



(10) **DE 10 2016 124 171 A1** 2018.06.14

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2016 124 171.7**

(22) Anmeldetag: **13.12.2016**

(43) Offenlegungstag: **14.06.2018**

(51) Int Cl.: **G01N 33/574 (2006.01)**

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Abviris Deutschland GmbH, 22949 Ammersbek,
DE**

(74) Vertreter:

**Eisenführ Speiser Patentanwälte Rechtsanwälte
PartGmbH, 80335 München, DE**

(72) Erfinder:

Hilfrich, Ralf, 65597 Hünfelden, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

US 2005 / 0 147 961 A1

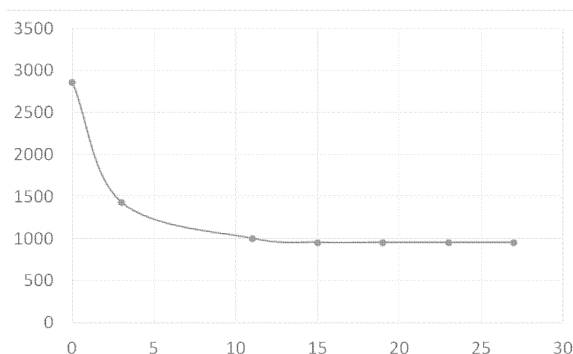
CHRISTENSEN, Neil D., et al. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. Virology, 1996, 223. Jg., Nr. 1, S. 174-184.

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Serologischer Test zur Therapiekontrolle von HPV16 positiven Karzinomen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Therapiekontrolle von HPV16 positiven Karzinomen, einen Antikörper zur Anwendung in einem entsprechenden diagnostischen Verfahren sowie einen Test für die Durchführung des Verfahrens. Durch die vorliegende Erfindung wird zudem ein immunologischer Test in Form eines Kits bereitgestellt, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Therapiekontrolle von HPV16 positiven Karzinomen, einen Antikörper zur Anwendung in einem entsprechenden diagnostischen Verfahren sowie einen Test für die Durchführung des Verfahrens. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein serologisches Verfahren zum Überwachen des Verlaufs einer Antikörpermenge in Proben, die einem Patienten vor und nach der Behandlung eines HPV16 positiven Karzinoms über einen bestimmten Zeitraum entnommen wurden. Weiterhin wird durch die vorliegende Erfindung ein immunologischer Test in Form eines Kits bereitgestellt, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann.

[0002] Es sind mittlerweile weit mehr als 100 Typen Humaner Papillom Viren (HPV) bekannt, welche die Epithelzellen der Haut oder verschiedener Schleimhäute infizieren können. Die HPV Infektionen sind weit verbreitet, und unterschiedlichen HPV-Typen werden unterschiedliche Erkrankungsbilder zugeordnet. So sind HPV vom Typ 1 und HPV vom Typ 2 verantwortlich für Warzen an Händen und Füßen, HPV vom Typ 6 und HPV vom Typ 11 für Genitalwarzen. In vielen Fällen verläuft eine solche Infektion ohne klinische Symptome, es kann aber auch zu einem tumorartigen Wachstum der befallenen Epithelien kommen. Obwohl solche Tumore meist gutartig sind und wie oben aufgeführt lediglich zu einer Warzenbildung führen, ist inzwischen belegt, dass einzelne HPV auch bösartige Veränderungen hervorrufen und daher ursächlich für die Entstehung von Krebs, zum Beispiel im Genitalbereich, aber auch im Mund- und Rachenbereich, sein können.

[0003] Therapiemethode der Wahl dieser bösartigen Tumore ist die Chirurgie, die Bestrahlung, die Chemotherapie, Immuntherapie bzw. eine Kombination der verschiedenen Verfahren. Im Rahmen der Therapiekontrolle nach der Behandlung von HPV positiven Karzinomen ist es wünschenswert, im Körper verbliebene Tumorzellen, aber auch Rezidive oder Metastasen frühzeitig zu erkennen, so dass die erneute Behandlung, z.B. durch eine Chemotherapie oder Immuntherapie, bereits vor der Bildung sichtbarer Sekundärtumore wiederaufgenommen werden kann.

[0004] Verschiedene Publikationen befassen sich mit der Bestimmung von HPV-spezifischen Antikörpern im Serum von Patienten und der diagnostischen und prognostischen Nutzbarmachung der dadurch erhaltenen Werte in Bezug auf das Auftreten bzw. Wiederauftreten von HPV positiven Karzinomen.

[0005] Besonders wertvoll zur Ableitung diagnostischer oder prognostischer Werte sind sog. Tumorantigene, d.h. gewisse Antigenstrukturen, die Teil einer Tumorzelle und spezifisch für diese sind, vom

Immunsystem erkannt werden und eine Immunantwort hervorrufen können. Die sogenannten Tumorantigene HPV E6 und HPV E7 sind hierfür jedoch nur bedingt geeignet, da diese Proteinantigene bei allen HPV Typen vorkommen, über weite Bereiche homolog sind und somit keine typspezifische Aussage zulassen, auch dann, wenn z.B. HPV 16 spezifische E6 oder E7 Proteine für die serologische Bestimmung eingesetzt werden. Diese typspezifische Bestimmung der serologischen Antwort ist jedoch notwendig, um die Reaktion des Immunsystems auf den für den Tumor ursächlichen HPV Typen zu bestimmen, und nicht z.B. die Immunantwort gegen eine gutartige Warze am Fuß, was als ein falsch positives Ergebnis zu bewerten wäre und fatale Konsequenzen für den Patienten haben könnte.

[0006] HPV sind dsDNA-Viren. Die unbehüllten Viren bestehen aus ikosaedrischen Kapsiden. L1 (late protein 1) bestimmt u.a. den Kapsidaufbau des HPV und ist maßgeblich für die Immunogenität von HPV-Typen verantwortlich.

[0007] Af Geijerstam et al. beschreiben in Journal of Infectious Diseases, 177, 1998, 1710-1714 eine Studie, in der Serum-Level von HPV16-Kapsid-spezifischen Antikörpern in erstgebärenden Frauen über einen Zeitraum bis zur zweiten Schwangerschaft bestimmt wurden. Es ergibt sich aus dieser Studie, dass die Menge an HPV16-Kapsid-spezifischen Antikörpern im Serum über mehrere Jahre hinweg stabil bleibt und die Menge der Antikörper mit der Anzahl der Sexualpartner, aber nicht mit einer Erkrankung korreliert.

[0008] Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob HPV16-Infektionen einen Risikofaktor für das spätere Auftreten von Gebärmutterhalskrebs darstellen (Shah et al., Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventions, 6, 1997, 233-237). Die Gegenwart von einer größeren Menge von HPV16-Kapsid-Antikörpern im Serum wurde dabei mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Gebärmutterhalskrebs assoziiert. In den Tests wurde zudem gefunden, dass die HPV16-Kapsid-Antikörper über einen Zeitraum von 7 bis 13 Jahren nicht merklich zurückgingen.

[0009] Koslabova et al. stellten in International Journal of Cancer, 133, 2013, 1832-1839, fest, dass eine langanhaltende Seropositivität gegen HPV16 virus like particles (VLPs), d.h. Kapside, nach Therapie von Tumorpatienten beobachtet wird. Das heißt, dass nach der Therapie ein Abfall der L1 spezifischen Antikörpermenge nicht als Erfolgskontrolle der Therapie sinnvoll erscheint. So heißt es in der Zusammenfassung, dass sich die Titer der Antikörper, die spezifisch für die HPV16-Kapsid-Antigene sind, während der Nachbeobachtung nicht änderten. L1 stellt

daher keinen Marker dar, welcher geeignet zur Verlaufskontrolle oder gar einer Rezidiverkennung wäre.

[0010] Ein weiteres Problem - wie weiter oben bereits angesprochen - ist die fehlende Typspezifität der gängigen Antikörper-Tests. Das L1 oder auch Haupt-Kapsidprotein der HPV kann als Monomer aber auch als Multimer vorkommen. Fünf einzelne L1 Proteine lagern sich zu sogenannten Kapsomeren (oder auch Pentameren) zusammen. 72 Kapsomere, als Untereinheiten der Kapside, lagern sich wiederum zusammen, um das Kapsid der Viren zu bilden, in die bei der natürlichen Infektion die Erbsubstanz verpackt wird. Unterschiede in der Nukleotidsequenz von 10% innerhalb des L1 Gens werden als Voraussetzung definiert, um einen neuen HPV Typ zu beschreiben. Das heißt, dass auch unterschiedliche HPV Typen in fast 90% des L1 Gens und Proteins identisch sein können. Neben dem Hauptkapsidprotein (L1) gibt es auch noch das minore Kapsidprotein L2. Das L2-Protein ist auch ein sehr stark konserviertes, also ein in weiten Bereichen identisches, Protein. Das L2 Protein ist daher auch nicht spezifisch für einzelne HPV-Typen.

[0011] Gleichwohl kann es in beiden Proteinen aber auch Bereiche geben, die für einzelne HPV Typen spezifisch sind (siehe z.B. Christensen). Das heißt, dass typspezifische und nicht -typspezifische (gruppenspezifische - z.B. für High risk Typen, oder auch genusspezifische) Epitope (Bindungsstellen für Antikörper) nebeneinander vorkommen können.

[0012] Da die Antikörper in der Patientenprobe polyklonalen Ursprungs, also gegen sehr viele unterschiedliche Antigene bzw. auch unterschiedliche Bereiche eines Antigens gerichtet sind, kann unter Verwendung von monomeren L1 Proteinen mit dem ‚traditionellen‘ Aufbau eines ELISA-Tests, unter Verwendung von z.B. Peroxidase oder Fluoreszenz markierten anti-IgG spezifischen Konjugaten, zwischen den typspezifischen und nicht typspezifischen L1-Antikörpern nicht differenziert werden. Es wird ausschließlich das Vorhandensein von anti-L1 Antikörpern der mehr als 100 verschiedenen HPV bestimmt, selbst dann wenn das L1-Protein vom HPV-Typ 16 stammt. Auf Grund der sehr hohen Homologie des Proteins innerhalb der Gruppe der HPV ist diese scheinbare Typspezifität des verwendeten L1-Antigens sehr irreführend.

[0013] Im Ergebnis ist die HPV-Serologie für eine Therapiekontrolle von HPV16-positiven Karzinomen nicht geeignet, da es im Stand der Technik akzeptiert ist, dass sich die Antikörpermengen über Jahre hinweg stabil verhalten und auch nach einer Therapie nicht unbedingt abfallen, so dass dieser Parameter für ein Monitoring der Erkrankung nicht geeignet ist. Ferner kann mittels gängiger Antikörpertests

nicht zwischen den verschiedenen HPV-Typen differenziert werden.

[0014] Überraschend wurde nun jedoch herausgefunden, dass bestimmte HPV16-L1-Kapsid-spezifische Antikörper, die an mindestens ein konformationelles Epitop des HPV16-L1-Kapsids binden, welches nicht bei monomeren und/oder denaturierten HPV16-L1-Proteinen vorliegt, ein Abfall und Wiederanstieg der Antikörpermenge zu beobachten ist. Dadurch wird erstmalig nicht nur eine diagnostische Bestimmung der ad hoc Menge von HPV16-L1-Kapsid-spezifischen Antikörpern, sondern darüber hinaus die Erkennung einer rezidivierenden Erkrankung ermöglicht.

[0015] Wird ein HPV16-positiver Primärtumor behandelt, so kann innerhalb weniger Wochen (z.B. zwei Wochen) üblicherweise im Rahmen der Verlaufskontrolle ein Abfall der Antikörpermenge von HPV16-spezifischen L1-Antikörpern beobachtet werden. Diese Antikörpermenge nimmt stetig ab, pendelt sich jedoch auf einem Grundniveau ein, so dass man eine Plateau-Bildung beobachten kann (**Fig. 1**). Fangen im Körper verbliebene HPV16 positive Zellen des Primärtumors wieder an zu wachsen (Rezidiv oder Metastase), so wird ein rascher Wiederanstieg der Antikörpermenge beobachtet (**Fig. 2**).

[0016] Diese Veränderung (Wiederanstieg) der Antikörpermenge wird bereits bei makroskopisch kleinen, für den Kliniker nicht sichtbaren Sekundärtumoren beobachtet, so dass durch den Wiederanstieg wesentlich früher als heute üblich eine Therapiemaßnahme eingeleitet werden kann, und so die Aussicht auf Heilung für den Patienten deutlich ansteigt.

[0017] Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zu Grunde, einen serologischen Test bereitzustellen, der eine hochsensitive und typspezifische Therapiekontrolle von HPV16 positiven Karzinomen ermöglicht und in der Lage ist, ein Wiederkehren der Erkrankung, sei es ein Rezidiv oder eine Metastase, frühzeitig zu erkennen.

[0018] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein in vitro Verfahren zur Therapiekontrolle nach der Behandlung von HPV16-positiven Karzinomen umfassend die oder bestehend aus den folgenden Schritten:

i) Mischen einer Probe von einem Patienten mit einer Vielzahl von Antigenen, wobei die Antigene HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen präsentieren, welche konformationelle Epitope aufweisen, die nicht bei monomeren und/oder denaturiertem HPV16-L1 vorliegen, unter Bedingungen bei denen in der Probe vorhandene Antikörper an die HPV16-L1 Antigene binden können,

ii) Kontaktieren der Mischung aus Schritt i) mit markierten Antikörpern, welche die konformationellen Epitope der HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene spezifisch binden, insbesondere mit markierten Antikörpern, die aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten werden,

iii) Quantifizieren der markierten Antikörper und/oder der Antikörper aus der Probe, welche jeweils an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene gebunden haben,

iv) Wiederholen der Schritte i) bis iii) ein oder mehrere Male mit Proben, die demselben Patienten in bestimmten Zeitabständen entnommen werden, so dass der Verlauf der Menge an Antikörpern im Patienten, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, anhand der Proben über einen bestimmten Zeitraum verfolgt wird, und

v) Bestimmen der Menge an Antikörpern, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, in den Proben, um nach erfolgreicher Therapie einen Abfall der Menge festzustellen, und/oder

vi) Bestimmen der Menge an Antikörpern, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, in den Proben, um ein Wiederauftreten eines HPV16-positiven Karzinoms festzustellen, wenn die Menge an Antikörpern, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, in den Proben innerhalb des bestimmten Zeitraums wieder ansteigt.

[0019] Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es die Menge des Antikörpers in der Patientenprobe über einen Zeitraum zu Quantifizieren und damit den Krankheitsverlauf nach der Therapie zu verfolgen. Beispielsweise können die Schritte i) bis iii) im Abstand von 1 bis 4 Wochen über einen Zeitraum von einem bis zehn Jahren wiederholt werden.

[0020] Als Probe eignet sich eine Körperflüssigkeit, z.B. Vollblut oder Abkömmlinge des Vollbluts wie z.B. Serum oder Plasma, sowie Kapillarblut oder Vollblut aus der Fingerbeere des Patienten. Für die Durchführung des Verfahrens ist ein Tropfen (ca. 25 µL) ausreichend.

[0021] Die Patientenprobe kann in Schritt i) über einen Zeitraum von 1 bis 15 Minuten, bevorzugt von 3 bis 10 Minuten inkubiert werden. Dadurch wird gewährleistet, dass es zu spezifischen Interaktionen kommt.

[0022] Unter der Therapie ist insbesondere eine Primärtherapie mittels Chirurgie, Bestrahlung, Chemo-

therapie oder Immuntherapie oder eine Kombination dieser Methoden zu verstehen.

[0023] Unter einer HPV16-L1-Kapsomer-Struktur ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Aggregat bzw. Multimer des HPV16-L1 Proteins zu verstehen, welches auf seiner Oberfläche durch die Interaktion mehrerer L1-Proteine konformationelle Epitope bildet, die bei L1-Monomeren oder den denaturierten Proteinen nicht vorliegen. Insbesondere werden erfindungsgemäß Virus-ähnliche Partikel (VLPs, virus like particles) eingesetzt, die die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen präsentieren. Dabei können einzelne VLPs mehrere der konformationellen Epitope, d.h. spezifischen Bindungsstellen, aufweisen.

[0024] Unter einem VLP (virus-like particle) ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Virus-Partikel zu verstehen, das aus viralen Kapsiden besteht, aber keine Nukleinsäuren enthält. Die VLPs sind daher dazu geeignet die oben beschriebenen konformationellen Epitope zu präsentieren ohne selbst replikationsfähig zu sein.

[0025] Bei dem markierten Antikörper handelt es sich um einen gegen HPV16-L1 gerichteten Antikörper, der spezifisch an die konformationellen Epitope der HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen bindet und demnach nicht an monomere und/oder denaturierte HPV16-L1-Proteine. Ein erfindungsgemäß bevorzugter Antikörper kann aus der Hybridom-Zelllinie erhalten werden, die unter dem Budapest Vertrag am 14. September 2016 bei der Leibniz-Institut Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland, unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 hinterlegt wurde. Für die Markierung des Antikörpers sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik Methoden bekannt, die eine Quantifizierung der Menge an freiem und gebundenem Antikörper erlauben. Besonders bevorzugt wird der Antikörper mit Goldpartikeln markiert.

[0026] Für die Detektion können kommerziell erhältliche Reader für Teststreifen, z.B. EseQuant von QIAGEN, verwendet werden. Die Messung kann photooptisch oder durch Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgen. Alternativ können auch farblich- oder radioaktivmarkierte Partikel (Vesikel) eingesetzt werden.

[0027] Dabei ist das Verfahren für den HPV-Typ 16 absolut spezifisch und es kommt zu keiner Kreuzreaktion mit anderen Antikörpern. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass die Kapsomer-Strukturen als L1-Aggregate vorliegen, wodurch die konformationellen Epitope auf der Oberfläche präsentiert werden.

[0028] Wenn das L1 Protein Aggregate (Synonyme sind Multimere, Pentamere oder auch Kapsomere) bildet, entstehen auf der Oberfläche (bei den Kapsiden nach außen gerichtete Bereiche) dieser Aggregate durch die Interaktion mehrerer L1 Proteine, Strukturen (konformationelle Epitope - Bindungsstellen für Antikörper) die spezifisch für einzelne HPV-Typen (also typspezifisch) sind.

[0029] Die stark homologen Bereiche des L1 Proteins sind dagegen so ausgerichtet, dass sie sich nicht auf der Oberfläche, sondern im Inneren befinden. Diese Bereiche sind für den Einbau der viralen Erbsubstanz notwendig. Das heißt, bei den Viren oder auch den für die Testung eingesetzten nicht infektiösen Virus ähnlichen Partikel (VLPs) sind die oben beschriebenen, innerhalb der Familie der Papillomviren sehr stark übereinstimmenden, Bereiche im Inneren der Partikel verborgen. Diese Bereiche sind daher in VLPs nicht mehr für die gruppenspezifischen Antikörper in menschlichen Proben zugänglich, wodurch gewährleistet wird, dass ausschließlich typspezifische Antikörper nachweisbar werden.

[0030] Jedoch lässt sich bei der VLP-Aufreinigung monomeres Protein nicht zu 100% abtrennen. VLP-Aufreinigungen enthalten aber auch immer Kapsomere. Dies bedeutet, wenn man diese aufgereinigten L1 Proteine direkt an ein Trägermedium immobilisiert (z.B. auf klassischen ELISA-Platten), stehen sowohl typspezifische VLPs, aber auch monomeres L1 Protein und Kapsomere mit nicht-typspezifischen Bereichen für die Testung zur Verfügung.

[0031] Diese Kontamination der typspezifischen L1 VLPs mit monomerem oder denaturiertem Protein führt dazu, dass typspezifische Antikörpern in einem Antikörpergemisch, wie z.B. humanen Proben, nicht mehr (verlässlich) identifiziert werden können, da man nicht bestimmen kann, ob das Messergebnis auf die typspezifischen bzw. gruppenspezifischen Bindungsstellen zurückzuführen ist.

[0032] Gleiches gilt für VLPs, die aus dem L1 und dem L2 Protein bestehen.

[0033] Durch den Ansatz der Kompetition der Patientenantikörper mit dem erfindungsgemäßen HPV 16-spezifischen L1-Antikörper, kann diese ‚Kontaminationsproblematik‘ gelöst werden, da das Testsystem ausschließlich HPV16 L1-spezifische Antikörper messen kann, die mit dem erfindungsgemäßen Antikörper konkurrieren.

[0034] Es ist daher erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Antigene nicht immobilisiert sind, sondern in einer flüssigen Phase vorgelegt werden, in die die Patientenprobe hinein gegeben wird.

[0035] Dies hat wesentliche Vorteile, bzw. folgende Hintergründe: Die Antigene (VLPs) werden durch das Immobilisieren und das anschließend für den Verkauf der ELISA-Platten notwendige Konservieren (durch Trocknung - Verlust der Hydrathülle verursacht Konformationsänderungen des Proteins) verändert, d.h. sie verlieren ihre typspezifischen Epitope, sind also für die Testung wertlos geworden. Durch Zugabe der Patientenprobe in die VLP-Lösung kommen die Antikörper der Patientenprobe und das Antigen in unmittelbare räumliche Nachbarschaft. Dadurch wird die Kinetik der Bindungsreaktion deutlich schneller, was für einen Schnelltest extrem nützlich sein kann. Darüber hinaus wird die analytische Sensitivität erhöht, da alle Antikörper der Patientenprobe ‚schnell‘ für die Untersuchung zur Verfügung stehen.

[0036] Beim Immobilisieren auf einem Trägermaterial, z.B. eine Mikrotiterplatte, stehen dagegen nur die Antikörper in unmittelbarer räumliche Nachbarschaft zur Oberfläche als Reaktionspartner zur Verfügung. Die Antikörper, die sich im Lumen des Reaktionsgefäßes befinden, werden praktisch ‚nie‘ an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes gelangen, da sie die Entfernung zur Oberfläche von 1-2 mm ausschließlich über die Brownsche Molekularbewegung überwinden können, was ‚viel‘ Zeit in Anspruch nimmt.

[0037] Bevorzugt ist auch ein Verfahren wie oben beschrieben, wobei die Patientenprobe zeitgleich mit den Antigenen gemischt und mit den markierten Antikörpern kontaktiert wird.

[0038] Vorteilhafterweise ist es auch möglich, die Patientenprobe zeitgleich mit den Antigenen und mit den markierten Antikörpern zu mischen bzw. zu kontaktieren. Dabei kommt es zu einer direkten Kompetition der Antikörper aus der Patientenprobe und der markierten Antikörper um die Bindungsstellen, was aufgrund der schnellen Bindungskinetik wie oben beschrieben, bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls zu akkuraten Testergebnissen führt. Dadurch lässt sich das Testverfahren in einem Schritt durchführen.

[0039] Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren wie oben beschrieben, wobei in Schritt ii) die Mischung über einen Teststreifen läuft, auf dem die markierten Antikörper in mobiler Form vorgelegt sind und worin in Schritt iii) Komplexe aus Antigen und markiertem Antikörper durch Bindung an weitere Antikörper detektiert werden, vorzugsweise handelt es sich bei den weiteren Antikörpern ebenfalls um solche, die aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten werden.

[0040] Diese Ausführungsform ermöglicht es einen Schnelltest bereitzustellen, bei dem in einer Reaktionszone eine schnell ablesbare Testergebnislinie sichtbar wird.

[0041] Die Mischung aus Schritt i) wird auf einer Auftragsstelle auf dem Teststreifen aufgebracht und läuft dann beispielsweise durch Ausnutzung von Kapillarkräften über eine Membran, wobei sie auf einer Strecke bis zur Reaktionszone mit den markierten Antikörpern in Kontakt kommt. Dabei sind die markierten Antikörper so konzentriert, dass nicht alle Antigene bzw. Bindungsstellen abgesättigt werden. In der Reaktionszone sind weitere Antikörper immobilisiert, die ebenfalls für die erfindungsgemäßen Antigene bzw. Bindungsstellen spezifisch sind und die markierten Antikörper-Antigen-Komplexe binden, sofern noch freie Bindungsstellen vorhanden sind. Dadurch werden die markierten Antikörper-Antigen-Komplexe in der Reaktionszone festgehalten, wodurch eine Testlinie sichtbar wird. Sind die Antigene bzw. Bindungsstellen bereits durch die Antikörper aus der Patientenprobe besetzt, bilden sich durch den kompetitiven Ansatz weniger Antikörper-Antigen-Komplexe mit den markierten Antikörpern und die Testlinie ist weniger intensiv bzw. gar nicht sichtbar, falls sämtliche Bindungsstellen bereits durch die Antikörper aus der Patientenprobe bereits beim Auftragen abgesättigt waren. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die richtige Einstellung der Menge an Antigenen bzw. Bindungsstellen in Schritt i) und markierten Antikörpern in Schritt ii), so dass eine Veränderung in der Antikörpermenge in der Patientenprobe gegenüber einer früheren Bestimmung festgestellt werden kann.

[0042] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch Antikörper zur Anwendung in einem diagnostischen Verfahren, insbesondere in einem Verfahren zum Feststellen des Wiederauftretens eines HPV16 positiven Karzinoms nach der Behandlung, wobei der Antikörper konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigenen spezifisch bindet, bevorzugt ist ein Antikörper, der aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten wird.

[0043] Zudem betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Antigen zur Anwendung in einem diagnostischen Verfahren, insbesondere in einem Verfahren zum Feststellen des Wiederauftretens eines HPV16 positiven Karzinoms nach der Behandlung, wobei das Antigen HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentiert, bevorzugt ist ein Virus-ähnliches Partikel, welches die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentiert.

[0044] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin auch ein Kit zur Bestimmung einer Antikörpermenge in einer Probe von einem Patienten umfassend oder bestehend aus:

I) einer Zusammensetzung enthaltend Antigene, die konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentieren, und

II) einer Zusammensetzung enthaltend markierte Antikörper, die konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigenen spezifisch binden, vorzugsweise werden die markierten Antikörper aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten.

[0045] Bei der Zusammensetzung i) handelt es sich dabei bevorzugt um eine Zusammensetzung, welche Virus-ähnliche Partikel enthält, die die konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentieren.

[0046] Ein erfindungsgemäßes Kit kann auch einen Teststreifen umfassen, welcher optional in einer Testkassette vorliegt, die über Öffnungen zum Auftragen der Mischung aus Schritt i), sowie zum beobachten einer Testlinie sowie bevorzugt einer Kontrolllinie verfügt. Der Teststreifen umfasst an einem Ende eine Auftragszone für die Mischung aus Schritt i), ein Kissens, auf dem die markierten Antikörper vorgelegt sind und welches sich an die Auftragszone anschließt, sowie eine Reaktionszone welche sich auf der anderen Seite des Kissens aus Sicht der Auftragszone befindet und bevorzugt eine Kontrollzone, weiter jenseits der Reaktionszone. In der Reaktionszone befindet sich der weitere Antikörper, welcher das erfindungsgemäße Epitop spezifisch bindet und durch Bindung der markierten Antikörper-Antigen-Komplexe die Testlinie sichtbar macht. Eine weitere davon unabhängige Antikörper-Reaktion in der Kontrollzone weist dabei den korrekten Ablauf des Tests nach. Das Auftauchen einer Linie in der Kontrollzone bestätigt, dass das Probenvolumen ausreichend war und der Test wie beabsichtigt abgelaufen ist.

Figurenliste

Fig. 1 zeigt den Verlauf der Antikörpermenge im Serum eines Patienten mit positivem Therapieverlauf über 27 Wochen nach der Primärtherapie eines HPV16 positiven Karzinoms. Auf der X-Achse sind die Wochen beginnend mit 0 zum Zeitpunkt der Primärtherapie gezeitigt, auf der Y-Achse die Konzentration des erfindungsgemäßen Antikörpers in ng/ml.

Fig. 2 zeigt den Verlauf der Antikörpermenge im Serum eines Patienten, bei dem etwa 35 Wochen nach der Primärtherapie eines HPV16 positiven Karzinoms ein Rezidiv auftrat. Bis zur Woche 27 wurde ein permanenter Abfall der Antikörpermenge beobachtet. Zur Woche 31 stieg die Antikörpermenge wieder an. Dieser Anstieg setzte sich bis zur Woche 35 fort, dem Zeitpunkt wo das klinische Korrelat gefunden wurde. Auf

der X-Achse sind die Wochen beginnend mit 0 zum Zeitpunkt der Primärtherapie gezeigt, auf der Y-Achse die Konzentration des erfindungsgemäßen Antikörpers in ng/ml.

Beispiel 1: Screeningverfahren zum Auffinden der erfindungsgemäßen Antikörper und Antigene

[0047] Herstellung papillomvirusähnlicher Partikel (VLPs): Das L1-Gen von HPV16 (Gen-Bank: K02718.1) wurde über PCR amplifiziert und in den Transfektor pVL1392 kloniert. Die rekombinanten Vektoren wurden zusammen mit BaculoGold DNA (Pharmingen) in Sf9 Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation eingebracht. Rekombinante Viren wurden entsprechend der Herstellerangaben amplifiziert und über Plaquesassay gereinigt.

[0048] Virus-ähnliche Partikel (VLPs) wurden nach Volpers et al. gereinigt. (Volpers, C., P. Schirmacher, R. E. Streeck, and M. Sapp. 1994. Assembly of the major and the minor Kapsid protein of human papilloma virus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* **200**:504-512.

[0049] Herstellung, Screening und Klonierung der monoklonalen Antikörper. BALB/c Mäuse wurden subkutan mit 20µg in phosphat-gepuffertem Salzlösung (PBS) gelöster intakter HPV-16 VLPs immunisiert, nachdem diese mit kompletten Freund's Adjuvant gemischt worden waren. Die Immunisierung wurde nach einem Monat und nach drei Monaten wiederholt.

[0050] Drei Tage nach der dritten Immunisierung wurde die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Milzzellen wurden mit der Maus-Myelomzelllinie X63Ag8.653 mit Hilfe von Polyethylenglycol **2500** (Boehringer Mannheim) fusioniert und in Iscoves modified Eagle Medium (IMDM) in Anwesenheit von 10% fötalem Kälberserum in 96-Loch-Schalen kultiviert. Fusionierte Zellen wurden mit Azaserin und Hypoxanthin selektioniert. Nach **6** bis **8** Tagen wurden die Überstände der Zellen mit Hilfe des ELISAs auf die Sekretion von HPV16 L1 spezifischen Antikörpern getestet. Denaturiertes L1 Protein, sowie VLPs von HPV-**6**, HPV-**11**, HPV-**18**, HPV-**31**, HPV-**33** und HPV-**39** dienten als Kontrollen, um unspezifische Reaktivitäten auszuschließen.

Beispiel 2: Beobachtung des Abfalls der Antikörpermenge bei einem Patienten nach erfolgreicher Therapie

[0051] Patient männlich, Alter **53** Jahre, mit onkologischer Kombinationstherapie (Chirurgie/ Radiochemotherapie) bei einem HPV16 positiven Tonsillenkarzinom. Dem Patient wurden am Tag vor Therapiebeginn 5 ml Blut entnommen, um Patientenserum zu ge-

winnen. Die Testung des Serums bei Therapiebeginn ergab eine Antikörperkonzentration von 13200 ng/ml.

[0052] Sechs Wochen nach der Primärtherapie wurde dem Patient erneut 5 ml Blut abgenommen, um Serum zu gewinnen. Bei der erneuten Testung wurde eine Antikörperkonzentration von 5600 ng/ml gemessen. Dies entspricht einem Abfall der Antikörperkonzentration von über 50% innerhalb von 6 Wochen.

[0053] Mit dem Abfall der Antikörpermenge kann eine erfolgreiche Therapie kontrolliert werden, da die das Tumorantigen HPV16 L1 bildenden Tumorzellen erfolgreich entfernt wurden, und das Tumorantigen (HPV16 L1 Protein) das Immunsystem nicht mehr zur Bildung von HPV16 L1 spezifischen Antikörpern anregt.

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Af Geijerstam et al. beschreiben in Journal of Infectious Diseases, 177, 1998, 1710-1714 [0007]
- Shah et al., Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventions, 6, 1997, 233-237 [0008]
- Koslabova et al. stellten in International Journal of Cancer, 133, 2013, 1832-1839 [0009]
- Volpers, C., P. Schirmacher, R. E. Streeck, and M. Sapp. 1994 [0048]

Patentansprüche

1. In vitro Verfahren zur Therapiekontrolle nach der Behandlung von HPV16-positiven Karzinomen umfassend die oder bestehend aus den folgenden Schritten:

- i) Mischen einer Probe von einem Patienten mit einer Vielzahl von Antigenen, wobei die Antigene HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen präsentieren, welche konformationelle Epitope aufweisen, die nicht bei monomeren und/oder denaturiertem HPV16 L1 vorliegen, unter Bedingungen bei denen in der Probe vorhandene Antikörper an die HPV16-L1 Antigene binden können,
- ii) Kontaktieren der Mischung aus Schritt i) mit markierten Antikörpern, welche die konformationellen Epitope der HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene spezifisch binden, insbesondere mit markierten Antikörpern, die aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten werden,
- iii) Quantifizieren der markierten Antikörper und/oder der Antikörper aus der Probe, welche jeweils an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene gebunden haben,
- iv) Wiederholen der Schritte i) bis iii) ein oder mehrere Male mit Proben, die demselben Patienten in bestimmten Zeitabständen entnommen werden, so dass der Verlauf der Menge an Antikörpern im Patienten, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, anhand der Proben über einen bestimmten Zeitraum verfolgt wird, und
- v) Bestimmen der Menge an Antikörpern, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, in den Proben, um nach erfolgreicher Therapie einen Abfall der Menge festzustellen, und/oder
- vi) Bestimmen der Menge an Antikörpern, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, in den Proben, um ein Wiederauftreten eines HPV16-positiven Karzinoms festzustellen, wenn die Menge an Antikörpern, die an die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigene binden, in den Proben innerhalb des bestimmten Zeitraums wieder ansteigt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Antigene nicht immobilisiert sind, sondern in einer flüssigen Phase vorgelegt werden, in die die Patientenprobe hinein gegeben wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Patientenprobe zeitgleich mit den Antigenen gemischt und mit den markierten Antikörpern kontaktiert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in Schritt ii) die Mischung über einen Teststreifen läuft, auf dem die markierten Antikörper in mobiler Form vorgelegt sind und worin in Schritt iii) Komplexe aus Antigen

und markiertem Antikörper durch Bindung an einen weiteren Antikörper detektiert werden, wobei es sich vorzugsweise bei den weiteren Antikörpern ebenfalls um solche handelt, die aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten werden.

5. Antikörper zur Anwendung in einem diagnostischen Verfahren, insbesondere in einem Verfahren zum Feststellen des Wiederauftretens eines HPV 16 positiven Karzinoms nach der Behandlung, wobei der Antikörper konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigenen spezifisch bindet, und wobei ein Antikörper bevorzugt ist, der aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten wird.

6. Antigen zur Anwendung in einem diagnostischen Verfahren, insbesondere in einem Verfahren zum Feststellen des Wiederauftretens eines HPV16 positiven Karzinoms nach der Behandlung, wobei das Antigen HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen präsentiert, und wobei ein Virus-ähnlicher Partikel bevorzugt ist, welcher die HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen präsentiert.

7. Kit zur Bestimmung einer Antikörpermenge in einer Probe von einem Patienten umfassend oder bestehend aus:

I) einer Zusammensetzung enthaltend Antigene, die konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentieren, und

II) einer Zusammensetzung enthaltend markierte Antikörper, die konformationelle Epitope von HPV16-L1-Kapsomer-Strukturen-präsentierenden Antigenen spezifisch binden, wobei vorzugsweise die markierten Antikörper aus der Hybridom-Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC3306 erhalten werden.

Es folgt eine Seite Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

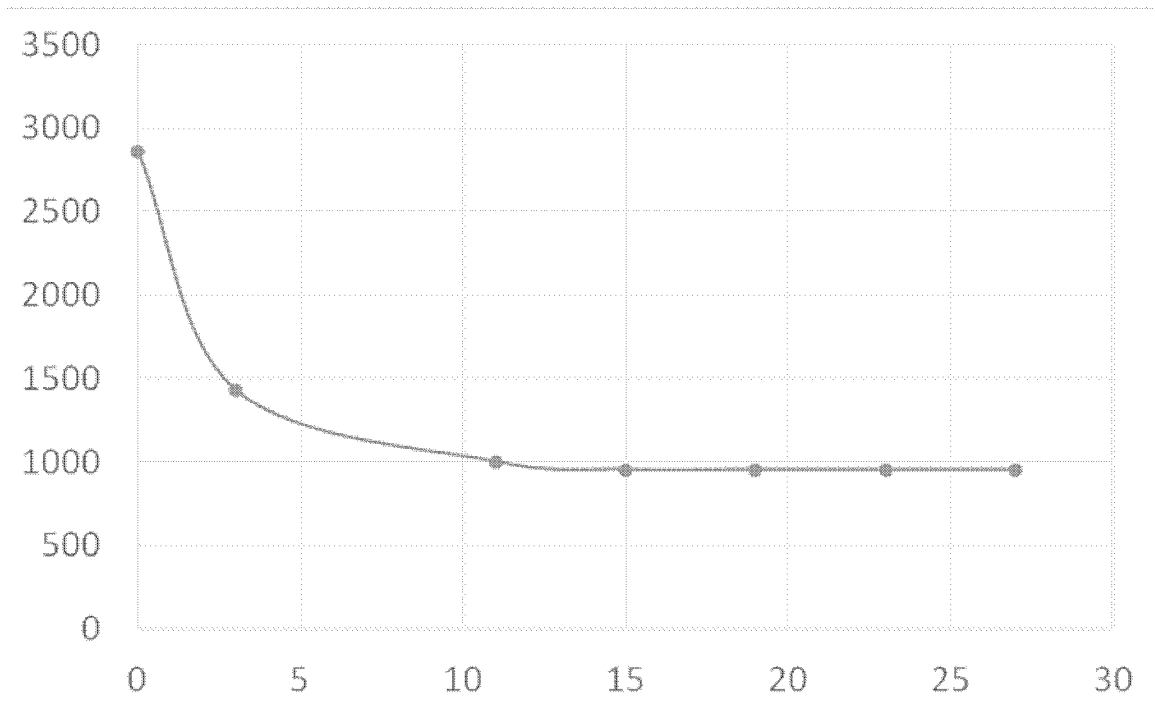


Fig. 1

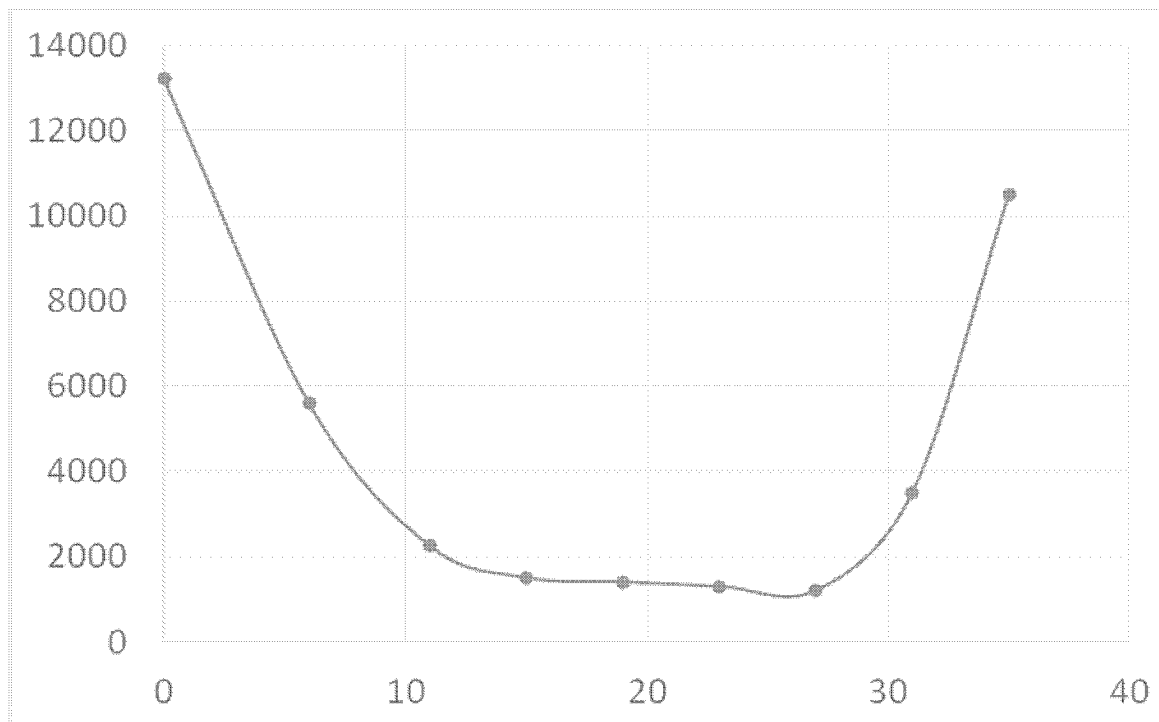


Fig. 2