュゲートを該ガラス繊維マトリックス上加えた。20分間のインキュベーションの後、該サンプルトレイを該コンジュゲート洗浄ステーションに移動させた。未結合コンジュゲートをコンジュゲート洗浄バッファーにより洗い落とした。該コンジュゲート洗浄の後、該サンプルトレイを該活性化剤ステーションに移動させた。50  $\mu$ lの活性化剤（過酸化水素と水酸化ナトリウムとの混合物）を該マトリックスに適用した。化学発光シグナルを光電子増倍管検出器により測定した。

【実施例12】

【0099】

2つのモノクローナル抗体を使用するHIVコアタンパク質（抗原）の同等検出

高親和性モノクローナル抗体の適合性ペアを使用して、Abbott Prism独立型（standalone）装置（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）上での2工程化学発光「サンドイッチ」イムノアッセイの実施において、同等な定量的コア抗原感度が示された。120A-270-108でコーティングされた微粒子（0.066% 固体）を60 ng/mlの115B-151-423-ACRコンジュゲートと組合せることにより、HIV-1 M群、HIV-1 O群およびHIV-2 コアタンパク質の同等な検出が達成された。HIV-1 M群p24の検出下限は0.3 pg/ml（図6）、HIV-1 O群rp24については0.3 pg/ml（図7）、およびHIV-2 rp26については1.0 pg/ml（図8）と推定された。HIV-1とHIV-2との間では定量的感度における僅かな相違（3.3倍）が検出されたに過ぎなかった。関連しているが同一ではない3つのコア抗原間の同等の感度は、これらのモノクローナル抗体の異常に高いK<sub>e</sub>qが共有エピトープに対するものであり交差反応性エピトープに対するものではないことを強く示している。コア抗原（HIV-1 M、OおよびHIV-2）に対するこれらのMabの親和性はほぼ等しいはずである。なぜなら、全3個のコア抗原に対する結合速度論はほぼ同等であるからである。一般に、Mabが交差反応性エピトープと反応するとK<sub>e</sub>qは減少する。これは、定量的感度が、交差反応性抗原に対しては、天然（免疫原）抗原に対する場合より顕著に低いことにより示される。さらに、この場合に関連しているHIV-1およびHIV-2 コアタンパク質の定量的間の僅かな相違は、該研究のために該タンパク質を定量するために用いた方法および（該方法に基づく誤差）に、より関連している可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1A】図1aは、HIV-1 M群およびHIV-1 O群からのp24のアミノ酸配列アライメントを例示する。M群 p24の構造から決定された構造的特徴（例えば、ヘリックス（helix）A~J）が該配列アライメントの上に示されている。マッピング研究のための合成M群およびO群p24ペプチドは、それぞれMまたはO群の配列および番号付けに従い設計し標識した。

【図1B】図1bは、HIV-1 M群、HIV-1 O群からのp24およびHIV-2 p26のアミノ酸配列アライメントを例示する。

【図2A-1】図2A-1は、p24合成ペプチドへのモノクローナル抗体103-350、117-289、115-303、120A-270および115B-151の結合を例示する。

【図2A-2】図2A-2は、p24合成ペプチドへのモノクローナル抗体103-350、117-289、115-303、120A-270および115B-151の結合を例示する。

【図2A-3】図2A-3は、p24合成ペプチドへのモノクローナル抗体103-350、117-289、115-303、120A-270および115B-151の結合を例示する。

【図2A-4】図2A-4は、p24合成ペプチドへのモノクローナル抗体103-350、117-289、115-303、120A-270および115B-151の結合を例示する。

【図 2 B - 1】図 2 B - 1 は、p 2 4 合成ペプチドへのモノクローナル抗体 1 0 3 - 3 5 0、1 1 7 - 2 8 9、1 1 5 - 3 0 3、1 2 0 A - 2 7 0 および 1 1 5 B - 1 5 1 の結合を例示する。

【図 2 B - 2】図 2 B - 2 は、p 2 4 合成ペプチドへのモノクローナル抗体 1 0 3 - 3 5 0、1 1 7 - 2 8 9、1 1 5 - 3 0 3、1 2 0 A - 2 7 0 および 1 1 5 B - 1 5 1 の結合を例示する。

【図 2 B - 3】図 2 B - 3 は、p 2 4 合成ペプチドへのモノクローナル抗体 1 0 3 - 3 5 0、1 1 7 - 2 8 9、1 1 5 - 3 0 3、1 2 0 A - 2 7 0 および 1 1 5 B - 1 5 1 の結合を例示する。

【図 2 B - 4】図 2 B - 4 は、p 2 4 合成ペプチドへのモノクローナル抗体 1 0 3 - 3 5 0、1 1 7 - 2 8 9、1 1 5 - 3 0 3、1 2 0 A - 2 7 0 および 1 1 5 B - 1 5 1 の結合を例示する。

10

【図 2 B - 5】図 2 B - 5 は、p 2 4 合成ペプチドへのモノクローナル抗体 1 0 3 - 3 5 0、1 1 7 - 2 8 9、1 1 5 - 3 0 3、1 2 0 A - 2 7 0 および 1 1 5 B - 1 5 1 の結合を例示する。

【図 3】図 3 は、H I V - 1 M および O 群の p 2 4 から誘導された欠失クローンの位置を例示する。

【図 4 A】図 4 A は、p 2 4 の領域へのモノクローナル抗体 1 1 5 B - 1 5 1 および 1 0 8 - 3 9 4 の結合をマッピングするために使用したウエスタンブロットの結果を例示する。

20

【図 4 B】図 4 B は、p 2 4 の領域へのモノクローナル抗体 1 1 5 B - 1 5 1 および 1 0 8 - 3 9 4 の結合をマッピングするために使用したウエスタンブロットの結果を例示する。

【図 5】図 5 は、p 2 4 モノクローナル抗体により認識される H I V - 1 p 2 4 エピトープを要約する。

【図 6】図 6 は、固相上で 1 2 0 A - 2 7 0 を及び液相中で 1 1 5 B - 1 5 1 を使用して得られた H I V - 1 M 群 p 2 4 の定量的感度を例示する。

【図 7】図 7 は、固相上で 1 2 0 A - 2 7 0 を及び液相中で 1 1 5 B - 1 5 1 を使用して得られた H I V - 1 O 群 p 2 4 の定量的感度を例示する。

【図 8】図 7 は、固相上で 1 2 0 A - 2 7 0 を及び液相中で 1 1 5 B - 1 5 1 を使用して得られた H I V - 2 p 2 6 の定量的感度を例示する。

30

【配列表】



## SEQUENCE LISTING

<110> Abbott Laboratories  
 Lou, Sheng C.  
 Hunt, Jeffrey C.  
 Konrath, John G.  
 Qiu, Xiaoxing  
 Scheffel, James W.  
 Tyner, Joan D.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN  
 IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND USES THEREOF

<130> 6755.US.01

10

<140> 09/731,126

<141> 2000-12-06

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 1

Cys Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly  
 20 25

20

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 2

Cys Gln Gly Ala Leu Gln Val Leu Lys Glu Val Ile Asn Glu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Trp Asp Arg Ser His Pro Pro Val Val Gly  
 20 25

30

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 3

Cys Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln

20

25

<210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 4  
 Cys Leu Asp Ile Lys Gln Gly Pro Lys Glu Pro Pro Arg Asp Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln  
 20 25

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 5  
 Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Met Met Thr Ala  
 20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 6  
 Cys Lys Gln Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Met Met Val Ala  
 20

<210> 7  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 7  
 Pro Val Val Pro Asn Ala Gln Gly Gln Met Ile His Gln Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Ala Val Glu Glu Lys Ala Phe  
 20 25 30  
 Asn Pro Glu Ile Ile Pro Met Phe Met Ala Leu Ser Glu Gly Ala Ile  
 35 40 45  
 Pro Tyr Asp Ile Asn Ile Met Leu Asn Ala Ile Gly Gly His Gln Gly  
 50 55 60  
 Ala Leu Gln Val Leu Lys Glu Val Ile Asn Glu Glu Ala Ala Asp Trp  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Ser His Pro Pro Val Val Gly Pro Leu Pro Pro Gly Gln Ile  
 85 90 95

10

20

30

Arg Glu Pro Thr Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Gln Gln  
 100 105 110  
 Glu Gln Val His Trp Ile Thr Arg Ala Asn His Pro Val Pro Val Gly  
 115 120 125  
 Asp Ile Tyr Arg Lys Trp Ile Val Leu Gly Leu Asn Lys Met Val Lys  
 130 135 140  
 Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Lys Gln Gly Pro Lys Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu  
 165 170 175  
 Gln Ala Ile Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val  
 180 185 190  
 Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Gln Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro  
 195 200 205  
 Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Val Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly  
 210 215 220  
 Pro Thr His Lys Ala Lys Leu Leu  
 225 230

10

<210> 8  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 8  
 Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe  
 20 25 30  
 Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr  
 35 40 45  
 Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala  
 50 55 60  
 Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met  
 85 90 95  
 Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln  
 100 105 110  
 Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu  
 115 120 125  
 Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met  
 130 135 140  
 Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro  
 145 150 155 160  
 Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln  
 165 170 175  
 Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln  
 180 185 190  
 Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala  
 195 200 205  
 Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro  
 210 215 220  
 Gly His Lys Ala Arg Val Leu  
 225 230

20

30

<210> 9  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Human Immunodeficiency Virus

<400> 9  
 Val Gln Gln Ala Gly Gly Asn Tyr Ile His Val Pro Leu Ser Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Leu Val Glu Glu Lys Lys Phe Gly Ala  
 20 25 30  
 Glu Val Val Pro Gly Phe Gln Ala Leu Ser Glu Gly Cys Thr Pro Tyr  
 35 40 45  
 Asp Ile Asn Gln Met Leu Asn Cys Val Gly Asp His Gln Ala Ala Met  
 50 55 60  
 Gln Ile Ile Arg Glu Ile Ile Asn Glu Glu Ala Asp Trp Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Gln His Pro Ile Pro Gly Pro Leu Pro Ala Gly Gln Leu Arg Asp Pro  
 85 90 95  
 Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Val Asp Glu Gln Ile  
 100 105 110  
 Gln Trp Met Tyr Arg Gln Pro Asn Pro Val Pro Val Gly Asn Ile Tyr  
 115 120 125  
 Arg Arg Trp Ile Gln Ile Gly Leu Gln Lys Cys Val Arg Met Tyr Asn  
 130 135 140  
 Pro Thr Asn Ile Leu Asp Val Lys Gln Gly Pro Lys Glu Ser Phe Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu Leu Ile Gln Asn Ala  
 180 185 190  
 Asn Pro Asp Cys Lys Leu Val Leu Lys Gly Leu Gly Met Asn Pro Thr  
 195 200 205  
 Leu Glu Glu Met Leu Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Ser Gln  
 210 215 220  
 Lys Ala Arg Leu Met  
 225

10

20

【図 1 A】

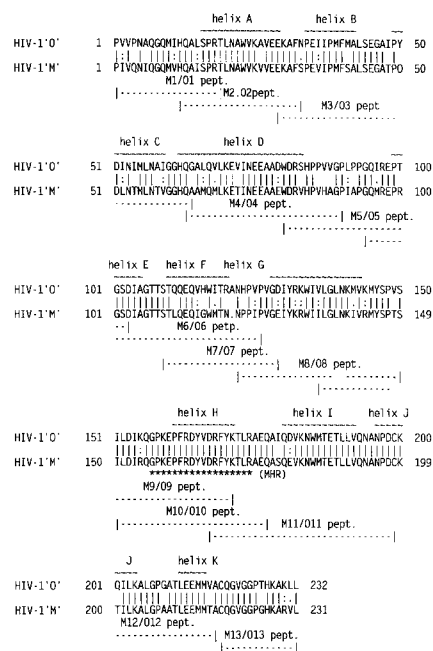


FIG.1A

【図 1 B】

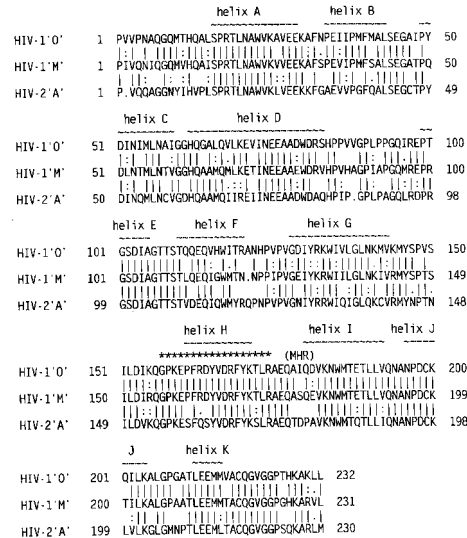
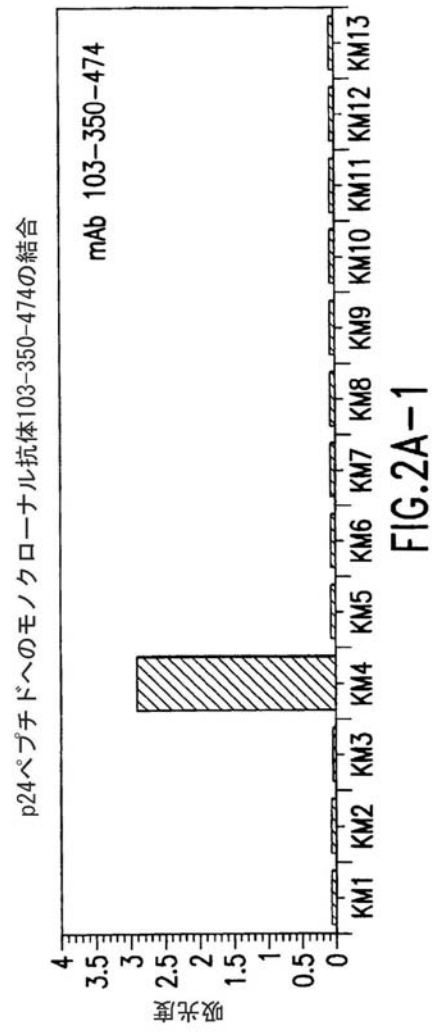
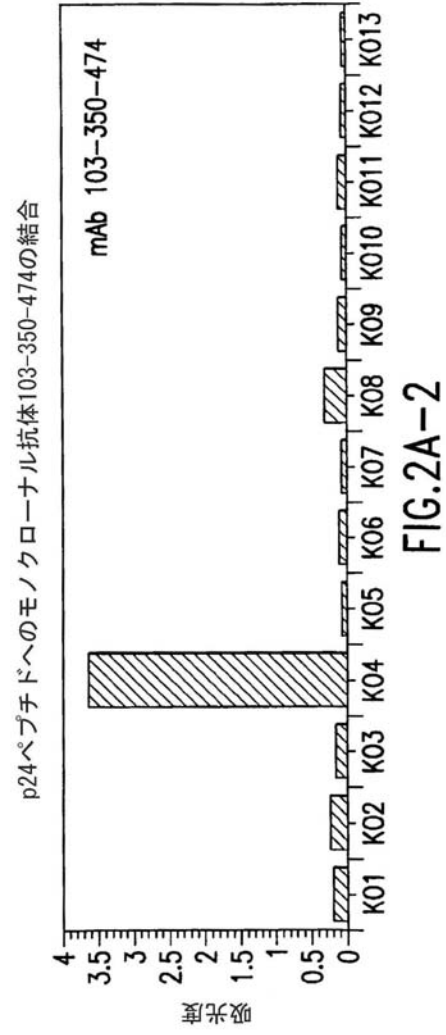


FIG.1B

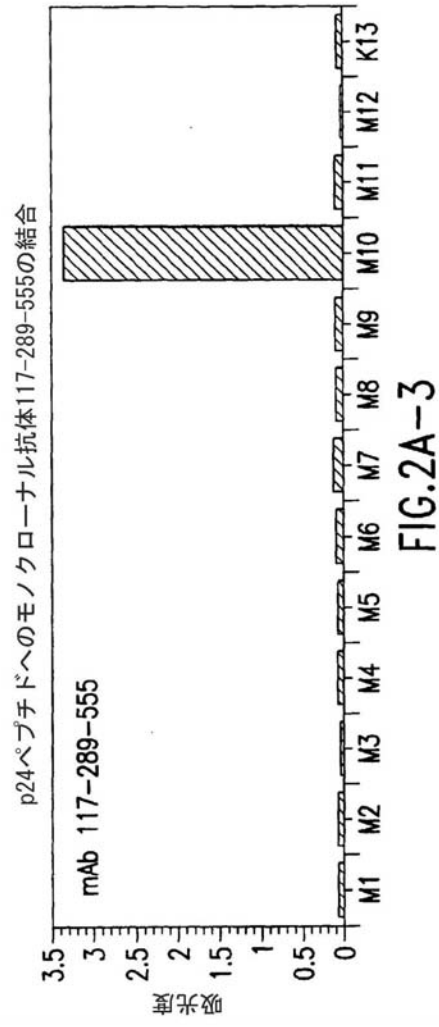
【図 2 A - 1】



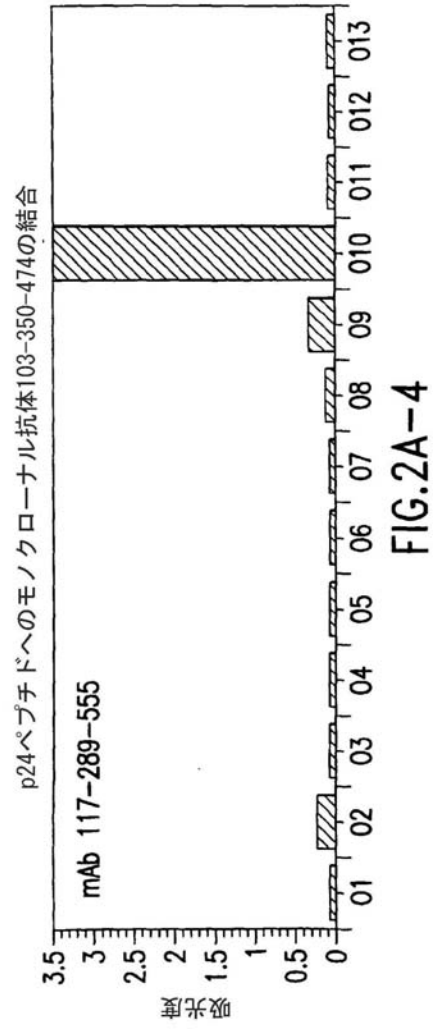
【図 2 A - 2】



【図 2 A - 3】

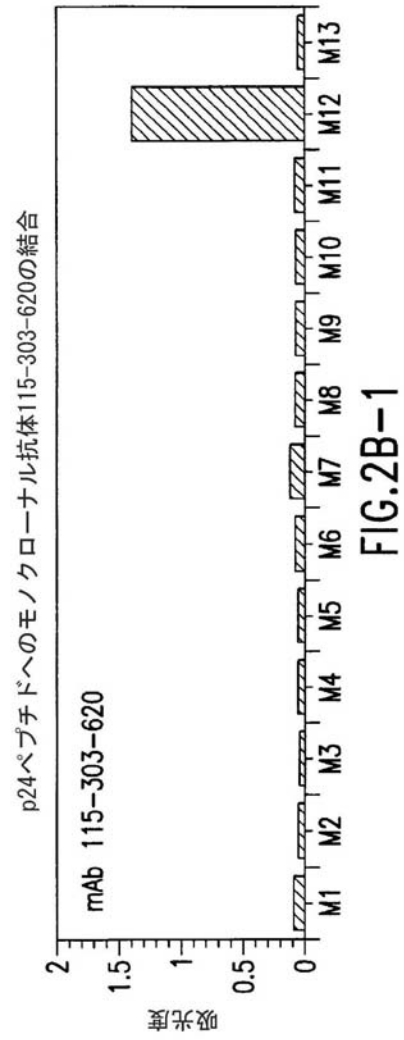


【図 2 A - 4】





【図 2 B - 1】



【図 2 B - 2】

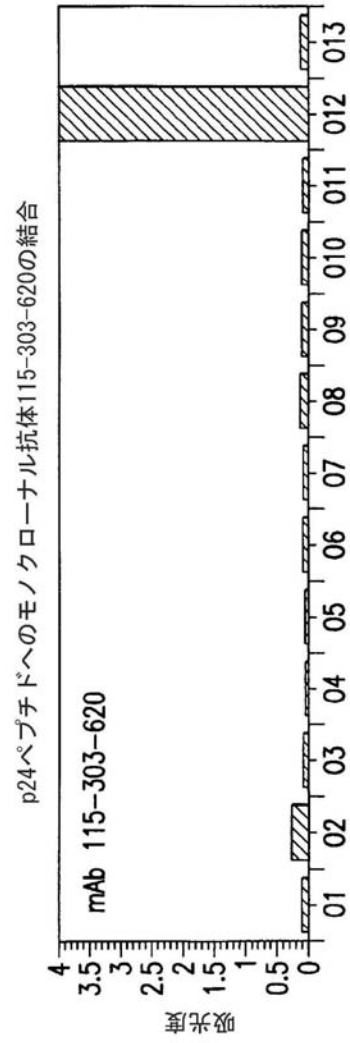
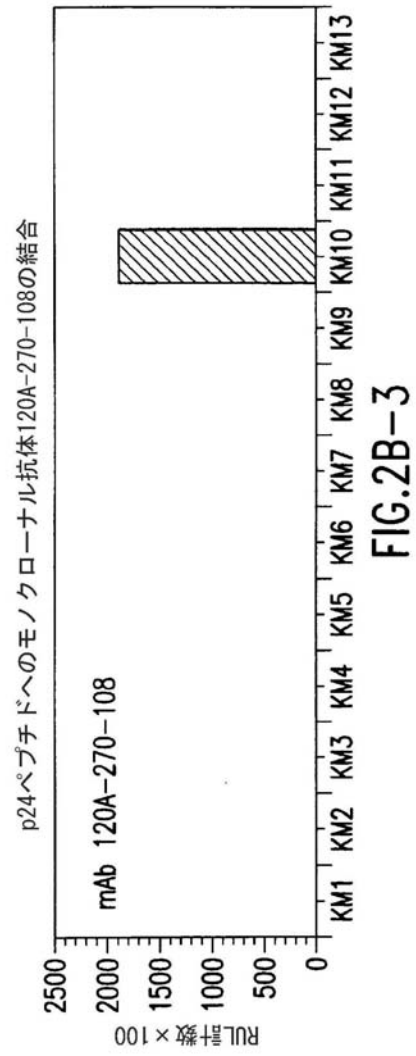


FIG.2B-2

【図 2 B - 3】



【図 2 B - 4】

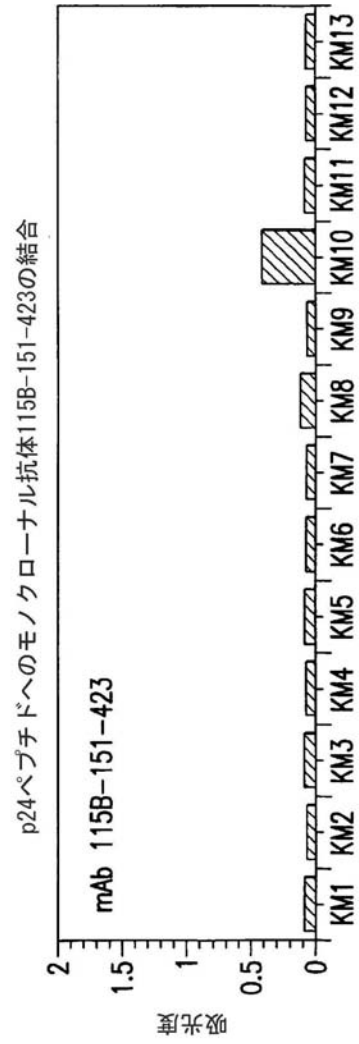


FIG.2B-4

【図 2 B - 5】

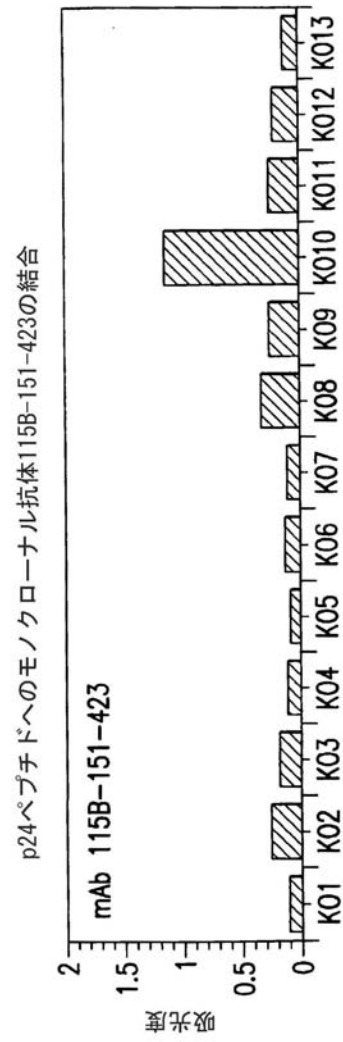


FIG.2B-5

## 【図 3】

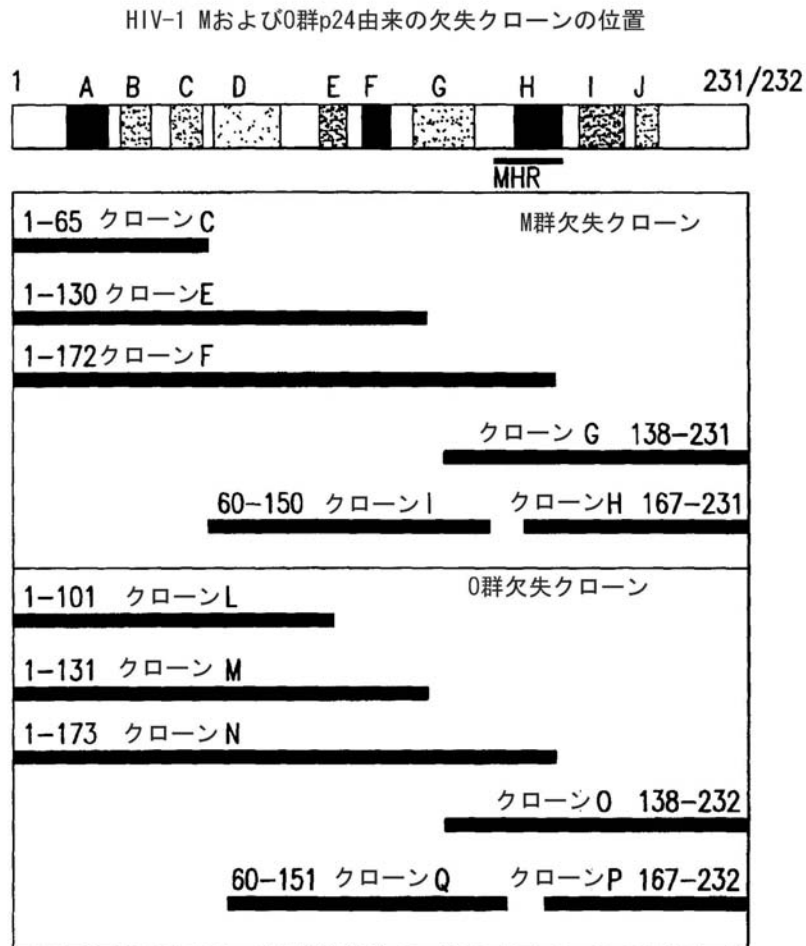
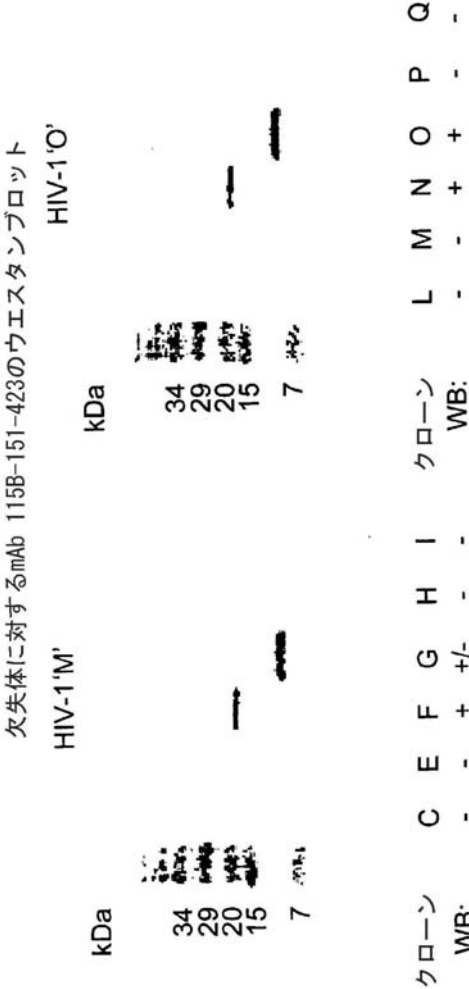


FIG.3

【 図 4 A 】



p24欠失クローンに対するmAbのウエスタンブロット

FIG.4A

【 図 4 B 】

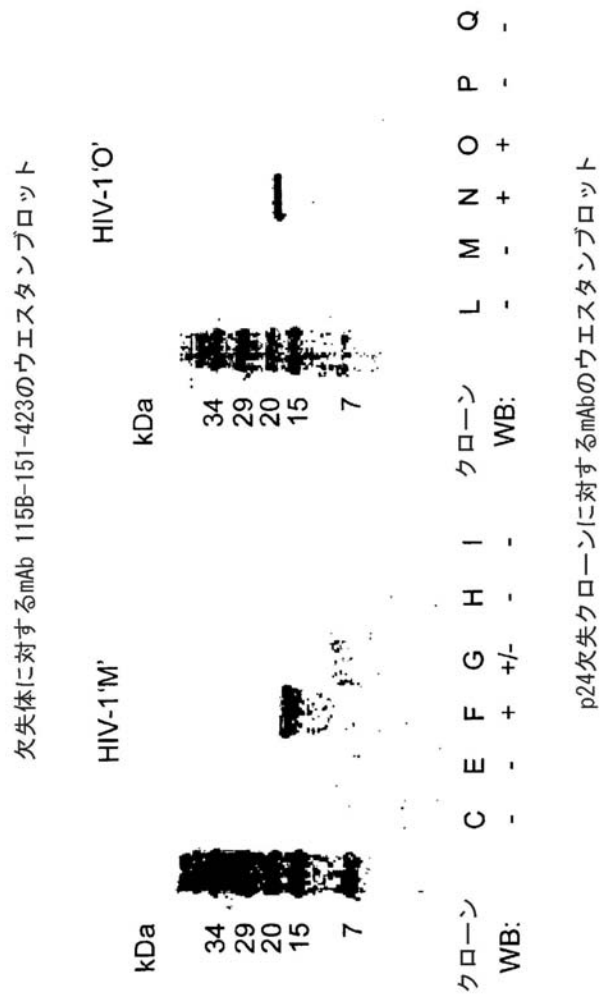


FIG.4B



【図5】

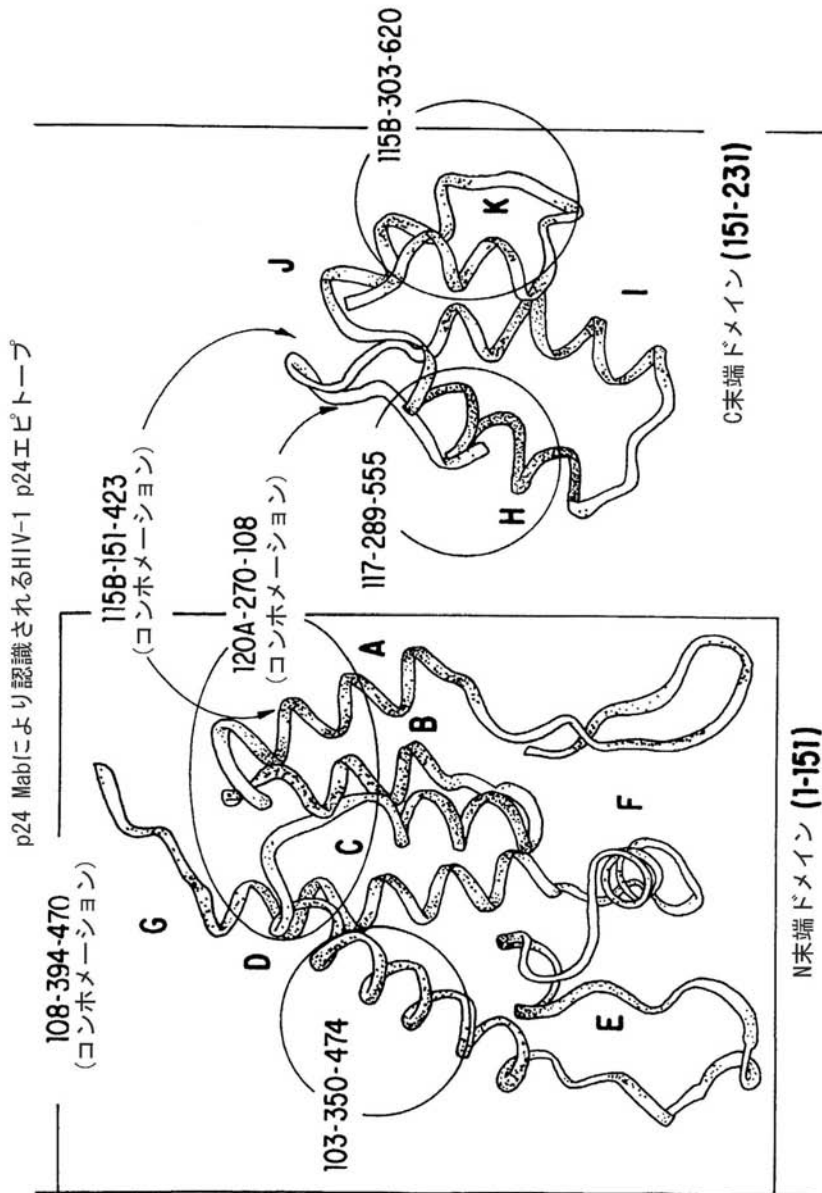


FIG. 5

## 【図6】

PRISM STANDALONE装置上での120A-270-108-uPARTICLE  
および115B-151-423-ACRIによるHIV-1 p24Mの検出

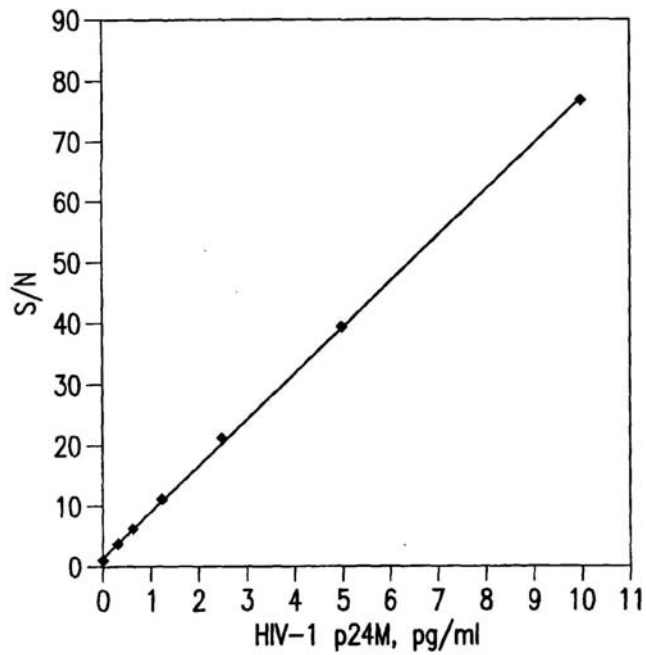


FIG.6

## 【図7】

PRISM STANDALONE装置上での120A-270-108-uPARTICLE  
および115B-151-423-ACRIによるHIV-1 p240の検出

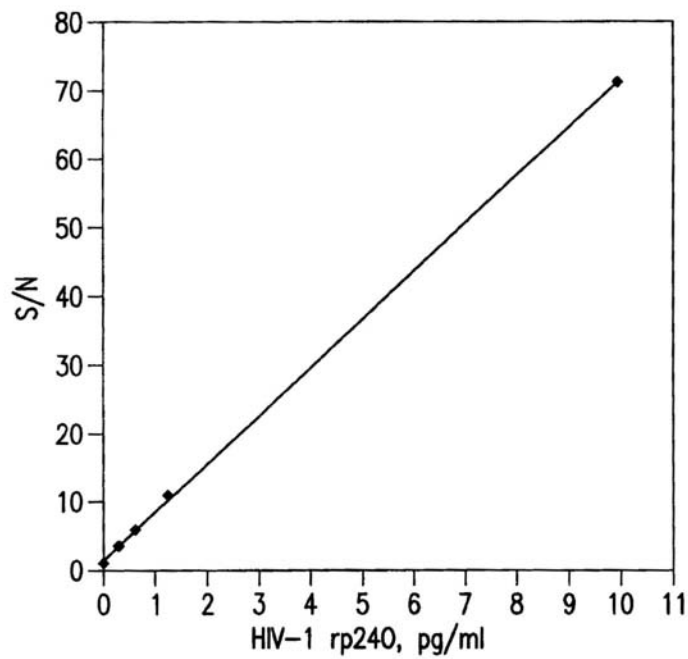


FIG.7

## 【図 8】

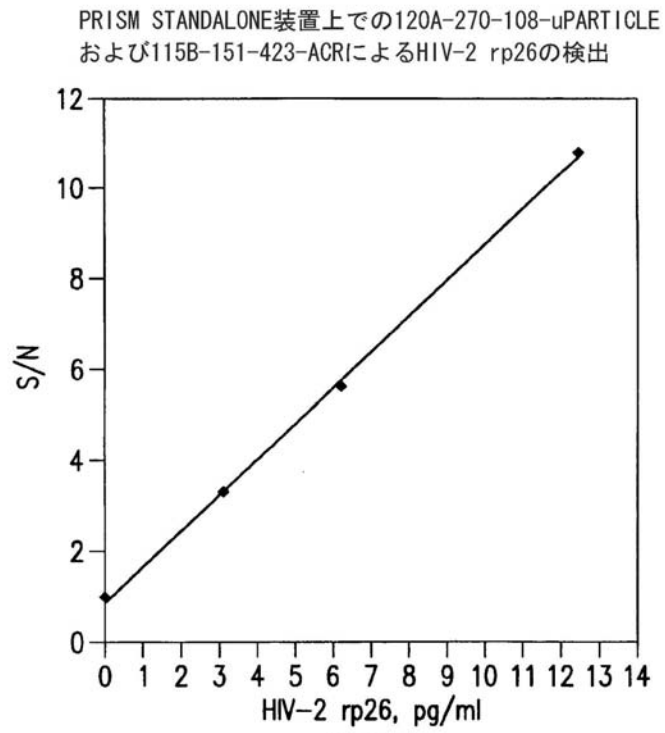


FIG.8

## フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC PTA-2807

## 前置審査

- (74)代理人 100103920  
弁理士 大崎 勝真
- (74)代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明
- (72)発明者 ロウ, シヨン・シー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、バージニア・アベニュー・1312
- (72)発明者 ハント, ジェフリー・シー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンデレイン、サマーセツト・レーン・1901
- (72)発明者 コンラス, ジョン・ジー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60046、レイク・ビラ、ノース・シーダー・バレー・ドライブ・38813
- (72)発明者 チウ, シヤオシン  
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガーニー、シエラ・ブレイス・752
- (72)発明者 シエフエル, ジェイムズ・ダブリュ  
アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンデレイン、バンバリー・ロード・925
- (72)発明者 タイナー, ジョーン・デー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・37835

審査官 滝口 尚良

- (56)参考文献 特開平02-107196(JP, A)  
特表平04-505621(JP, A)  
国際公開第98/040744(WO, A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46  
C12N 15/00-15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
CAplus(STN)