



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0094857
(43) 공개일자 2016년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57411 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0009393
(22) 출원일자 2016년01월26일
심사청구일자 2016년01월26일
(30) 우선권주장
1020150015316 2015년01월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울 동작구 흑석로84
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김홍진
서울특별시 양천구 목동동로 258, 101동 1802호 (목동, 금호1차아파트)
김형진
서울특별시 동작구 상도로55길 47, 206동 203호 (상도동, 래미안상도2차아파트)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 16 항

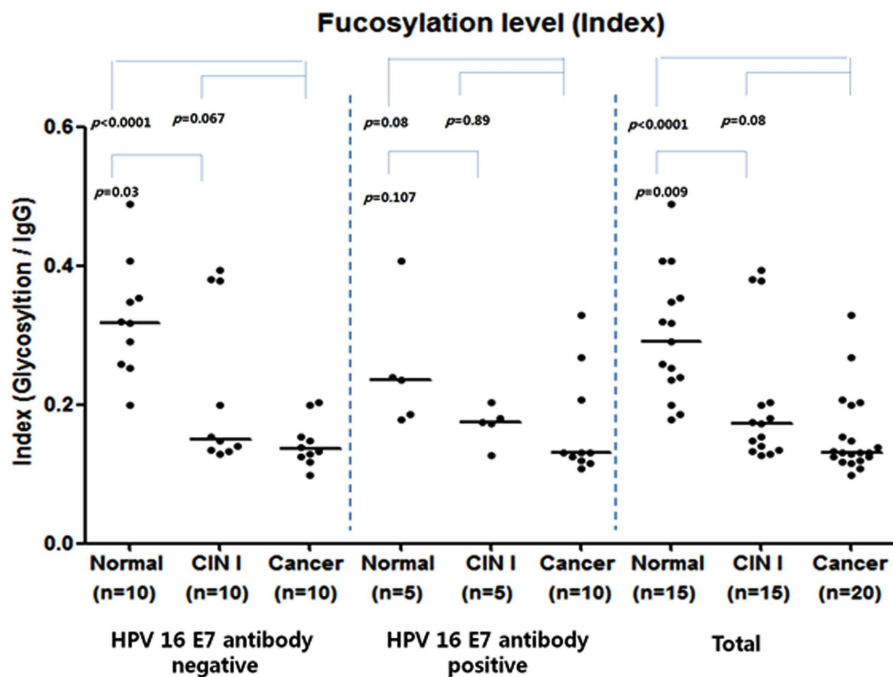
(54) 발명의 명칭 혈중 항체의 당질분석을 통한 자궁경부암의 진단방법 및 이를 이용한 진단키트

(57) 요약

본 발명은 자궁경부암 진단 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 혈액 내 항체의 당질 분석을 통해 자궁경부암을 진단하는 방법 및 이를 이용한 자궁경부암 진단키트에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 정상인 또는 중증도가 낮은 자궁경부전암 환자 혈액 내 항체의 당질 수준에 비해 자궁경부암 (뒷면에 계속)

대표도 - 도14



환자 혈액 내 항체의 당질 수준이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한 본 발명기술을 이용할 경우 낮은 증도의 자궁경부전암 환자와 정상인을 구분해낼 수 있다. 이러한 항체의 당질 수준 감소는 항-인유두종바이러스 항체에서 더 뚜렷하게 나타났다. 따라서, 혈액 내 항체의 당질 수준 분석을 통해 정상인 또는 자궁경부암 발병 위험이 낮은 사람과 자궁경부암 환자를 높은 수준의 민감도와 특이도로 구분할 수 있기 때문에, 피검체의 시료로부터 자궁경부암을 간단하면서 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.

또한, 본 발명에서 제시한 항체의 당질 수준 분석법을 임상 진단에 적용할 경우 암 진단의 정확도를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/6857 (2013.01)

G01N 2333/025 (2013.01)

G01N 2333/4724 (2013.01)

(72) 발명자

김승철

서울특별시 서초구 잠원로 37-48, 201동 903호 (잠원동, 신반포한신아파트)

김윤환

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 2201호 (정자동, 파크뷰)

주요

서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 307동 602호 (반포동, 반포미도아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법:

- (1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계;
- (2) 상기 단계 (1)을 통해 생성된 항원-항체 반응물에 렉틴을 가하여 결합시키는 단계;
- (3) 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준(level)을 측정하여 정상대조군 혈액의 항체의 렉틴 결합 수준과 비교하는 단계; 및
- (4) 정상대조군에 비하여 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준이 감소되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.

청구항 2

하기의 단계를 포함하는 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법:

- (1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계; 및
- (2) 정상대조군에 비하여 상기 항원과 결합하는 항체 수준이 증가되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단계 (1) 전에, 상기 피검체 유래 혈액으로부터 정제된 항체를 획득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 정제된 항체는 protein A 또는 protein G 크로마토그래피를 통해 획득되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 (2) 이후, 상기 렉틴과 결합한 상기 항원-항체 반응물에 스트렙타디빈-결합된 발색 효소 또는 형광물질을 가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항원은 단백질 A 또는 단백질 G인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1항에 있어서, 상기 항원은 인유두종바이러스의 유전자에서 유래한 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 인유두종바이러스 유전자 유래한 단백질은 인유두종바이러스의 E7 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 단계 (2)에서, 상기 렉틴은 시알산(sialic acid), 푸코오스(fucose), 갈락토오스(galactose) 또는 만노오스(mannose)와 결합하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 렉틴은 SNA(Sambucus Nigra Lectin), ConA(Concanavalin A), RCA I(Ricinus communis Agglutinin I) 및 AAL(Aleuria Aurantia Lectin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 단계 (2)에서, 상기 렉틴은 바이오틴(biotin)으로 표지된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 단계 (3)에서의 측정은 SDS-PAGE, ELLA(enzyme-linked lectin assay), 웨스턴블랏팅(Western blotting)법, ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 조합을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

피검체 유래 혈액 내 항체와 결합하는 항원이 고정된 기질, 바이오틴 표지된 렉틴 및 스트렙타비딘-결합 발색효소를 포함하는, 자궁경부암 진단 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 기질은 니트로셀룰로오즈 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지로 합성된 96 웰 플레이트(96 well plate), 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 진단키트.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 렉틴은 SNA(Sambucus Nigra Lectin), ConA(Concanavalin A), RCA I(Ricinus communis Agglutinin I) 및 AAL(Aleuria Aurantia Lectin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 자궁경부암 진단 키트.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 발색효소는 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 형광염료 (fluorescence dye) 및 루시페라제(luciferase)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 자궁경부암 진단 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자궁경부암 진단 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 혈중 내 항체의 당질 분석을 통해 자궁경부암을 진단하는 방법 및 이를 이용한 자궁경부암 진단키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자궁경부암은 전 세계 여성암 사망 원인의 두 번째를 차지하는 질병으로 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV) 감염이 자궁경부암 발병 원인의 거의 대부분을 차지한다. 전 세계적으로 매년 50만명의 여성이 자궁경부암으로 진단받고 있으며 25만명의 여성이 자궁경부암으로 사망하는 것으로 알려져 있다(Steben M and Duarte-Franco E, Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology, Gynecol Oncol 107 (2007) S2-5). 대부분의 여성은 일생에 한번이상 인유두종바이러스에 감염되는 것으로 여겨지고 있다. 현재 까지 밝혀진 인유두종바이러스의 타입은 100종이 넘는다. 이들 타입 중 고위험군인 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58형이 자궁경부암 발병의 주요 원인으로 알려져 있고 16형과 18형이 전체 자궁경부암 발병원인의 70%정도를 차지한다 (Abreu AL, Souza RP, Gimenes F and Consolaro ME, A review of methods for detect human papillomavirus infection, Virology Journal 9 (2012) doi: 10.1186/1743-422X-9-262). 고위험군 인유두종바이러스의 E6, E7 단백질은 자궁경부암을 일으키는 주요 원인으로 E6는 p53을, E7은 pRB의 작용을 저해하여 자궁경부 상피세포의 유전적 불안정과 세포주기 교란을 일으키며 이러한 세포의 변형은 상피세포의 불멸성 (immortalization)을 초래하여 암 발병에 이르게 한다 (Yim EK and Park JS., The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis, Cancer Res Treat, 37 (2005) 319-324).

[0003] 자궁경부암의 중증도는 자궁경부 상피 세포내 종양 단계(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)에 따라 CIN I, CIN II, CIN III 및 invasive cervical cancer로 구분한다. CIN I의 경우 특별한 조치가 이루어지지 않아도 대부분 자연적으로 치유되며 CIN I 환자의 약 2%가 CIN II 또는 CIN III로 발전한다(Ho GY, Studentsov YY, Bierman R and Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women, N Engl J Med 338 (1998) 423-428). CIN II/III의 환자가 자연적으로 치유되는 확률은 6-50%까지 다양하게 보고되어있다(Nasiell K, Nasiell M and Vahlkvist V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. Obstet Gynecol 61 (1983) 609-614). 연구 보고간에 CIN II/III의 자연 치유율이 큰 차이를 보이는 것은 진단 기준의 다양성 때문인 것으로 보고 있다.

[0004] 자궁경부암의 진단을 위한 검사법으로 자궁경부 세포의 병변을 관찰하는 세포진 검사법(Pap smear test)과 인유두종바이러스 DNA 검출을 통한 진단법인 hybrid capture II가 보편적으로 사용되고 있다 (Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME, A review of methods for detect human papillomavirus infection, Virology Journal 9 (2012) doi: 10.1186/1743-422X-9-262). 이들 방법은 자궁경부의 세포를 이용한 방법으로 검사를 위해 자궁경부 세포를 수집해야 하는 번거로움이 있다. 이러한 번거로움을 덜기 위해 여러 연구를 통해 자궁경부암의 혈청학적 진단 방법을 개발하고자하는 시도가 있었다. 현재까지 알려진 자궁경부암의 혈청학적 검사 방법으로 인유두종바이러스의 L1 단백질, E6 또는 E7에 대한 항체 역가를 측정하는 방법이 있다(Combes JD, Pawlita M, Waterboer T, Hammouda D, Rajkumar T, Vanhems P, Snijders P, Herrero R, Franceschi S and Clifford G., Antibodies against high-risk human papillomavirus proteins as markers for invasive cervical cancer, Int J Cancer. 135 (2014) 2453-2461). 자궁경부암의 중증도가 증가함에 따라 이들 인유두종바이러스 항원에 대한 혈중 항체 수준이 증가하기 때문에 혈액 내 항체 역가를 측정하는 방법은 자궁경부암 발병을 검출할 수 있는 상당한 잠재성을 가지는 것으로 여겨지고 있다. 그러나 정상인 및 CIN I과 같은 낮은 중증도의 환자들에게서도 이들 항체의 증가가 일어나기 때문에 항체 수준의 검출을 통해 자궁경부암의 발병을 정확하게 검출하는 데에는 한계가 있는 것이 사실이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 상기와 같은 기존의 알려진 자궁경부암의 혈청학적 검사방법의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 정상인 또는 자궁경부암 발병 위험이 낮은 사람과 자궁경부암 환자를 높은 수준의 민감도와 특이도로 구분할 수 있는 방법을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 정상인 또는 중증도가 낮은 자궁경부암 환자 혈액 내 항체의 당질 수준에 비해 자궁경부암 환자 혈액 내 항체의 당질 수준이 현저하게 감소되는 것으로 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0006] 이에, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다:
- [0007] (1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계;
- [0008] (2) 상기 단계 (1)을 통해 생성된 항원-항체 반응물에 렉틴을 가하여 결합시키는 단계;
- [0009] (3) 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준(level)을 측정하여 정상대조군 혈액의 항체의 렉틴 결합 수준과 비교하는 단계; 및
- [0010] (4) 정상대조군에 비하여 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준이 감소되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.
- [0011] 또한, 본 발명은 피검체 유래 혈액 내 항체와 결합하는 항원이 고정된 기질, 바이오틴 표지된 렉틴 및 스트렙타비딘-결합 발색효소를 포함하는 자궁경부암 진단 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:
- [0014] (1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계;
- [0015] (2) 상기 단계 (1)을 통해 생성된 항원-항체 반응물에 렉틴을 가하여 결합시키는 단계;
- [0016] (3) 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준(level)을 측정하여 정상대조군 혈액의 항체의 렉틴 결합 수준과 비교하는 단계; 및
- [0017] (4) 정상대조군에 비하여 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준이 감소되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.
- [0018] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:
- [0019] (1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계; 및
- [0020] (2) 정상대조군에 비하여 상기 항원과 결합하는 항체 수준이 증가되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.
- [0021] 본 발명의 일 구현예로, 상기 단계 (1) 전에, 상기 피검체 유래 혈액으로부터 정제된 항체를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 정제된 항체는 protein A 또는 protein G 크로마토그래피를 통해 수득될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (2) 이후, 상기 렉틴과 결합한 상기 항원-항체 반응물에 스트렙타비딘-결합된 발색효소 또는 형광물질을 가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항원은 단백질 A 또는 단백질 G일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항원은 인유두종바이러스의 유전자에서 유래한 단백질일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 인유두종바이러스 유전자 유래 단백질은 인유두종바이러스의 E7 단백질 또는 E6 단백질일 수 있다.

- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (2)에서, 상기 렉틴은 시알산(sialic acid), 푸코오스(fucose), 갈락토오스(galactose) 또는 만노오스(mannose)와 결합할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 렉틴은 SNA(Sambucus Nigra Lectin), ConA(Concanavalin A), RCA I(Ricinus communis Agglutinin I) 및 AAL(Aleuria Aurantia Lectin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (2)에서, 상기 렉틴은 바이오틴(biotin)으로 표지된 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (3)에서의 측정은 SDS-PAGE, ELLA(enzyme-linked lectin assay), 웨스턴블롯팅(Western blotting)법, ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 조합을 통해 이루어질 수 있다.
- [0031] 본 발명은 피검체 유래 혈액 내 항체와 결합하는 항원이 고정된 기질, 바이오틴 표지된 렉틴 및 스트렙타비딘-결합 발색효소를 포함하는, 자궁경부암 진단 키트를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예로, 상기 기질은 니트로셀룰로오즈 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지로 합성된 96 웰 플레이트(96 well plate), 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 렉틴은 SNA(Sambucus Nigra Lectin), ConA(Concanavalin A), RCA I(Ricinus communis Agglutinin I) 및 AAL(Aleuria Aurantia Lectin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 발색효소는 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 형광염료 (fluorescence dye) 및 루시페라제(luciferase)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명에 따르면, 정상인 또는 중증도가 낮은 자궁경부암 환자 혈액 내 항체의 당질 수준에 비해 자궁경부암 환자 혈액 내 항체의 당질 수준이 현저하게 감소되는 것으로 나타났고, 이러한 항체의 당질 수준 감소는 항-인유두종바이러스 항체에서 더 뚜렷하게 나타났다. 따라서, 혈액 내 항체의 당질 수준 분석을 통해 정상인 또는 자궁경부암 발병 위험이 낮은 사람과 자궁경부암 환자를 높은 수준의 민감도와 특이도로 구분할 수 있기 때문에, 피검체의 시료로부터 자궁경부암을 간단하면서 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명에서 제시한 항체의 당질 수준 분석법을 임상 진단에 적용할 경우 암 진단의 정확도를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 정상인 및 CIN 1 환자(normal + CIN I)의 혈청과 자궁경부암 환자 혈청(cancer)내 항-인유두종바이러스 16형 E7 단백질의 항체 역가를 endo-point 역가 측정법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 전체 항체 수준을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 전체 항체의 sialylation 수준을 enzyme-linked lectin assay(ELLA)로 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 전체 항체의 galactosylation 수준을 enzyme-linked lectin assay(ELLA)로 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 전체 항체의 fucosylation 수준을 enzyme-linked lectin assay(ELLA)로 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 전체 항체의 mannosylation 수준을 enzyme-linked lectin assay(ELLA)로 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 normal 그룹, CIN I 그룹, cancer 그룹의 항체를 protein A 크로마토그래피를 통해 정제한 후, ELISA로

정제된 항체 수준을 비교한 결과를 나타낸 것이다. HPV16 E7 antibody negative는 HPV16 E7 항체를 보유하고 있지 않은 대상자들의 혈청 내 항체를 정제한 후 ELISA를 시행한 결과를 보여준다. HPV16 E7 antibody positive는 HPV16 E7 항체를 보유하고 있는 대상자들의 혈청을 정제한 후 ELISA를 시행한 결과를 보여준다. Total은 HPV16 E7 antibody negative와 HPV16 E7 antibody positive 대상자의 정제된 항체에 대해 ELISA를 시행한 결과를 보여준다.

도 8은 도 7에서 정제한 항체의 sialylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 도 7에서 정제한 항체의 galactosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 도 7에서 정제한 항체의 fucosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 도 7에서 정제한 항체의 mannosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 도 7에서 정제한 항체의 sialylation 수준을 index로 나타낸 것이다. Index는 도 8의 ELLA OD 값을 도 7의 ELISA OD 값으로 나눈 결과를 나타낸다.

도 13은 도 7에서 정제한 항체의 galactosylation 수준을 index로 나타낸 것이다. Index는 도 9의 ELLA OD 값을 도 7의 ELISA OD 값으로 나눈 결과를 나타낸다.

도 14는 도 7에서 정제한 항체의 fucosylation 수준을 index로 나타낸 것이다. Index는 도 10의 ELLA OD 값을 도 7의 ELISA OD 값으로 나눈 결과를 나타낸다.

도 15는 도 7에서 정제한 항체의 mannosylation 수준을 index로 나타낸 것이다. Index는 도 11의 ELLA OD 값을 도 7의 ELISA OD 값으로 나눈 결과를 나타낸다.

도 16은 normal 그룹, CIN I 그룹 및 cancer 그룹의 항체를 protein A 크로마토그래피를 통해 정제한 후, ELISA를 통해 항체 수준을 비교한 결과를 나타낸다.

도 17은 도 16에서 정제한 항체의 sialylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 도 16에서 정제한 항체의 fucosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 도 16에서 정제한 항체의 galactosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 도 16에서 정제한 항체의 mannosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 normal 그룹으로부터 CIN I 그룹 검출시, 도 16의 ELISA와 도 18의 ELLA-AAL 및 ELIA와 ELLA-AAL을 logistic regression model을 이용하여 병합(combination) 하였을 경우의 ROC curve 및 AUC 수치를 나타낸 것이다.

도 22는 CIN I 그룹으로부터 cancer 그룹 검출시, 도 16의 ELISA와 도 18의 ELLA-AAL 및 ELIA와 ELLA-AAL을 logistic regression model을 이용하여 병합(combination) 하였을 경우의 ROC curve 및 AUC 수치를 나타낸 것이다.

도 23은 normal 그룹으로부터 cancer 그룹 검출시, 도 16의 ELISA와 도 18의 ELLA-AAL 및 ELIA와 ELLA-AAL을 logistic regression model을 이용하여 병합(combination) 하였을 경우의 ROC curve 및 AUC 수치를 나타낸 것이다.

도 24는 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체 수준을 ELISA로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 25는 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 sialylation 수준을 ELLA로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 26은 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 galactosylation 수준을 ELLA로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 27은 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 fucosylation 수준을 ELLA로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 28은 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 mannosylation 수준을 ELLA로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 29는 인유두종바이러스 타입 16 E7 단백질이 결합된 수지를 이용하여 혈청 내 항-인유두종바이러스 타입 16 E7 항체를 분리한 후 분리된 항체의 수준을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 30은 도 29의 정제된 형태의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 sialylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 31은 도 29의 정제된 형태의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 galactosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 32는 도 29의 정제된 형태의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 fucosylation 수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 33은 도 29의 정제된 형태의 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체의 mannosylation수준을 ELLA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 34는 normal, CIN II 및 cancer 그룹의 항-HPV16 E7 항체 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 35는 normal, CIN II 및 cancer 그룹의 항-HPV18 E7 항체 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 36은 normal, CIN II 및 cancer 그룹의 항-HPV16 E7 항체의 fucosylation 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 37은 normal, CIN II 및 cancer 그룹의 항-HPV18 E7 항체의 fucosylation 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 단계를 포함하는 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:

(1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계;

(2) 상기 단계 (1)을 통해 생성된 항원-항체 반응물에 렉틴을 가하여 결합시키는 단계;

(3) 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준(level)을 측정하여 정상대조군 혈액의 항체의 렉틴 결합 수준과 비교하는 단계; 및

(4) 정상대조군에 비하여 상기 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준이 감소되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.

단계 (1)에서는, 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시킨다. 즉, 혈액 내 전체 항체 또는 인유두종바이러스에 대한 특정 항체와 결합하는 항원을 사용하여 항원-항체 반응을 일으키며, 경우에 따라서는 단계 (1) 전에, 피검체 유래 혈액으로부터 정제된 항체를 수득하여 정제된 항체를 사용할 수도 있으며, 정제된 항체는 protein A 또는 protein G 크로마토그래피를 통해 수득될 수 있다. 한편, 사용할 수 있는 항원으로는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래의 단백질 A(Accession no.: ELP42719.1)(서열번호 1), 단백질 G(Accession no.: P19909.1)(서열번호 2) 또는 인유두종바이러스의 유전자에서 유래한 단백질을 사용할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 또한, 인유두종바이러스의 유전자에서 유래한 단백질로는 인유두종바이러스 타입 16, 18, 58의 E7 또는 E6 단백질을 사용할 수 있고, 바람직하게는 상기 인유두종바이러스의 유전자에서 유래한 단백질은 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 한편, 시료는 혈액을 사용하는 것이 바람직하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니고, 경우에 따라서는 혈장 또는 혈청을 사용할 수도 있다. 또한, 항원을 코팅하는 고정체로는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지로 합성된 96 웰 플레이트(96 well plate), 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있다.

단계 (2)에서는, 단계 (1)을 통해 생성된 항원-항체 반응물에 렉틴을 가하여 결합시킨다. 즉, 항원-항체 반응물, 보다 구체적으로 항체의 시알산(sialic acid), 푸코오스(fucose), 갈락토오스(galactose) 또는 만노오스(mannose)와 결합하는 렉틴을 사용하며, 보다 구체적으로는 항원-항체 반응물의 sialylation, fucosylation,

galactosylation 및 mannosylation 레벨을 분석하기 위해 렉틴을 사용한다. 이때 사용될 수 있는 렉틴의 종류로는, 바람직하게는 SNA(Sambucus Nigra Lectin), ConA(Concanavalin A), RCA I(Ricinus communis Agglutinin I) 및 AAL(Aleuria Aurantia Lectin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이것으로 제한되지 않고, sialylation, fucosylation, galactosylation 및 mannosylation을 측정할 수 있는 렉틴이면 어느 것도 사용할 수 있다. 이러한 sialylation, fucosylation, galactosylation 및 mannosylation을 측정할 수 있는 렉틴, 예컨대 ConA, SNA, AAL 및 RCA I는 각각 mannose, sialic acid, fucose 및 galactose 결합과 반응하는 특징을 가지고 있다. 또한, 단계 (2)에서 사용되는 렉틴은 바이오틴(biotin)으로 표지된 렉틴을 사용하는 것이 바람직하다. 한편, 단계 (2) 이후, 렉틴과 결합한 항원-항체 반응물에 스트렙타비딘-결합된 발색효소 또는 형광물질을 가하는 단계를 추가로 수행할 수도 있다.

[0047] 단계 (3)에서는, 단계 (2)에 의해 렉틴과 결합하는 상기 항원-항체 반응물의 수준(level)을 측정하여 정상대조군 혈액의 항체의 렉틴 결합 수준과 비교한다. 단계 (3)에서의 측정은 SDS-PAGE, ELLA(enzyme-linked lectin assay), 웨스턴블롯팅(Western blotting)법, ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay), 면역침강(immunoprecipitation), 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있으나, 이것으로 한정되지는 않는다.

[0048] 단계 (4)에서는, 정상대조군에 비하여 렉틴과 결합하는 항원-항체 반응물의 수준이 감소되는 경우 자궁경부암으로 판정한다. 즉, 혈액 내 전체 항체 또는 인유두종바이러스에 대한 특정 항체의 sialylation, fucosylation, galactosylation 및 mannosylation 수준(level)이 암화에 따라 현저하게 감소되는 것으로 나타나는바, 정상대조군에 비하여 렉틴과 결합하는 항원-항체 반응물의 수준이 감소된 경우 자궁 경부암으로 판정할 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에서는, 정상인과 자궁경부 상피 세포내 종양 단계 I의 대상자 그룹(normal + CIN I 그룹)과 자궁경부암 환자 그룹(cancer 그룹)의 혈액 내 전체 항체 및 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준을 비교한 결과, cancer 그룹의 전체 항체 및 항-인유두종바이러스 E7 항체의 Sialylation, galactosylation, fucosylation 및 mannosylation 수준이 normal + CIN I 그룹에 비해 유의하게 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0050] 또한, 혈액으로부터 protein A 지지체 또는 protein A를 이용한 크로마토 그래피를 통해 항체를 검출하여 항체 수준이 증가되는 경우 자궁경부암으로 판정할 수 있다. 또한, 이러한 항체 수준 데이터를 렉틴을 이용한 당질 수준의 평가를 위한 수치로 이용할 수 있다. 예를 들면, 상기 검출된 항체 수준을 당질 수준의 평가를 위한 index 수치 산출을 위해 활용 할 수 있다.

[0051] 이에, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 자궁경부암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:

[0052] (1) 항원이 코팅된 고정체에 피검체 유래 혈액을 가하여 항원-항체 반응을 시키는 단계; 및

[0053] (2) 정상대조군에 비하여 상기 항원과 결합하는 항체 수준이 증가되는 경우 자궁경부암으로 판정하는 단계.

[0054] 본 발명의 다른 실시예에서는, 정상인과 자궁경부 상피 세포내 종양 단계 I의 대상자 그룹(normal + CIN I 그룹이라 함)과 자궁경부암 환자 그룹(cancer 그룹이라 함)의 혈액 내 전체 항체 및 정제된 항체 수준을 비교한 결과, cancer 그룹의 항체 수준은 normal + CIN I 그룹에 비해 높게 나타남을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0055] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 피검체 유래 혈액 내 항체와 결합하는 항원이 고정된 기질, 바이오틴 표지된 렉틴 및 스트렙타비딘-결합 발색효소를 포함하는, 자궁경부암 진단 키트를 제공한다. 진단키트 내에서 렉틴이 시료의 당쇄 변화를 탐지하는 원리는 다음과 같다. 즉, 피검체 유래의 혈액(혈장 또는 혈청 포함)을 키트에 가하면, 혈액 내 항체가 기질에 고정된 항원과 결합하고, 당쇄변화가 일어난 항체에 바이오틴 표지된 렉틴이 결합하게 된다. 이후, 스트렙타비딘이 결합된 발색효소 또는 형광물질 및 발색기질이 순서대로 결합함으로써 그 결과가 흡광도 또는 형광으로 나타나게 되는데, 항체와 렉틴 결합 수준이 감소된 경우 자궁 경부암으로 판정할 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 진단키트에서, 기질은 니트로셀룰로오즈 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지로 합성된 96 웰 플레이트(96 well plate), 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 한편, 기질에 항체를 접착시키기 위해서는 기질 표면이 L-리신 중합체(poly-L-lysine), 아크릴아미드 중합체(poly-arylamine) 또는 알데하이드(aldehyde)로 처리되는 것이 바람직하다.

[0057] 본 발명에 따른 진단키트에 포함되는 렉틴은 바이오틴 표지된 렉틴으로서, SNA(Sambucus Nigra Lectin),

ConA(Concanavalin A), RCA I(Ricinus communis Agglutinin I) 및 AAL(Aleuria Aurantia Lectin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 또한, 발색효소는, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase) 및 루시페라제(luciferase)로 구성된 군으로부터 선택되고, 형광물질은 FITC(fluorescein isothiocyanate) 또는 TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate)을 사용할 수 있지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0059] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0061] **[실시예]**

[0062] **실시예 1. 실험방법**

[0063] **1-1. 임상 샘플 준비**

[0064] 31개의 정상인 혈청, 30개의 자궁경부 상피 세포내 종양 단계 I (cervical intraepithelial neoplasia I), 31개의 자궁경부 상피 세포내 종양 단계 II (cervical intraepithelial neoplasia II) 및 31개의 자궁경부암 환자 혈청은 이화여자 대학교 목동병원에서 환자들의 동의하에 수집되었다. 혈액의 수집은 이화여대 목동병원의 임상시험 심사 위원회의 심의를 거쳐 진행되었다.

[0066] **1-2. 재조합 인유두종바이러스 E7 단백질의 준비**

[0067] 인유두종바이러스 타입 16의 E7 단백질을 암호화하는 유전자 서열은 pET-23a 벡터에 삽입하여 pET-23a-HP16 E7 벡터를 제작하였다. BL21 대장균을 pET-23a-HPV16 E7 벡터로 형질전환 시킨 후 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG, Duchefa, Netherlands)를 첨가하여 E7 단백질을 과발현시켰다. 발현된 E7 단백질은 Ni-NTA agarose resin을 이용하여 정제하였다.

[0069] **1-3. 혈중 항체의 정제**

[0070] 혈청을 결합 완충액(50 mM NaCl이 포함된 PBS, pH 7.2)에 희석한 후 protein A 수지에 통과시켰다. 상기 혈청의 로딩 전 protein A agarose(Sigma, USA) 수지는 상기 결합 완충액으로 평형화하였다. Protein A agarose 수지를 결합완충액으로 세척한 후 용출 완충액(0.2 M glycine pH 2.8)을 흘려주어 항체를 수집하였다. 수집된 항체 분획은 1 M Tris pH 9.2 용액을 첨가하여 중화하였다.

[0072] **1-4. 혈중 항체 및 정제된 항체의 수준 분석**

[0073] 혈중 전체 항체 수준은 protein A(PIERCE, USA)를 코팅항원으로하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 분석하였다. 96-well ELISA 플레이트(Greiner bio-one, Germany)에 protein A를 1 ng/well로 코팅한 후 5% skim milk(Bioworld, USA)가 포함된 PBST로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 이후 희석한 혈청 또는 정제된 항체(실시예 1-3의 방법에 따라 정제된 항체)를 주입하고 상온에서 2시간동안 반응시켰다. Protein A와 결합한 혈중 항체는 HRP가 부착된 anti-human IgG 항체(PIERCE, USA)를 1:5000으로 희석하여 적용하고 상온에서 1시간 반응하여 검출하였다. 혈청 및 항체는 0.5% skim milk가 포함된 PBST를 사용하여 희석하였다. 발색반응은 o-phenylenediamine(Sigma, USA)를 사용하여 진행하였고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0075] **1-5. 항-인유두종바이러스 E7 단백질 항체 수준의 측정**

[0076] 혈중 항-인유두종바이러스 E7 단백질에 대한 항체 수준은 재조합 인유두종바이러스 E7 단백질을 코팅항원으로하여 ELISA를 통해 분석하였다. 정제된 E7 단백질을 96-well ELISA 플레이트에 코팅하고 5% skim milk가 포함된 PBST로 상온에서 2시간동안 블로킹하였다. 이후 희석된 혈청을 적용하고 상온에서 2시간 반응시켰다. 코팅된 E7 단백질과 반응한 혈중 항체는 HRP가 부착된 anti-human IgG(PIERCE)항체를 사용하여 검출하였다. 항-인유두종바

이러스 E7 단백질 항체의 end-point 역가 측정을 위해 혈청은 1/50부터 1/6400 까지 연속희석하여 적용하였다. cut-off 기준은 blank 수치 1.5배 이상의 흡광도를 나타내는 혈청의 가장 높은 희석배율로 정하였다.

[0078] 1-6. 혈중 항체 및 정제된 항체의 당질 분석

[0079] 항체의 당질 분석은 enzyme-linked lectin assay(ELLA)를 통해 분석하였다. 혈중 전체 항체의 당질 분석을 위해 protein A를 96-well 플레이트에 1 ng/well로 코팅하고 산화된 우혈청 알부민(oBSA)이 5% 포함된 Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20(TBST)으로 상온에서 두 시간 동안 블로킹하였다. 산화된 우혈청알부민 제작을 위해 우혈청알부민(Bioworld, USA)을 10 mM metaperiodate (Sigma, USA)에 녹여 4℃에서 1시간 반응시킨 후 Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20(TBST)에 16시간 이상 투석하였다. 투석된 산화 우혈청알부민 용액은 0.45 μm 필터에 통과시켰다. 대상자들의 혈청 또는 정제된 항체(실시에 1-3의 방법에 따라 정제된 항체)를 0.5% 산화 우혈청 알부민이 포함된 TBST로 희석한 후 적용하고 상온에서 한 시간 반응시켰다. Protein A와 반응한 혈중항체의 당질은 biotin이 부착된 lectin을 사용하여 검출하였다. Fucose의 검출을 위해 Aleuria aurantia lectin(AAL, Vector Laboratories), α2,6-결합 sialic acid 검출을 위해 Sambucus nigra lectin(SNA, Vector Laboratories), galactose의 검출을 위해 Ricinus Communis Agglutinin I(RCA I), mannose의 검출을 위해 Concanavalin A(ConA)를 사용하였다. 항체의 당질에 결합한 lectin은 HRP가 부착된 streptavidin(PIERCE, USA)을 사용하여 검출하였다. 상기 lectin과 streptavidin은 0.5% 산화 우혈청알부민이 포함된 TBST에 준비하여 적용하였다. 발색반응은 o-phenylenediamine(Sigma, USA)를 사용하여 진행하였고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0081] 1-7. 혈중 항-인유두종바이러스 E7항체의 당질 분석

[0082] 정제된 재조합 E7단백질을 96-well 플레이트에 200 ng/well로 코팅하고 5% 산화 우혈청알부민이 포함된 TBST로 상온에서 두 시간 동안 블로킹하였다. 혈청을 0.5% 산화 우혈청알부민이 포함된 TBST로 희석한후 플레이트에 적용하여 37℃에서 한 시간 동안 반응시켰다. 이후 E7 단백질과 결합한 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질은 상기의 방법과 같이 biotin이 부착된 lectin과 streptavidin을 사용하여 검출하였다.

[0084] 1-8. 항-인유두종바이러스 E7 항체의 정제 및 정제 E7 항체의 당질 분석

[0085] 혈청을 결합 완충액(50 mM NaCl이 포함된 PBS, pH 7.2)에 희석한 후 Protein A agarose(Sigma, USA) 수지에 통과시켰다. Protein A 수지는 혈청 희석액 주입전에 결합 완충액을 흘려주어 평형화 시켰다. Protein A agarose 수지를 결합완충액으로 세척한 후 용출 완충액(0.2 M glycine pH 2.8)을 흘려주어 항체를 수집하였다. 수집된 용출액 부피의 5배로 상기 결합 완충액을 다시 첨가한 후 E7 단백질이 결합된 수지에 흘려주었다. E7 단백질이 결합된 수지는 정제된 인유두종바이러스 E7 단백질을 CNBr-activated Sepharose 4B(GE Healthcare, USA)와 coupling 시켜 제작하였다. Coupling은 제조사의 방법에 따라 진행하였다. E7 단백질이 부착된 수지와 결합한 항-인유두종바이러스 E7 항체는 상기의 용출 완충액을 흘려주어 회수하였다. 정제한 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질은 상기 혈중 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질 분석 방법을 통해 분석하였다.

[0087] 1-9. 통계분석

[0088] 두 그룹 간 차이의 통계적 중요성은 two-tailed Student's t-test를 사용하여 분석하였다. 0.05 이하의 P 값을 통계적으로 유의한 것으로 판명하였다. 검출 민감도(sensitivity): true positive의 수 x 100 / true positive의 수 + false negative의 수; 특이도(sensitivity): true negative의 수 x 100 / true negative의 수 + false positive의 수; Negative predictive value(NPV): true negative의 수 x 100 / true negative의 수 + false negative의 수; Positive predictive value(PPV): true positive의 수 x 100 / true positive의 수 + false positive의 수; Accuracy: (true positive + true negative) x 100 / true positive + true negative + false positive + false negative. Power value(1-β)는 G* power 프로그램을 사용하여 산출하였다. Receiver operating characteristic (ROC) curve 및 area under the curve (AUC) 수치는 GraphPad Prism 5.01을 사용하여 산출하였다.

실시예 2. 항-인유두종바이러스 E7 항체 수준 분석

먼저, 실시예 1-1에 의해 확보한 31개의 정상인 혈청, 30개의 자궁경부 상피 세포내 종양 단계 I (cervical intraepithelial neoplasia I) 및 31개의 자궁경부암 환자 혈청을 HPV16 E7에 대한 항체를 보유한 그룹(HPV16 E7 antibody positive)과 보유하지 않은 그룹(HPV16 E7 antibody negative)으로 나누었다.

또한, HPV16 E7 항체 보유 그룹은 normal + CIN I 그룹(정상인과 자궁경부 상피 세포내 종양 단계 I)과 cancer 그룹(자궁경부암 환자 그룹)으로 더 세분화하였다. normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹 대상자의 항-인유두종바이러스 E7항체 수준이 유사한지를 End-point 역가 측정법을 사용하여 분석하였고, 그 결과를 표 1 및 도 1에 나타내었다.

표 1

No.	Anti-HPV16 E7 IgG titer		
	Norma+CIN I group		Cancer group
	Normal	CIN I	
1	100	100	100
2	800	400	100
3	1600	1600	400
4	1600	3200	800
5	6400	3200	1600
6			1600
7			1600
8			3200
9			3200
10			6400

표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹에서 선별된 대상자의 항-인유두종바이러스 E7 항체의 수준은 동등한 것으로 확인되었다.

실시예 3. Normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 혈중 항체의 당질분석

3-1. Normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 혈중 전체 항체의 당질화 수준 비교

혈중 전체 항체의 당질화 수준 비교를 하기 전에, 먼저 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹 대상자 혈액 내 전체 항체 수준을 실시예 1-4의 방법에 따라 측정하여 비교하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이때, 혈중 항체는 protein A를 코팅항원으로 하여 검출하였고, 혈청은 1/50부터 1/400까지 연속희석하여 적용하였다.

도 2에 나타난 바와 같이, cancer 그룹의 항체 수준은 normal + CIN I 그룹에 비해 높은 median value를 나타냄을 확인할 수 있었다.

다음으로, normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹 대상자 혈액 내 전체 항체의 당질화 수준을 실시예 1-6의 방법에 따라 측정하였고, 그 결과를 도 3, 도 4, 도 5 및 도 6에 나타내었다.

도 3, 도 4, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 혈청을 1:50부터 1:400까지 연속 희석하여 두 그룹간의 당질 수준을 비교한 결과, cancer 그룹의 sialylation, galactosylation, fucosylation 및 mannosylation의 median

value가 normal + CIN I 그룹에 비해 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 3-2. Normal 그룹, CIN I 그룹, cancer 그룹으로부터 정제한 항체의 당질화 수준 비교

[0105] Normal 그룹, CIN I 그룹, cancer 그룹의 혈청에서 protein A chromatography를 이용하여 항체를 정제한 후 항체 수준 및 당질 수준을 비교하였다. 정제된 항체 수준 및 당질 수준은 도 7부터 도 15에 나타내었다. 항체 및 당질 수준 비교를 위해 HPV16 E7 antibody negative 분석 그룹과 HPV16 E7 antibody positive 분석 그룹으로 나누었다. Total은 HPV16 E7 antibody negative 분석 그룹과 HPV16 E7 antibody positive 분석 그룹의 정제된 항체를 모두 분석한 결과를 보여준다.

[0106] 도 7에 나타낸 바와 같이, cancer 그룹의 정제된 항체 수준은 normal 및 CIN I 그룹에 비해 높게 나타났다. CIN I 그룹 또한 normal 그룹에 비해 높은 median value를 나타내는 것으로 확인되었다. 도 8 및 도 9는 도 7에서 정제된 항체의 sialylation 수준 및 galactosylation 수준을 나타낸다. Cancer 및 CIN I 그룹의 sialylation 및 galactosylation에 대한 수치는 normal 그룹에 비해 비슷하거나 낮은 median value를 나타내었다. 이는 cancer 및 CIN I 그룹의 정제된 항체의 수준이 normal 그룹에 비해 높다는 것을 감안 할 때, cancer 및 CIN I 그룹 항체의 sialylation 및 galactosylation 수준이 크게 낮은 수치를 나타냄을 의미한다.

[0107] 도 10과 도 11은 도 7에서 정제한 항체의 fucosylation과 mannosylation 수준을 나타낸다. Cancer 및 CIN I 그룹의 mannosylation 수준 또한 normal 그룹에 비해 비슷하거나 낮은 수준을 나타내었다. 그러나 Cancer 및 CIN I 그룹의 fucosylation 수준은 normal 그룹에 비해 현저하게 낮은 것으로 나타났다.

[0109] 또한, Cancer 및 CIN I 그룹의 항체 수준이 normal 그룹에 비해 높기 때문에 이에 대한 수치 차이를 반영하기 위해 각 당질화 수준을 index로 나타내었고, 그 결과를 도 12부터 도 15에 나타내었다. 당질화 index는 ELLA 결과의 수치를 ELISA 결과 수치로 나눈 수치이다. 도 12, 도 13, 도 14 및 도 15에 나타낸 바와 같이, sialylation, galactosylation, fucosylation과 mannosylation에 대한 index 수치가 normal > CIN I > cancer 순으로 나타남을 확인할 수 있었다. 특히 Normal 그룹과 CIN I 그룹, normal 그룹과 cancer 그룹 간에 fucosylation index의 차이는 높은 유의성을 나타내었다 (도 14). 또한, HPV16 E7 antibody positive 분석 그룹에서 normal과 CIN I 그룹은 cancer 그룹과 mannosylation index에서 높은 유의성으로 차이를 나타내었다(도 15).

[0111] 더욱이, normal 그룹(n=29), CIN I 그룹(n=30), cancer 그룹(n=30)의 혈청에서 protein A chromatography를 이용하여 항체를 정제한 후 항체 수준을 비교하였고, 이를 위해 protein A가 coating된 96 well plate를 사용하였다. 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, protein A와 결합하는 항체 수준은 normal 그룹에 비해 CIN I 그룹에서 높게 나타났으며, CIN I 그룹에 비해 cancer 그룹에서 높은 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, 상기 정제된 항체의 sialylation, fucosylation, galactosylation 및 mannosylation 수준을 ELLA를 통해 측정하였다. 그 결과, 도 17부터 도 20에 나타낸 바와 같이, Normal 그룹에 비해 CIN I 그룹의 fucosylation 수준이 현저하게 낮은 것으로 나타났고, CIN I 그룹에 비해 cancer 그룹의 fucosylation 수준이 현저하게 낮은 것으로 나타났다 (도 18).

[0113] 추가적으로, 상기 도 16의 protein A coating ELISA와 도 18의 당질화 분석 수준을 토대로 normal 그룹으로부터 CIN I 그룹을 검출 시, CIN I 그룹으로부터 cancer 그룹 검출 시, normal 그룹으로부터 cancer 그룹 검출 시, receiver operating characteristic(ROC) curve 및 AUC 수치를 산출하였고, 그 결과를 도 21부터 도 23에 나타내었다. 이때, ELISA는 도 16의 ELISA 방법 이용시의 ROC curve, ELLA-AAL은 도 18의 AAL을 이용한 ELLA 방법 이용시의 ROC curve를 의미하며, ELISA + ELLA-AAL은 상기 두 방법의 파라미터를 logistic regression 모델을 통해 병합(combination)한 방법의 ROC curve를 보여준다.

[0115] 또한, 도 16의 ELISA 및 도 18의 ELLA-AAL을 사용하였을 경우, normal 그룹으로부터 CIN I 그룹 검출 시, CIN I 그룹으로부터 cancer 그룹 검출 시, normal 그룹으로부터 cancer 그룹 검출 시, sensitivity, specificity,

NPV, PPV, Accuracy를 분석하였고, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

Detection	Type of assay	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV	Accuracy
Discriminating women with CIN I from women with normal cytology	ELISA	63%	62%	62%	63%	63%
	ELLA-AAL	73%	62%	69%	67%	68%
Discriminating women with cervical cancer from women with CIN I	ELISA	83%	67%	80%	71%	75%
	ELLA-AAL	77%	60%	72%	66%	68%
Discriminating women with cervical cancer from women with normal cytology	ELISA	97%	69%	95%	76%	83%
	ELLA-AAL	87%	72%	84%	74%	80%

더욱이, 표 2의 ELISA와 ELLA-AAL의 방법을 logistic regression model을 통해 병합한 경우, normal 그룹으로부터 CIN I 그룹 검출 시, CIN I 그룹으로부터 cancer 그룹 검출 시, normal 그룹으로부터 cancer 그룹 검출 시, sensitivity, specificity, AUC 및 power value($1-\beta$)을 분석하였고, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

Detection	Sensitivity	Specificity	AUC	1 - β
Discriminating CIN I from normal cytology	77%	62%	0.80	0.99
Discriminating cervical cancer from CIN I	93%	77%	0.86	0.99
Discriminating cervical cancer from normal	93%	93%	0.97	1.0

3-3. Normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준 비교

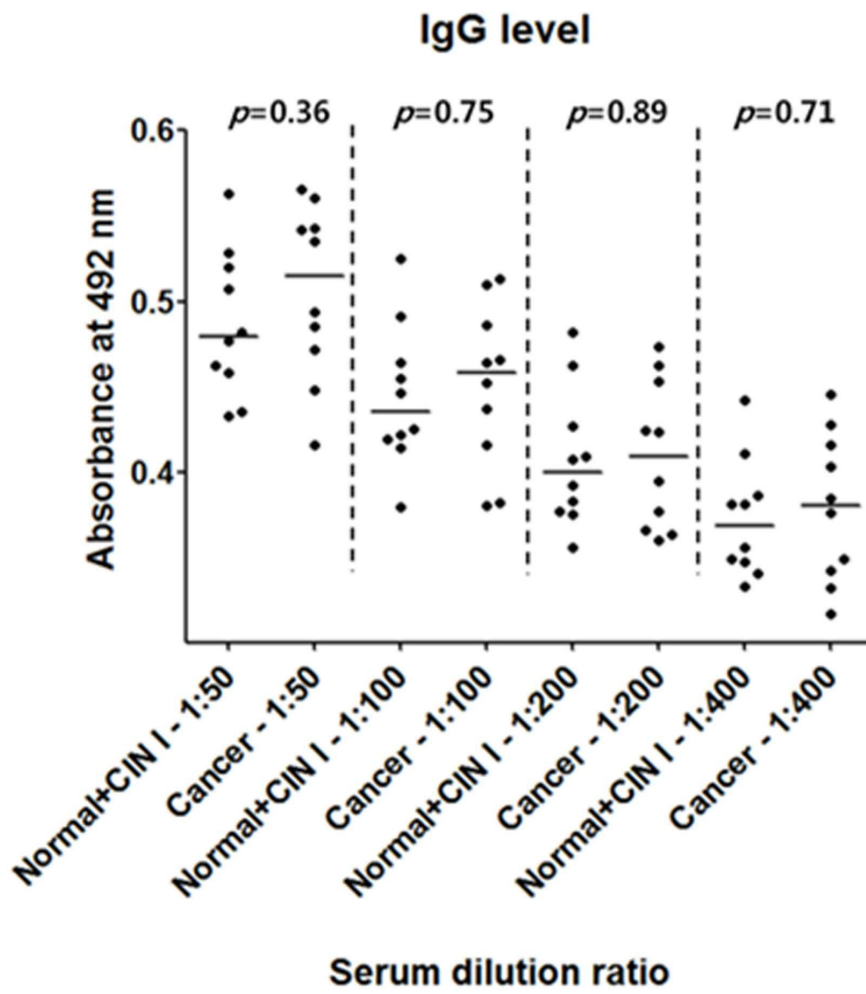
먼저 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹 대상자 혈액 내 항-인유두종바이러스 E7 항체 수준을 실시예 1-5의 방법에 따라 측정하여 비교하였고, 그 결과를 도 24에 나타내었다.

다음으로, normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹 대상자 혈액 내 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준을 실시예 1-7의 방법에 따라 측정하였고, 그 결과를 각각 도 25, 도 26, 도 27 및 도 28에 나타내었다.

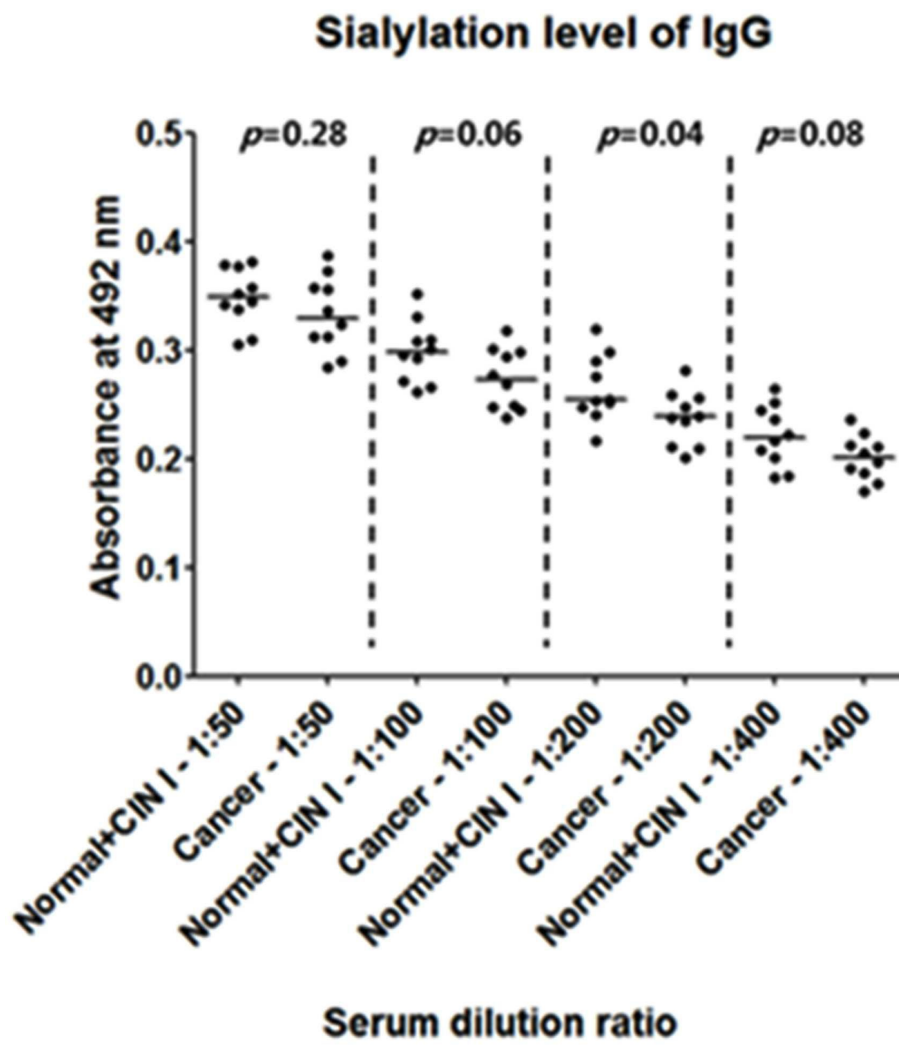
도 25, 도 26, 도 27 및 도 28에 나타난 바와 같이, sialylation, galactosylation, fucosylation 및 mannosylation을 비교한 결과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준이 normal + CIN I 그룹에 비해 유의하게 낮은 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다.

- [0126] 3-4. Normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹으로부터 정제한 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준 비교
- [0127] 충분한 양의 항체를 수득하기 위해 상기 표 1의 대상자 중 항-인유두종바이러스 E7 항체 수준이 1000을 초과하는 대상자를 선별한 후, 선별된 대상자들의 혈액 내 항-인유두종바이러스 E7 항체 수준을 실시예 1-5의 방법에 따라 측정하여 비교하였고, 그 결과를 도 29에 나타내었다. 이때, Negative control은 항-인유두종바이러스 E7 항체 역가를 나타내지 않는 사람의 혈청을 정제한 것이다.
- [0128] 도 29에 나타낸 바와 같이, 두 그룹으로부터 정제한 항-인유두종바이러스 16형 E7 항체 수준에 차이가 없음을 확인하였다.
- [0130] 다음으로, 정제한 형태의 normal + CIN I 그룹과 cancer 그룹 대상자 혈액 내 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준을 실시예 1-8의 방법에 따라 측정하였고, 그 결과를 각각 도 30, 도 31, 도 32 및 도 33에 나타내었다.
- [0131] 도 30, 도 31, 도 32 및 도 33에 나타낸 바와 같이, sialylation, galactosylation, fucosylation 및 mannosylation을 비교한 결과 cancer 그룹의 항-인유두종바이러스 E7 항체의 당질화 수준이 normal + CIN I 그룹에 비해 유의하게 낮은 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0133] 다음으로, normal 그룹(n=31), CIN II 그룹(n=31), cancer 그룹(n=31)의 항-HPV16 E7 항체와 항-HPV18 E7 항체 수준을 측정하였고, 그 결과를 각각 도 34 및 도 35에 나타내었다. 이때, 항-HPV16 E7 및 항-HPV18 E7 항체 수준 측정을 위해 정제되지 않은 혈청을 사용하였다.
- [0135] 다음으로, 상기 항-HPV16 E7 항체의 fucosylation 및 항-HPV18 E7 항체의 fucosylation 수준을 측정하였고, 그 결과를 각각 도 36 및 도 37에 나타내었다. 이때, 항-HPV16 E7 항체 및 항-HPV18 E7 항체의 fucosylation level 측정을 위해 protein A chromatography를 통해 정제된 항체를 사용하였다.
- [0137] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

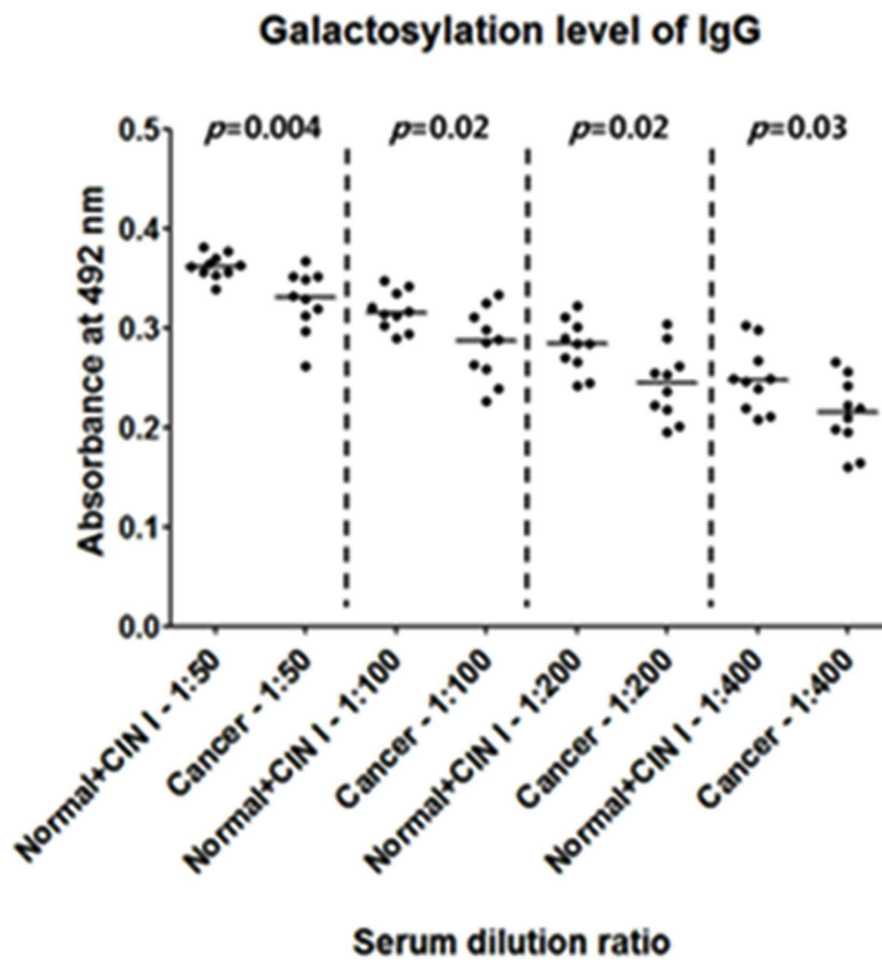
도면2



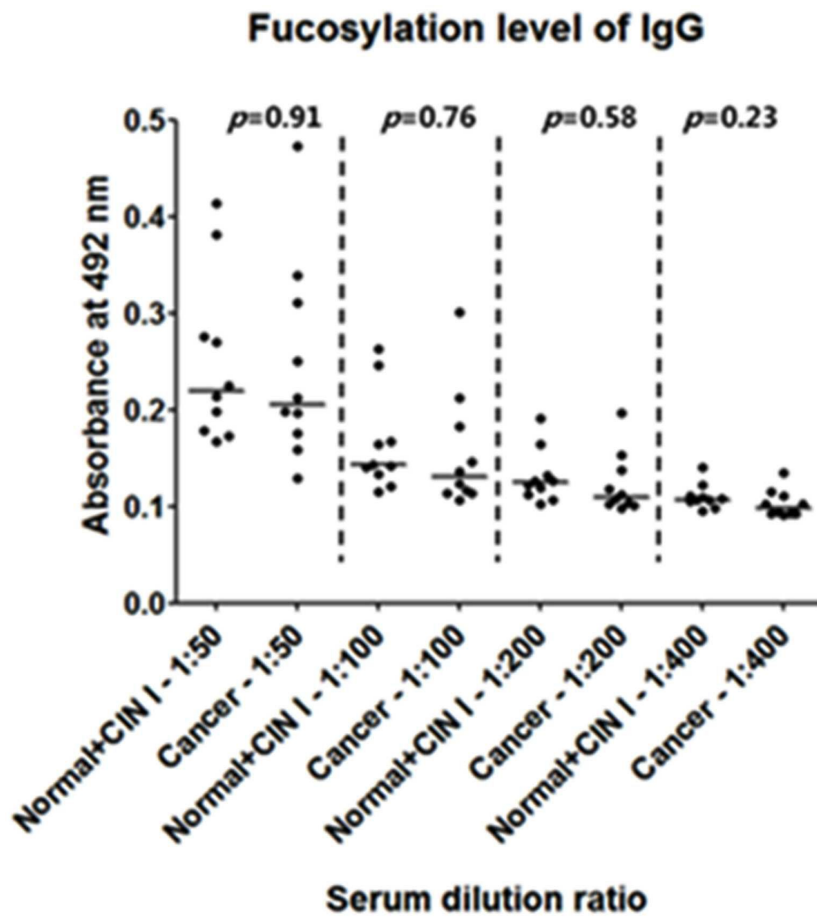
도면3



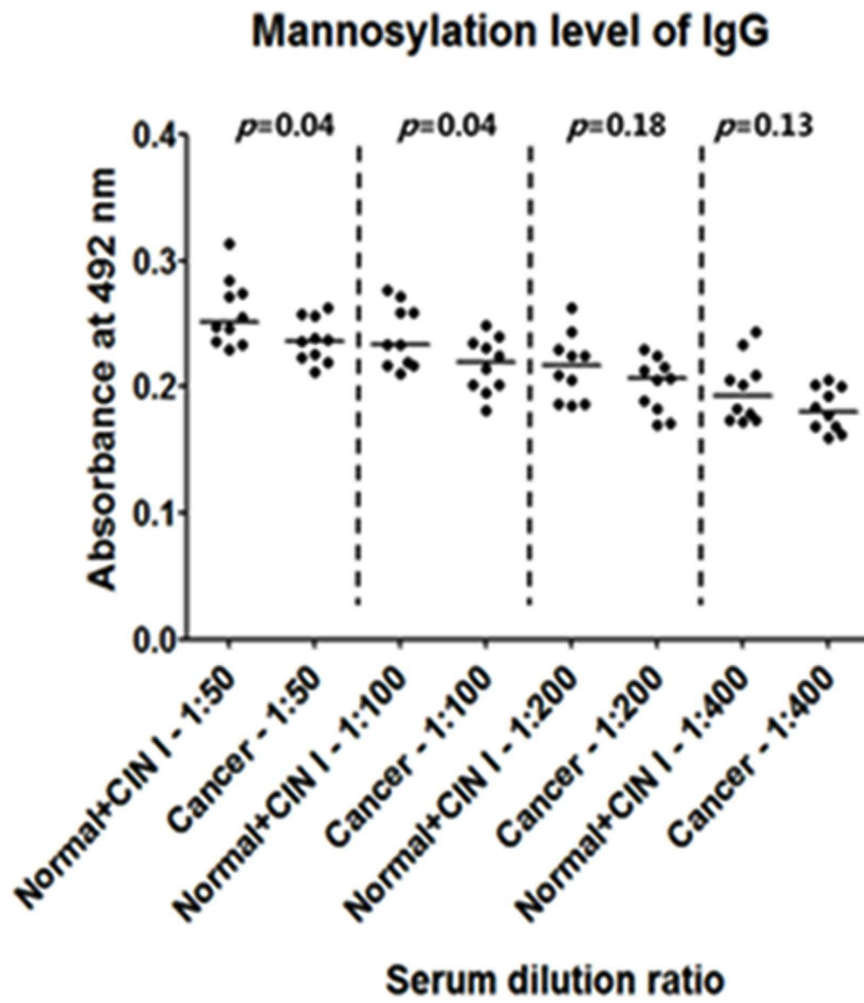
도면4



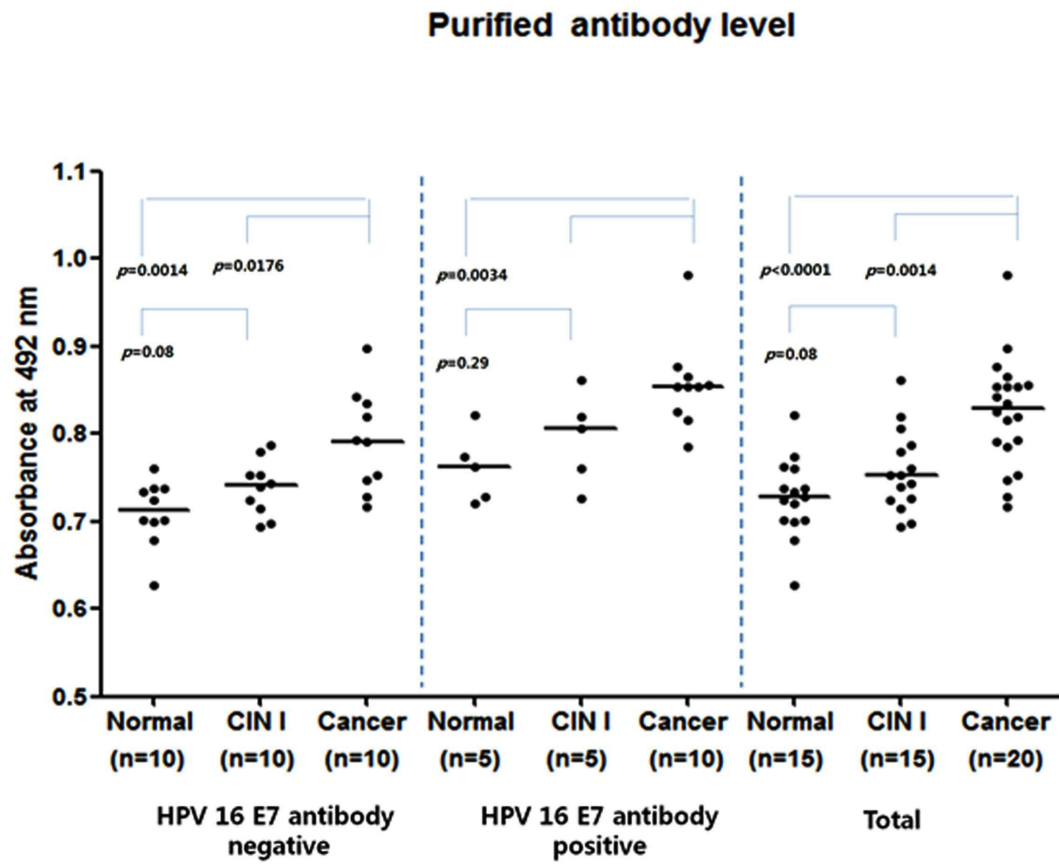
도면5



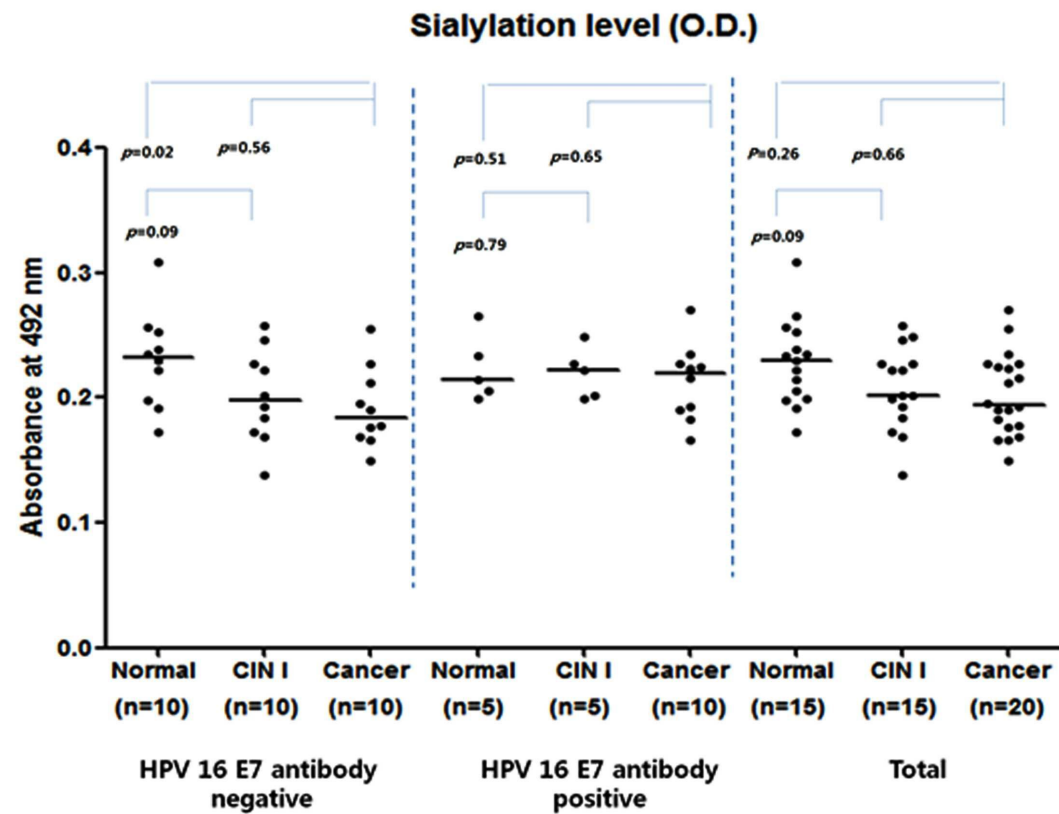
도면6



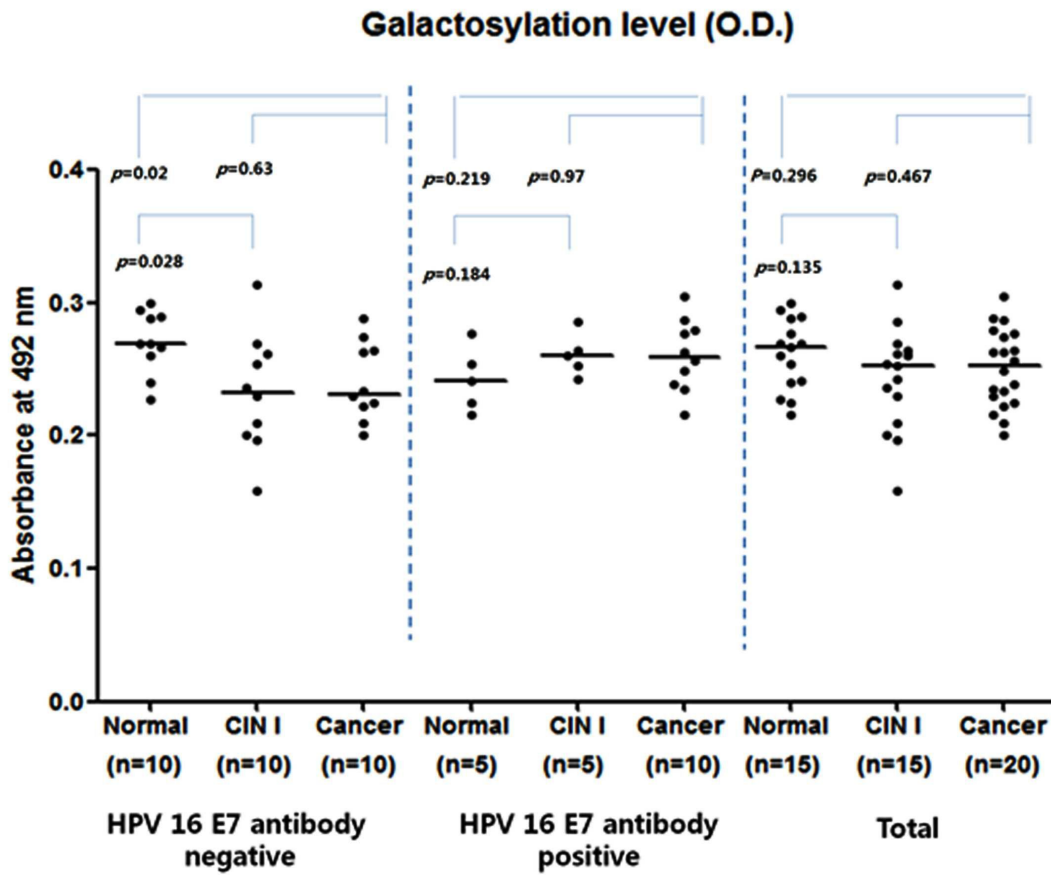
도면7



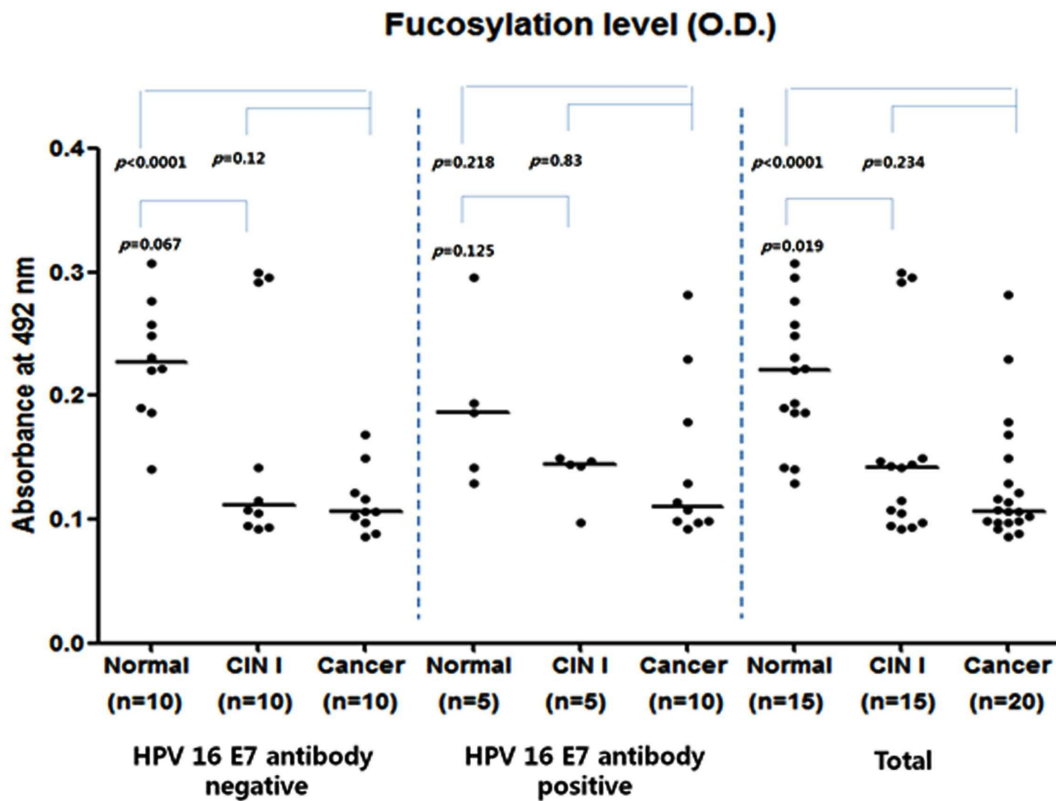
도면8



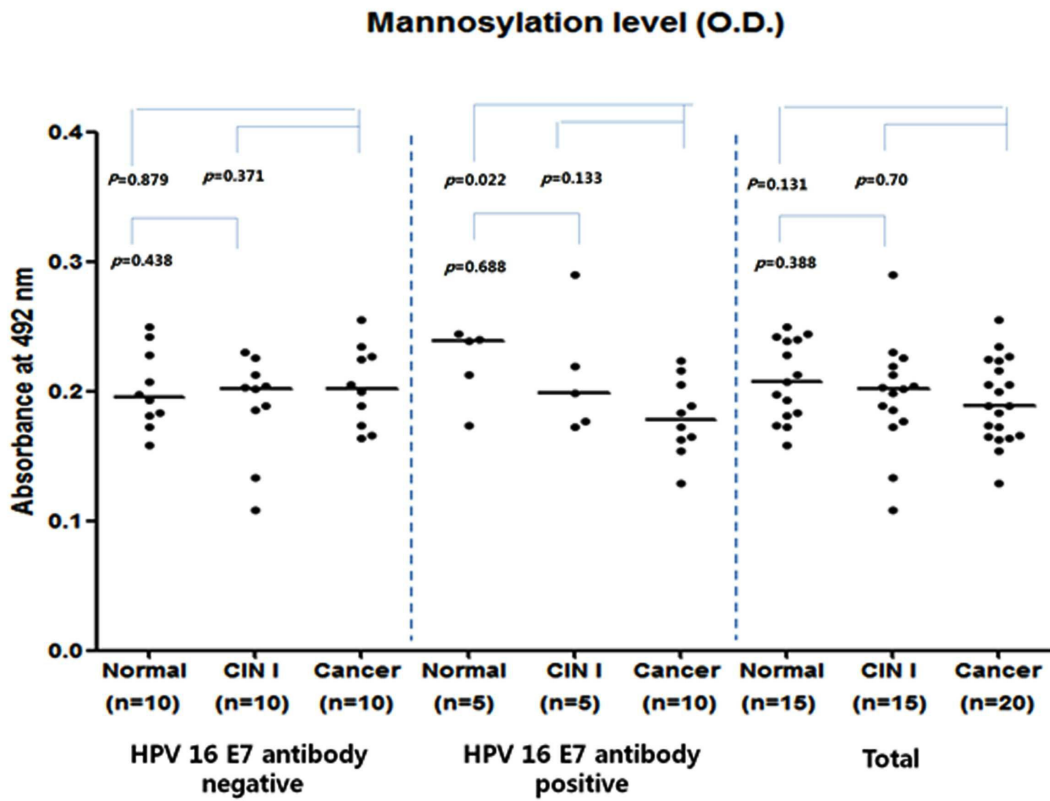
도면9



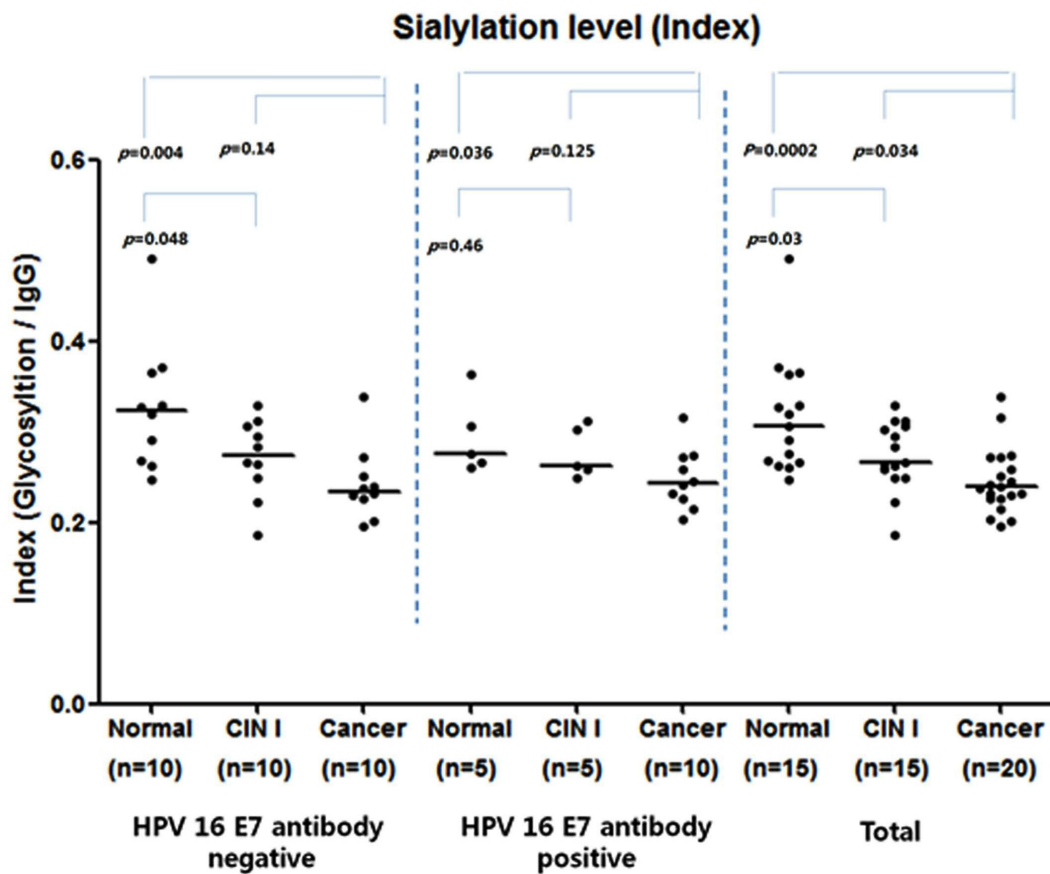
도면10



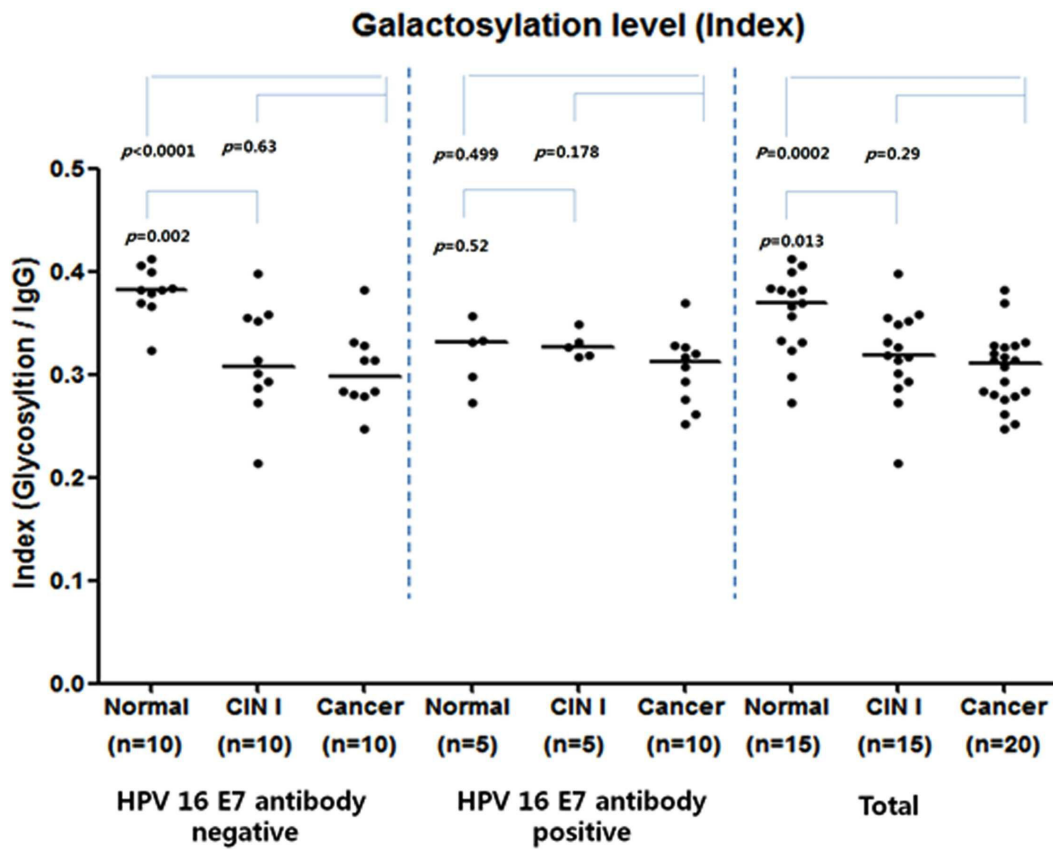
도면11



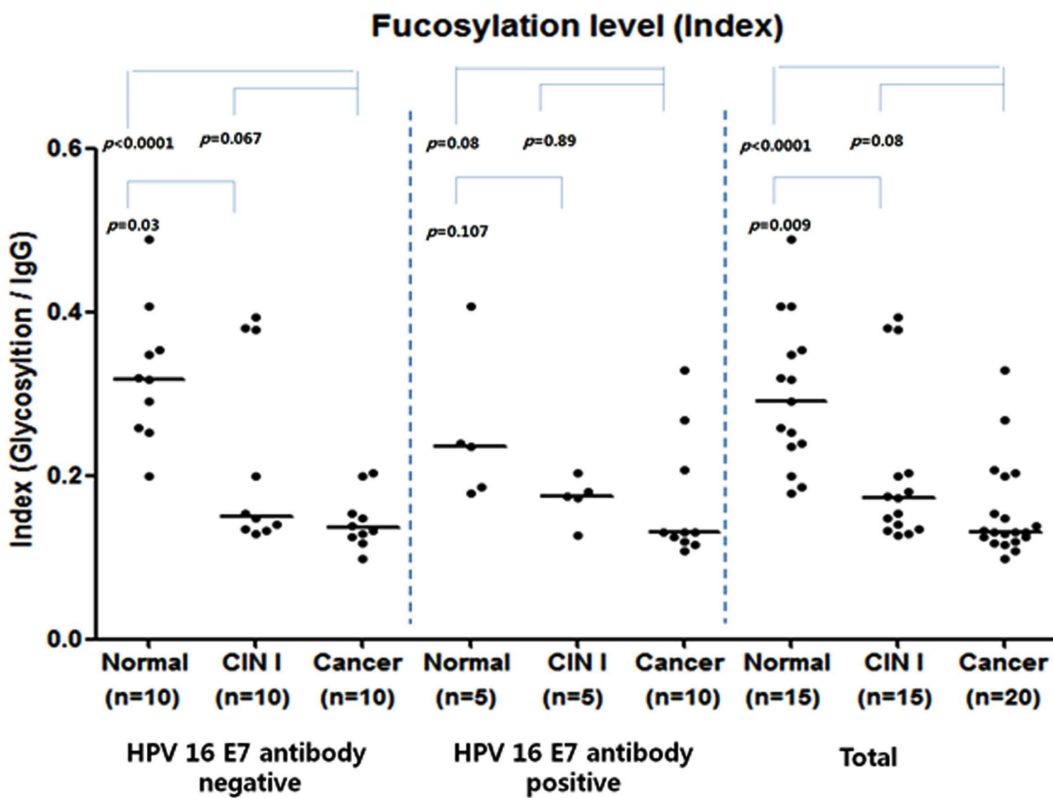
도면12



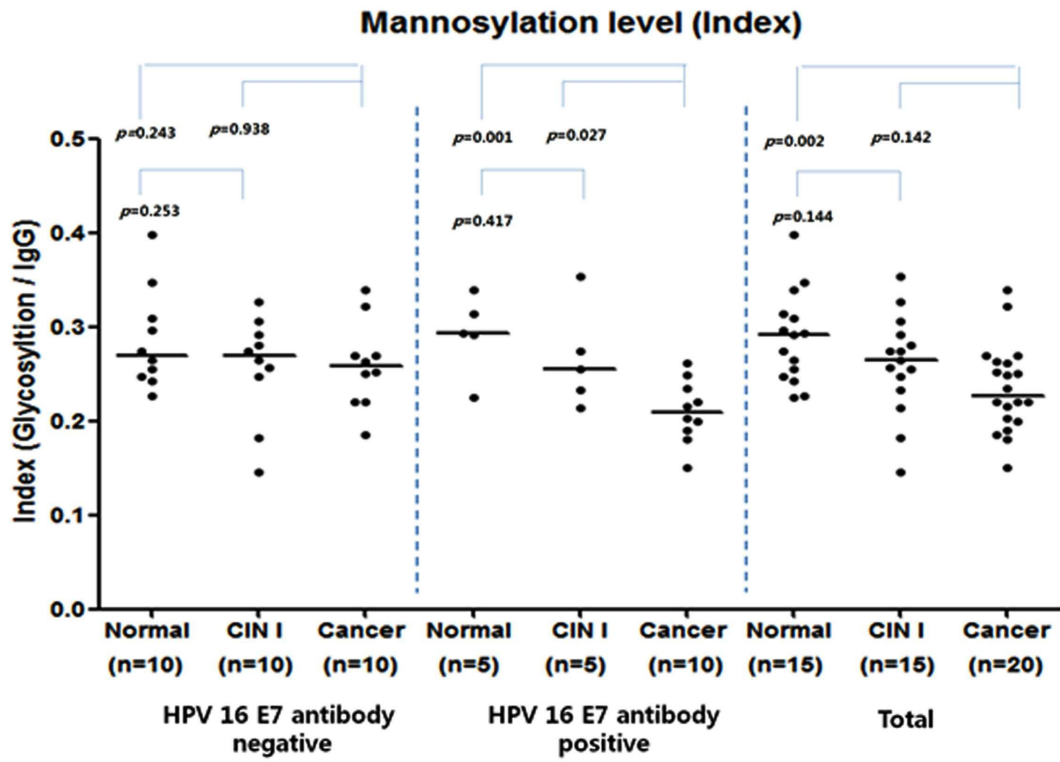
도면13



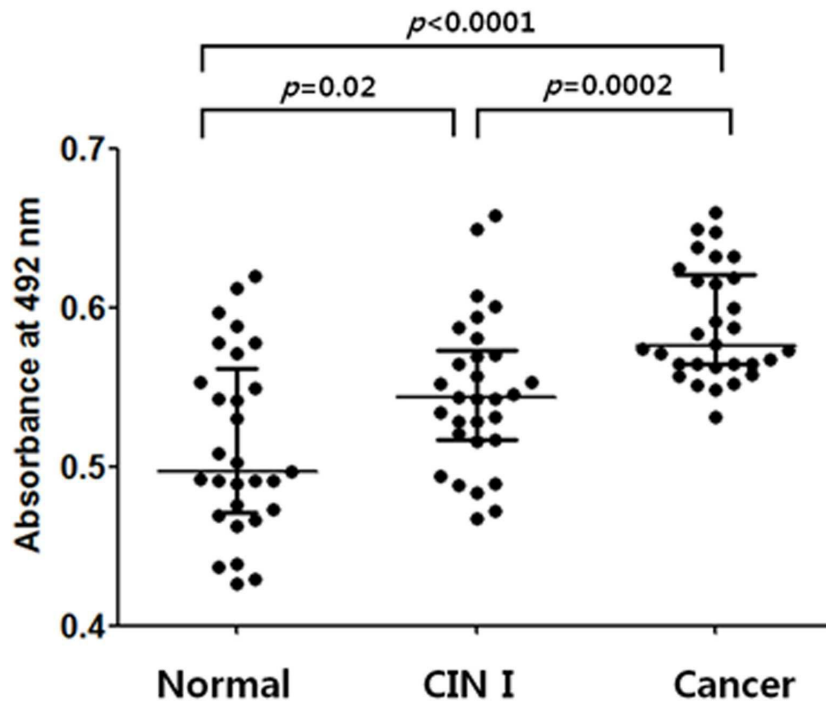
도면14



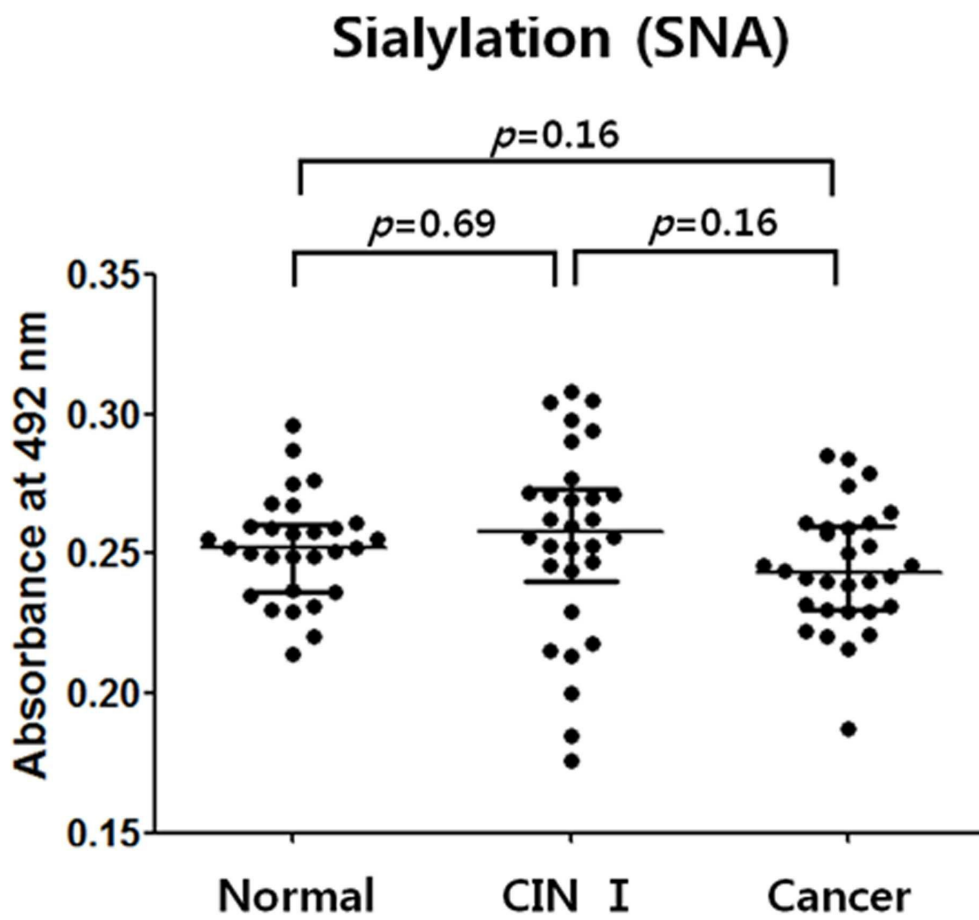
도면15



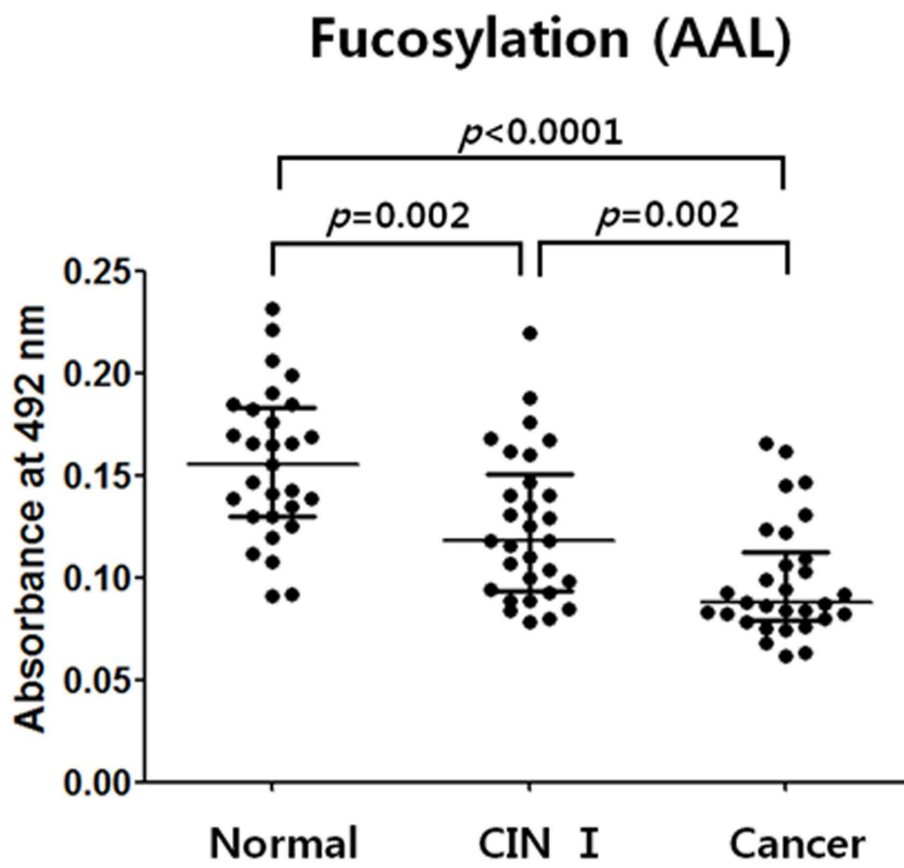
도면16



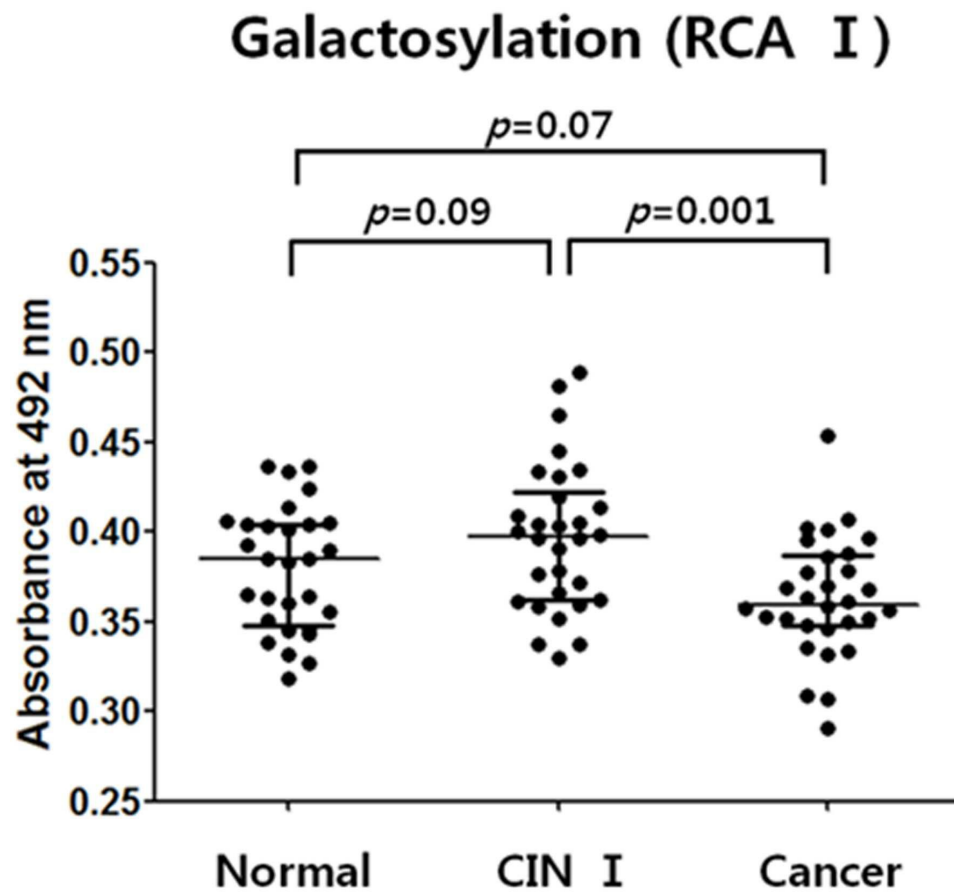
도면17



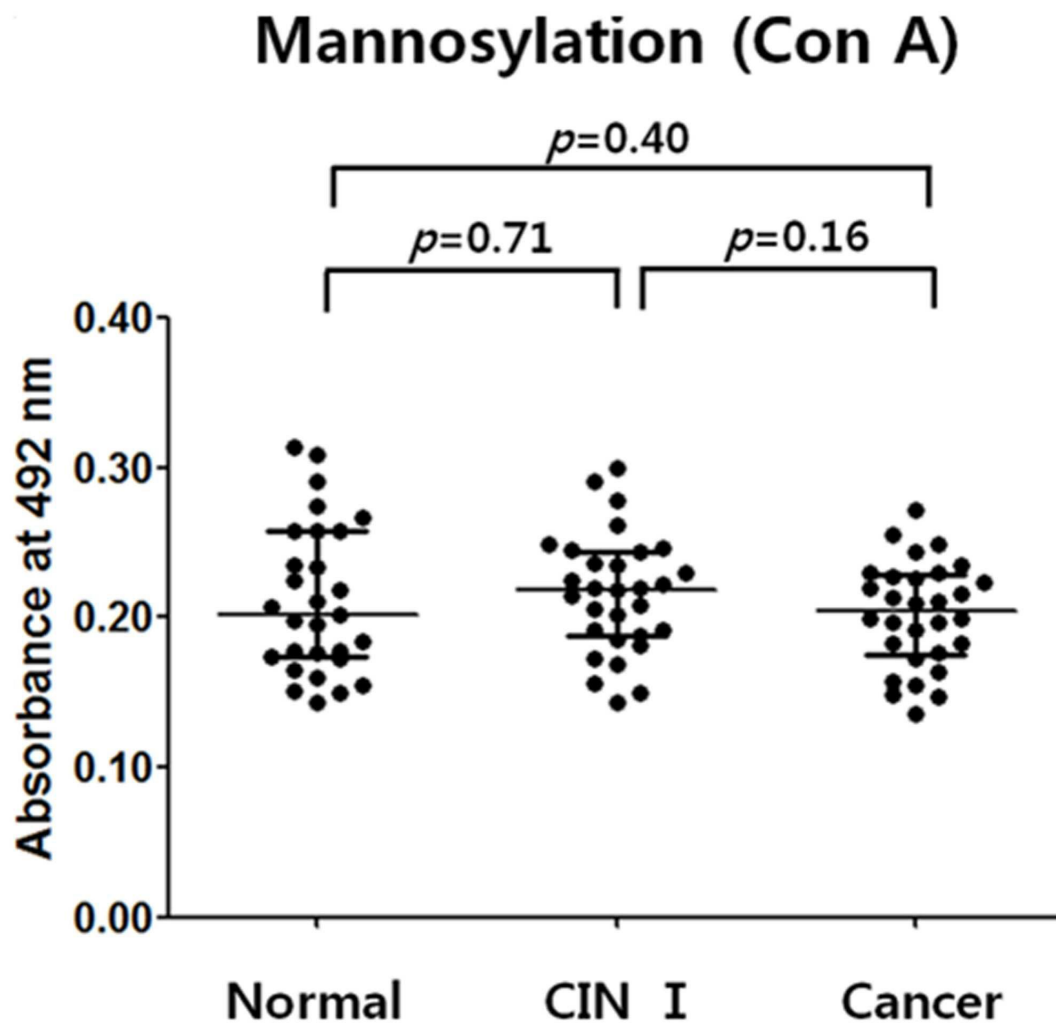
도면18



도면19

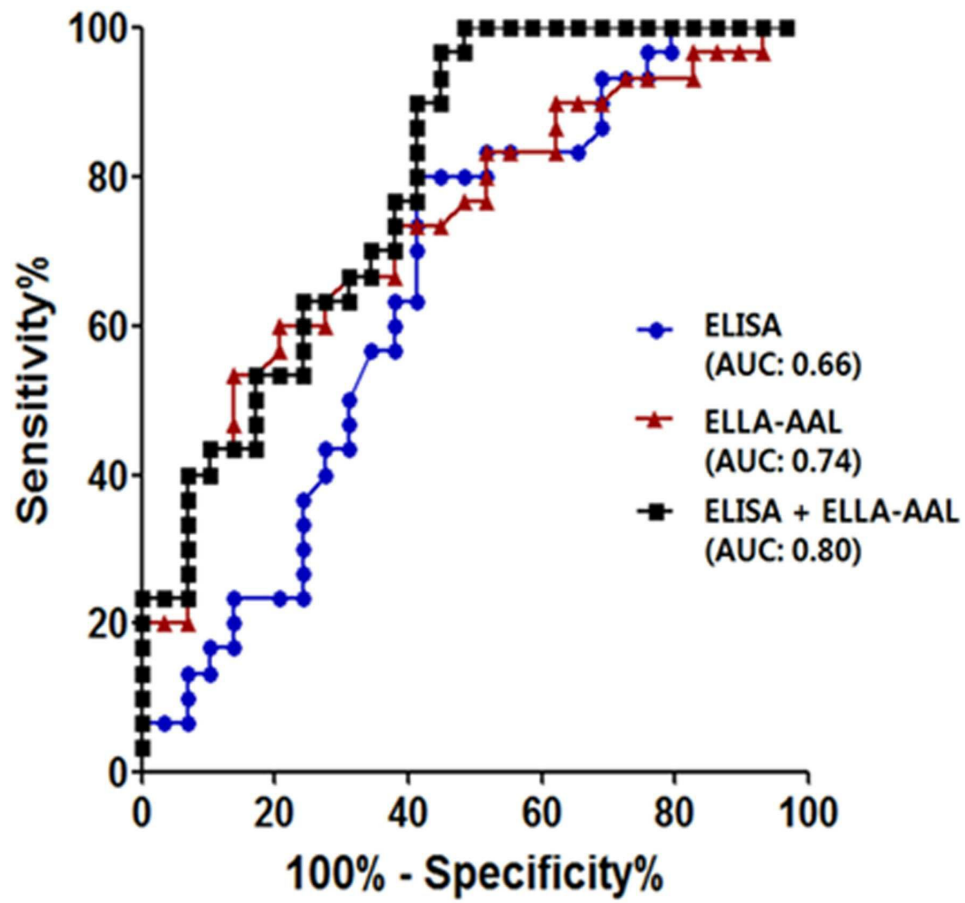


도면20



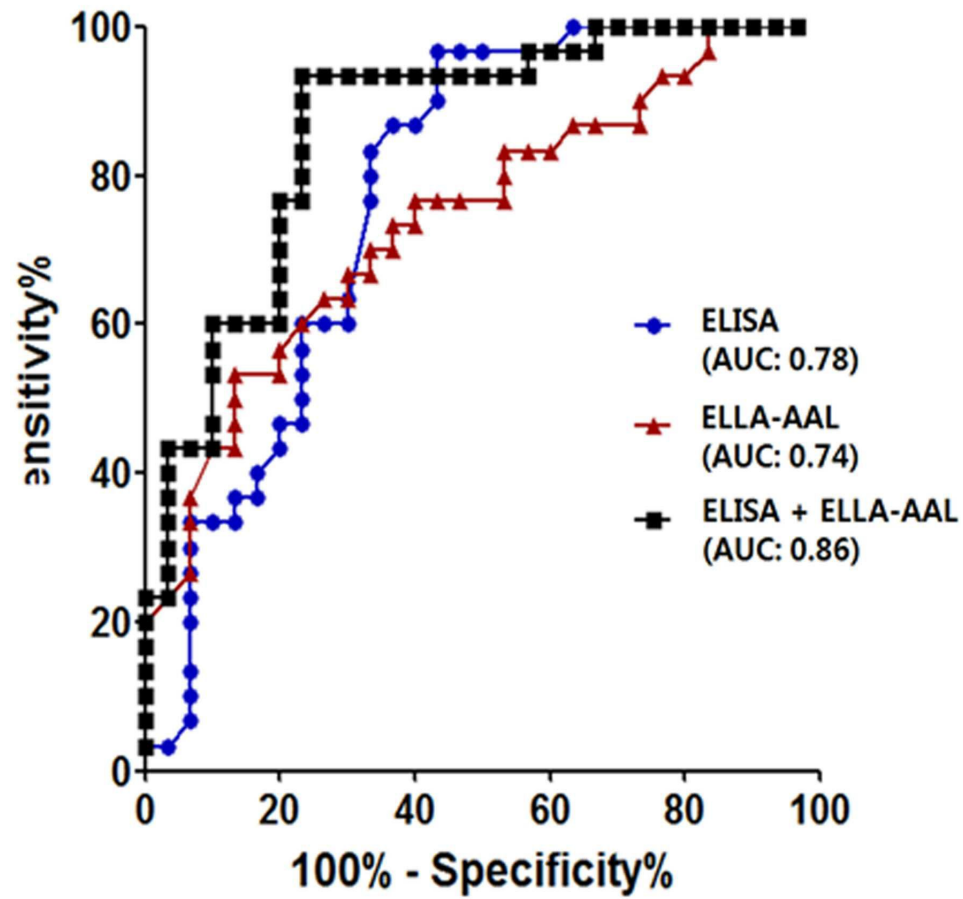
도면21

Normal vs. CIN I

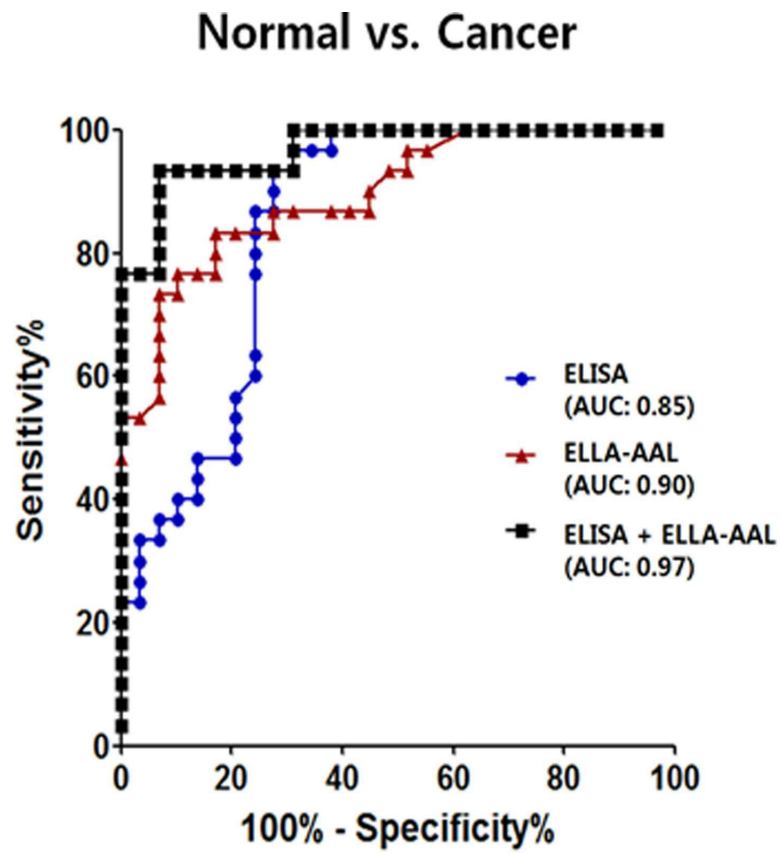


도면22

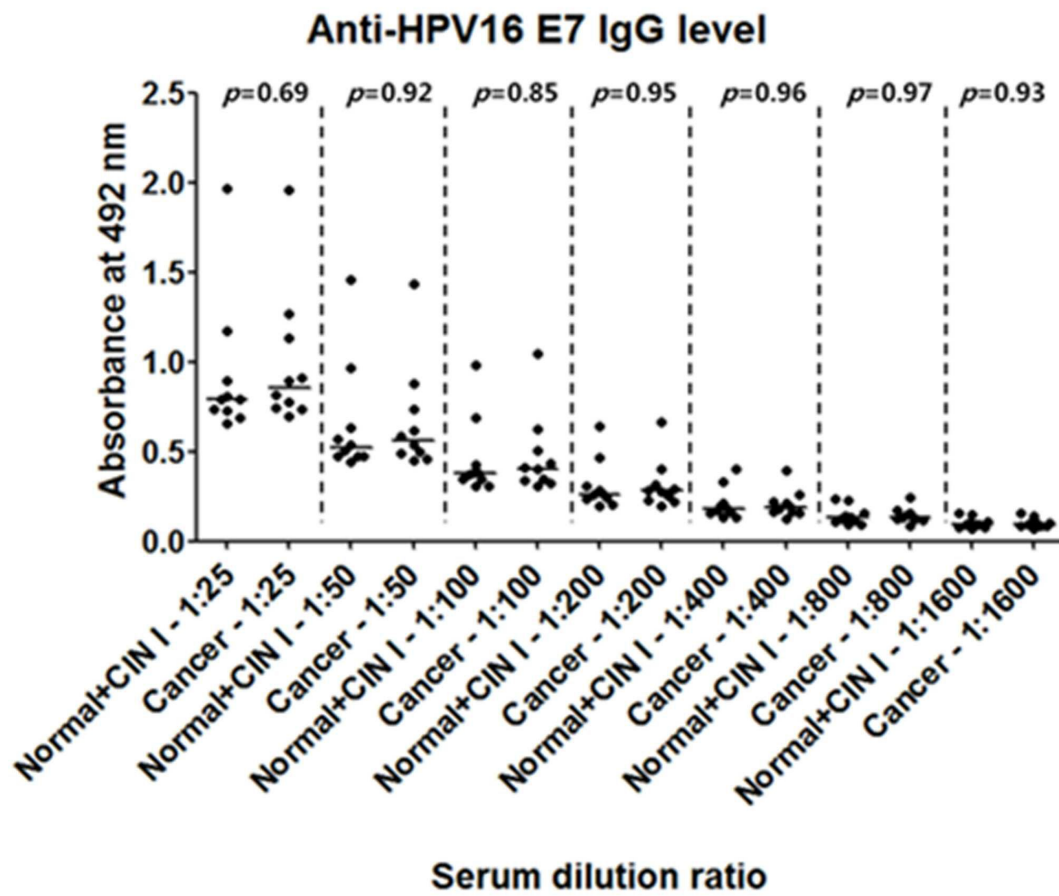
CIN I vs. Cancer



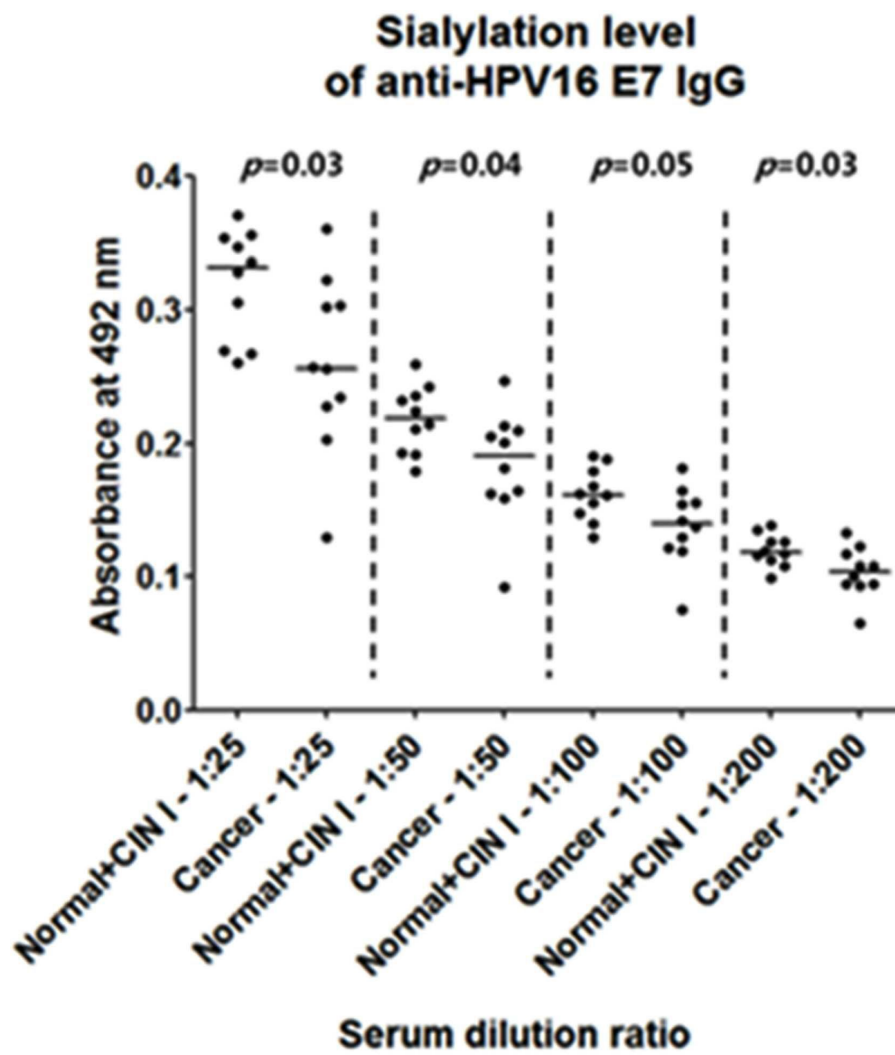
도면23



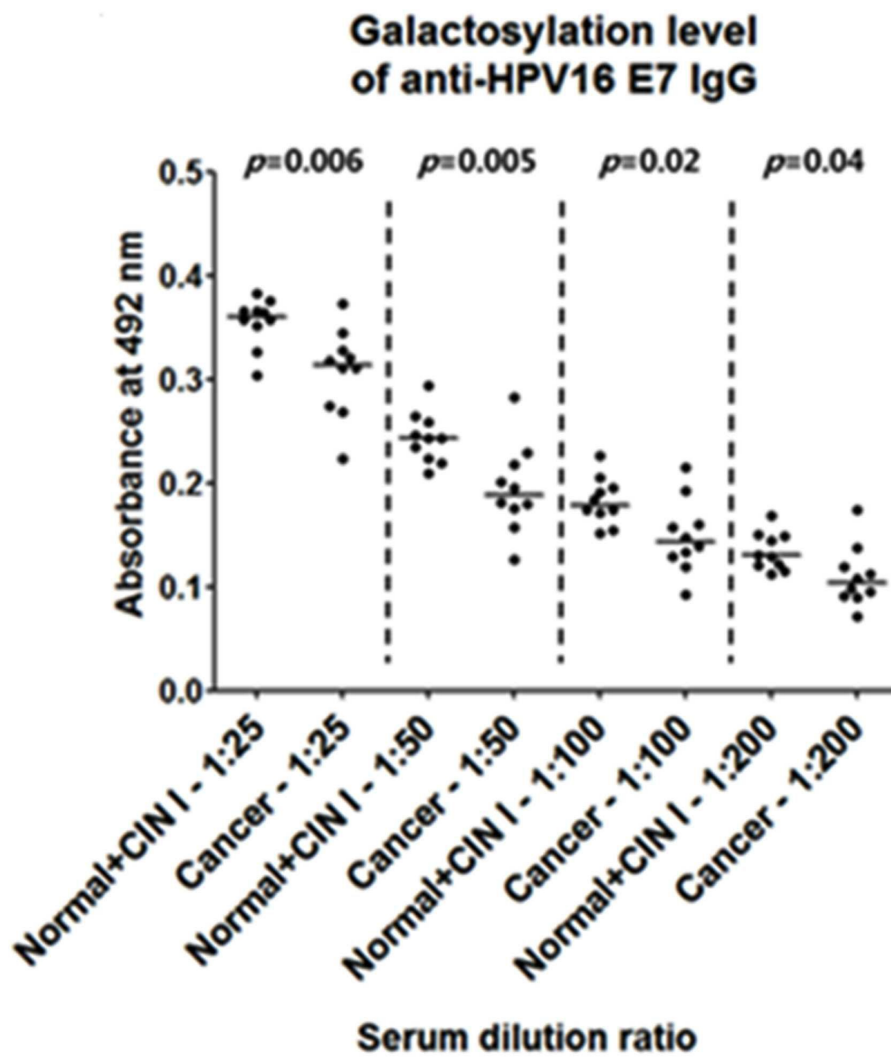
도면24



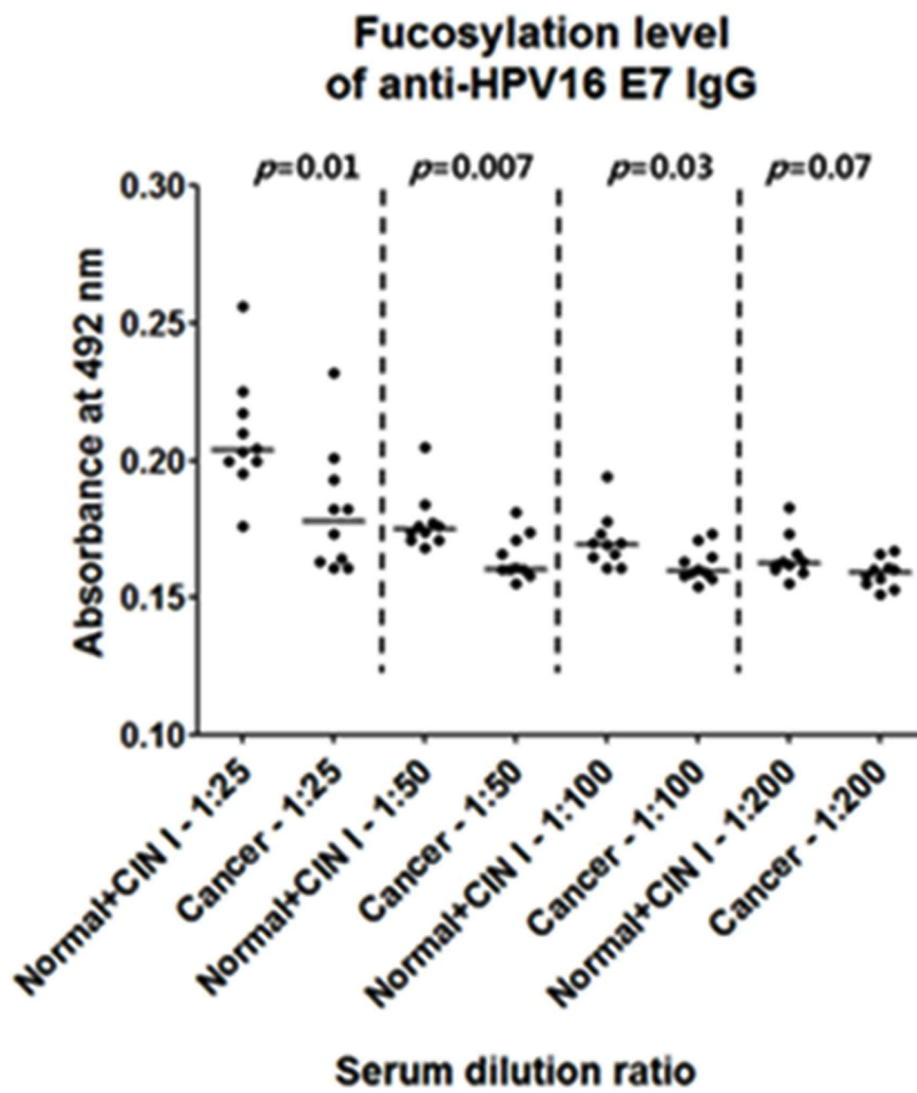
도면25



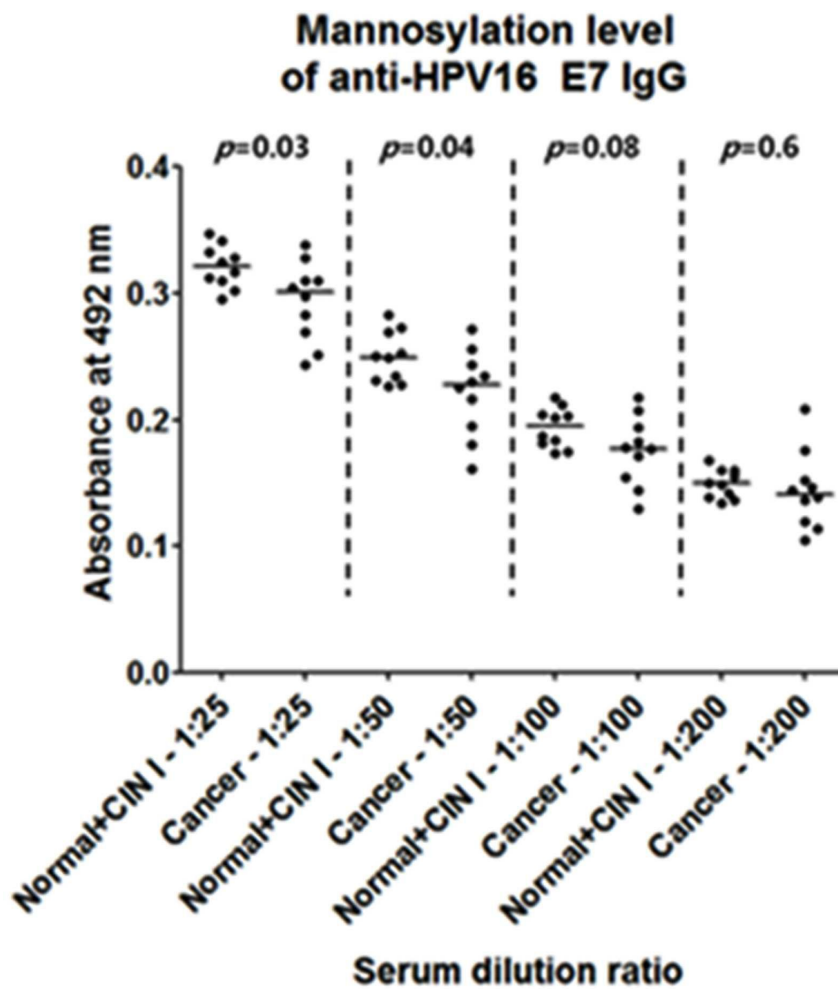
도면26



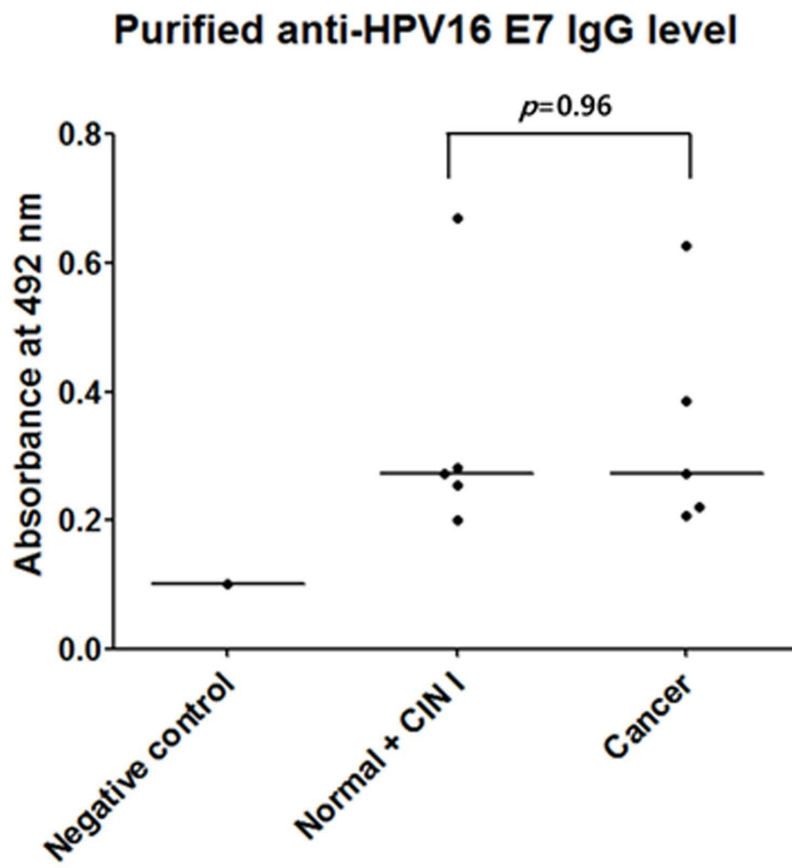
도면27



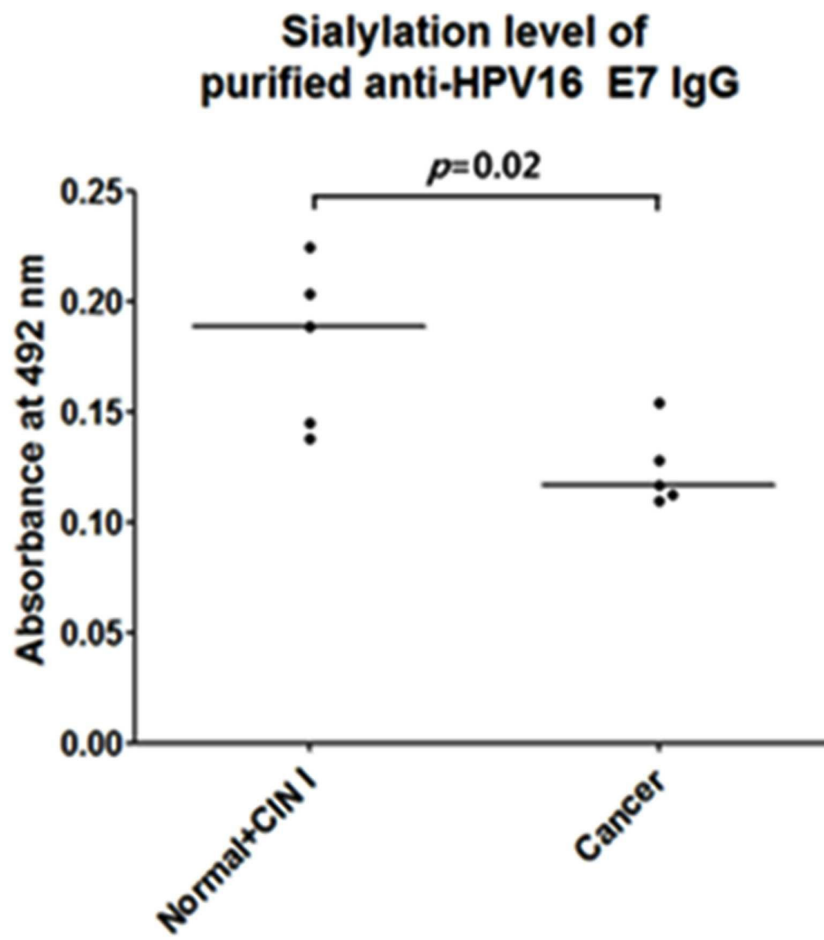
도면28



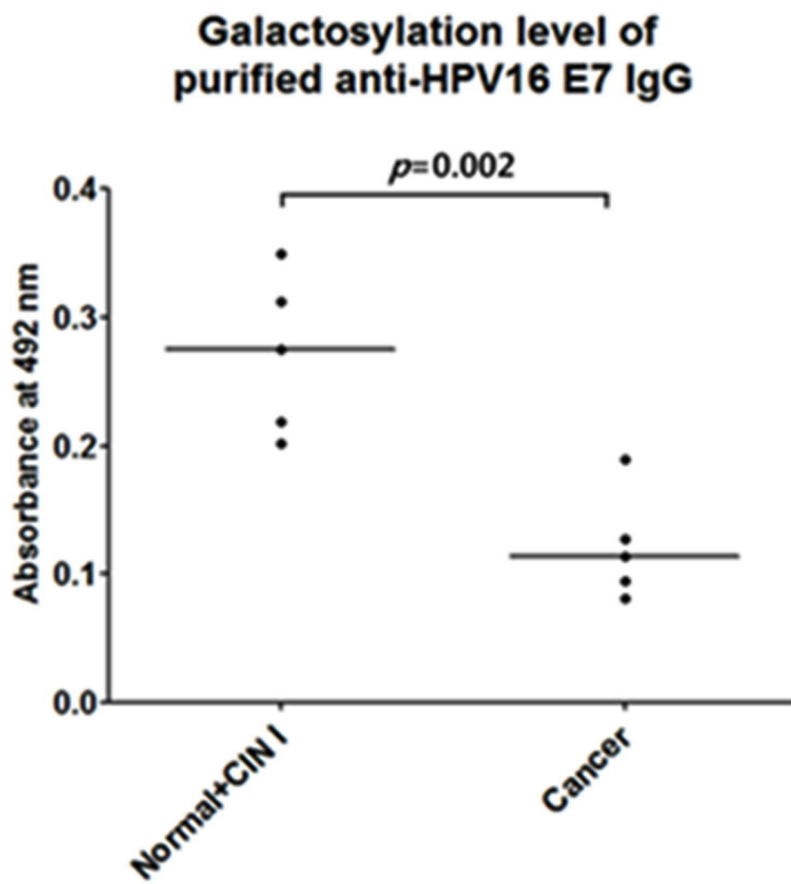
도면29



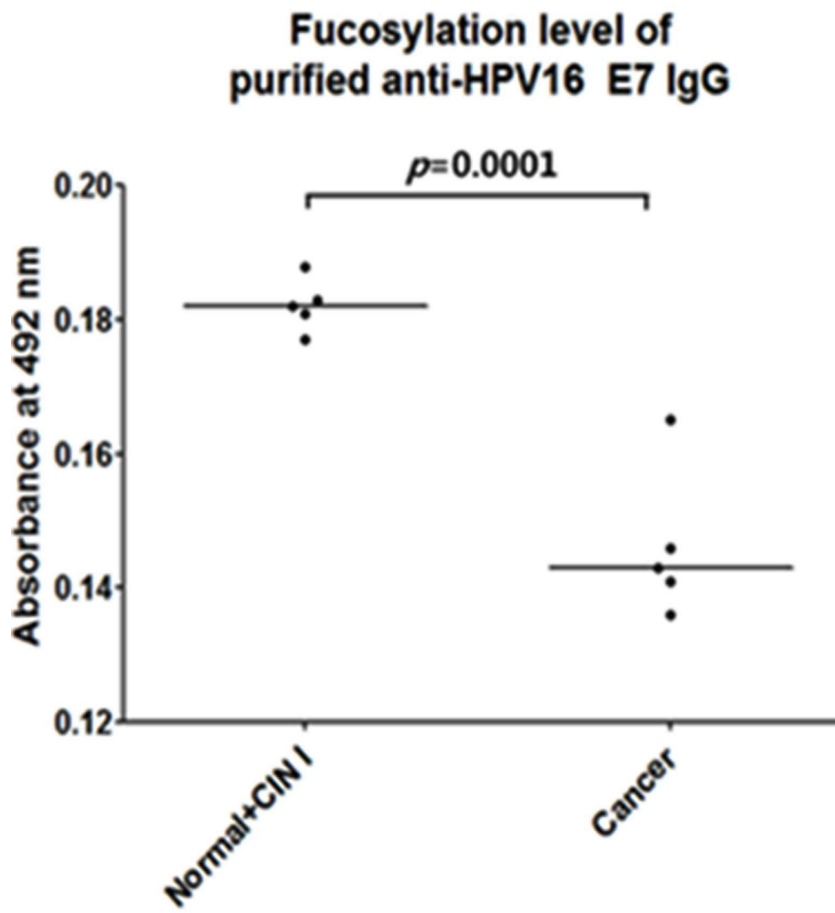
도면30



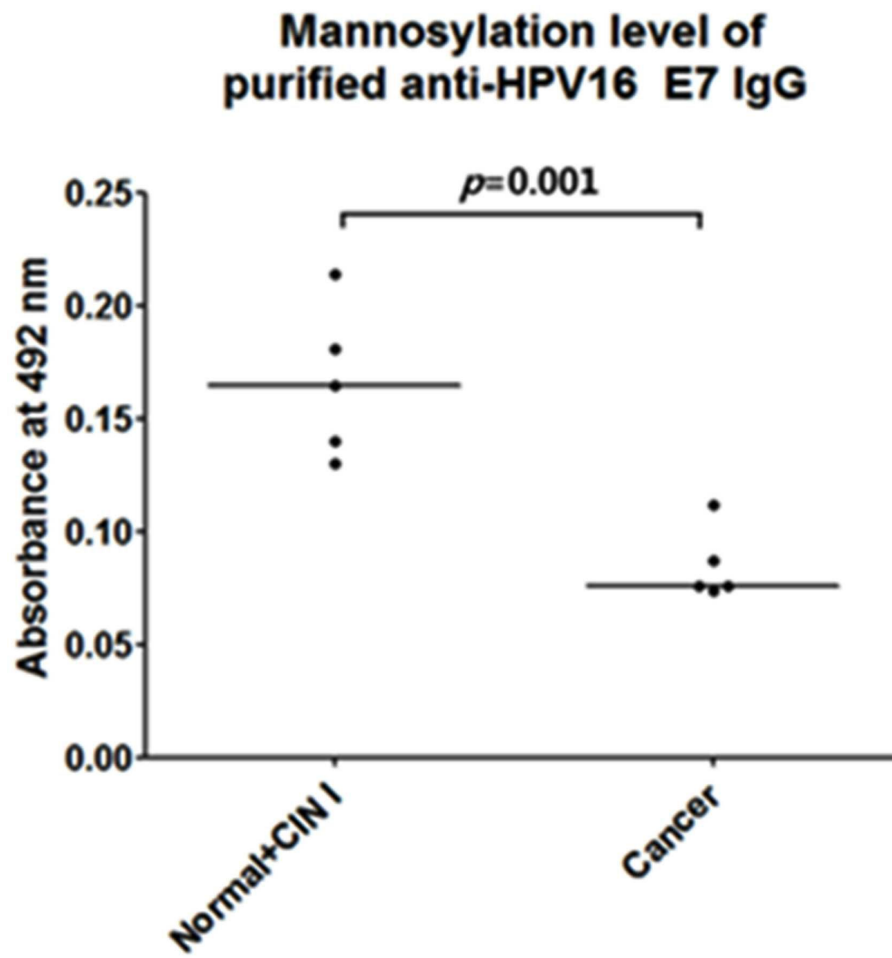
도면31



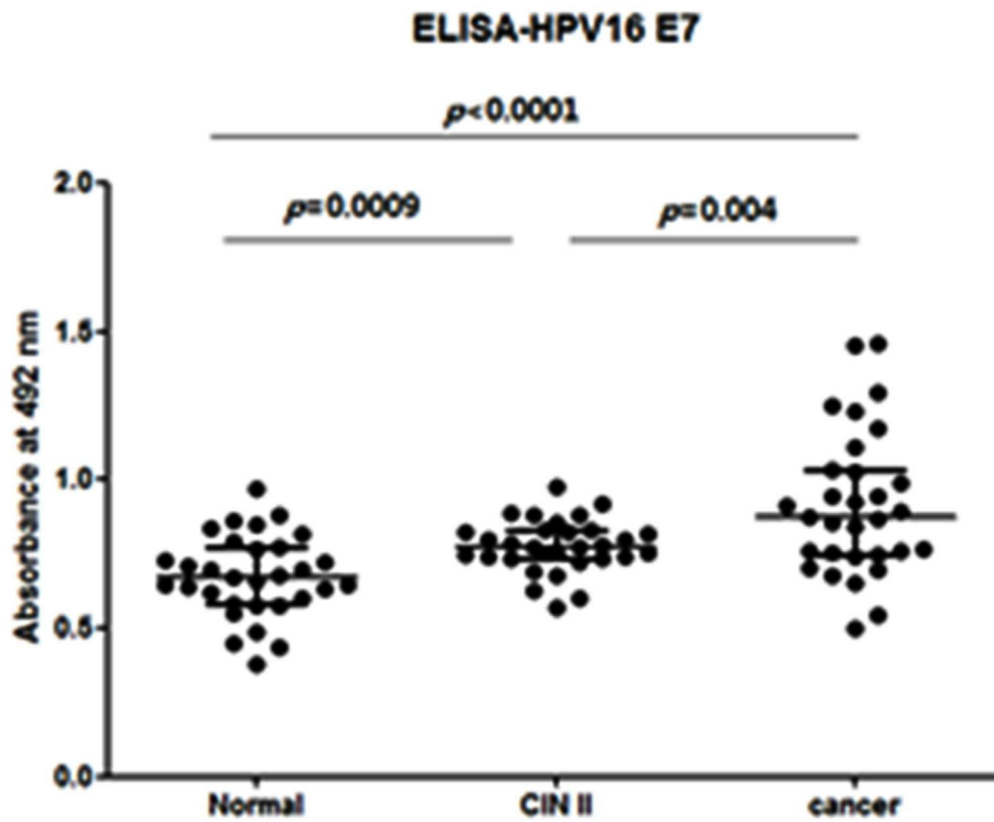
도면32



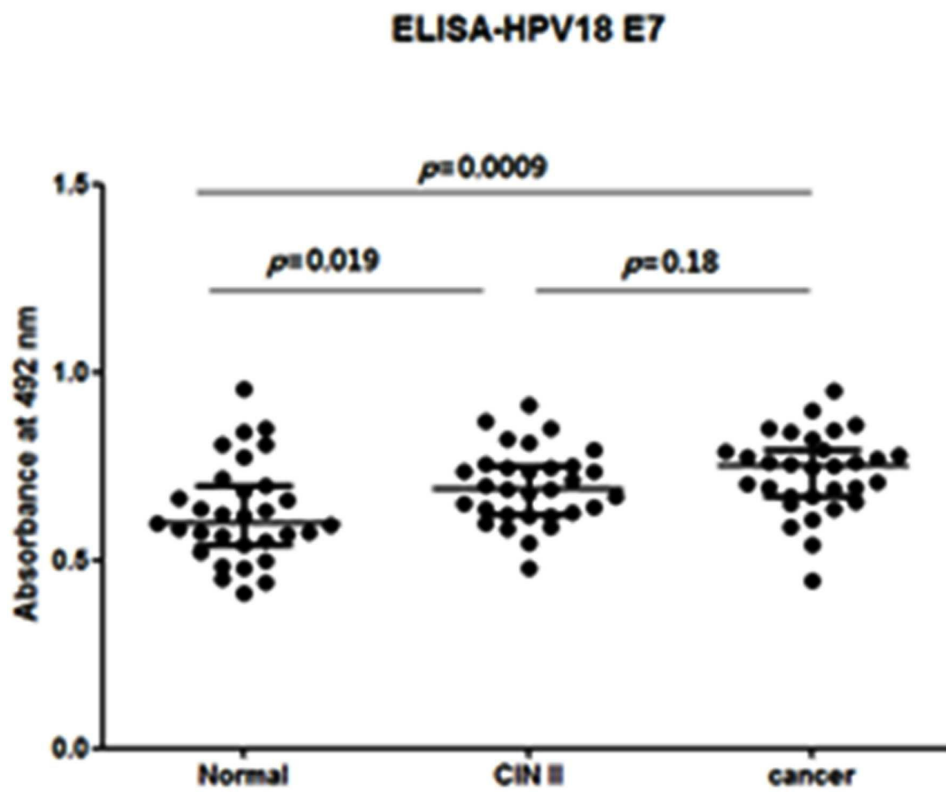
도면33



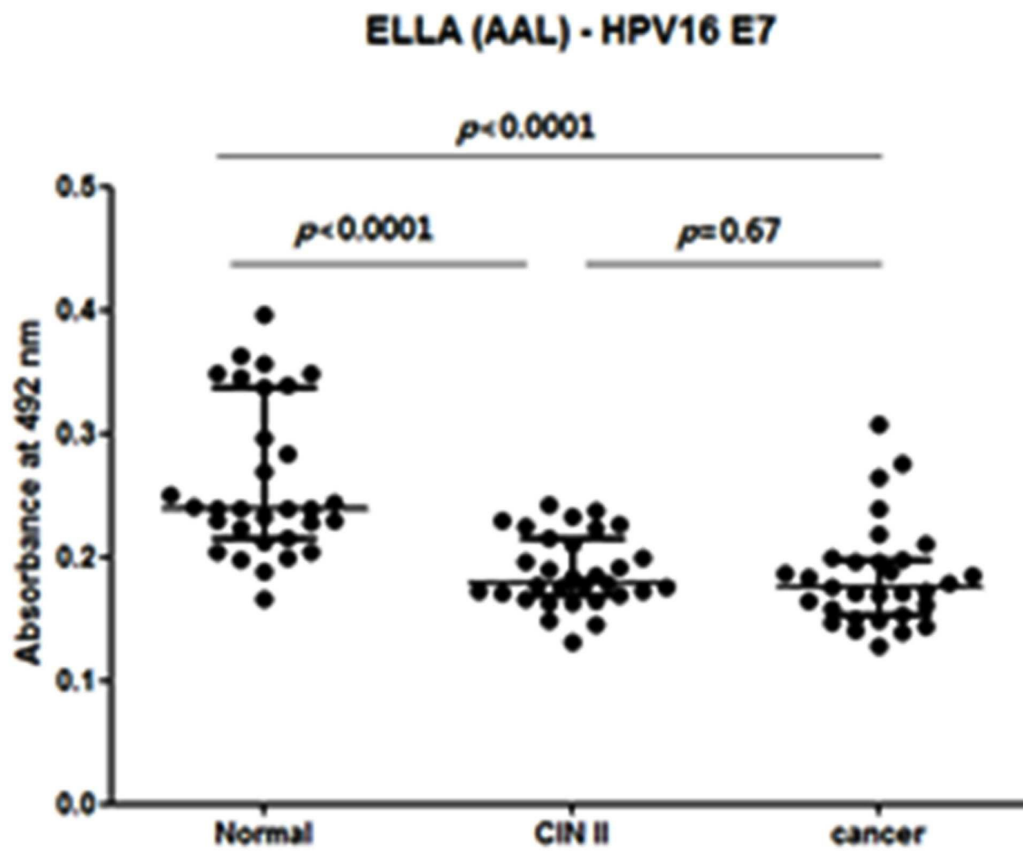
도면34



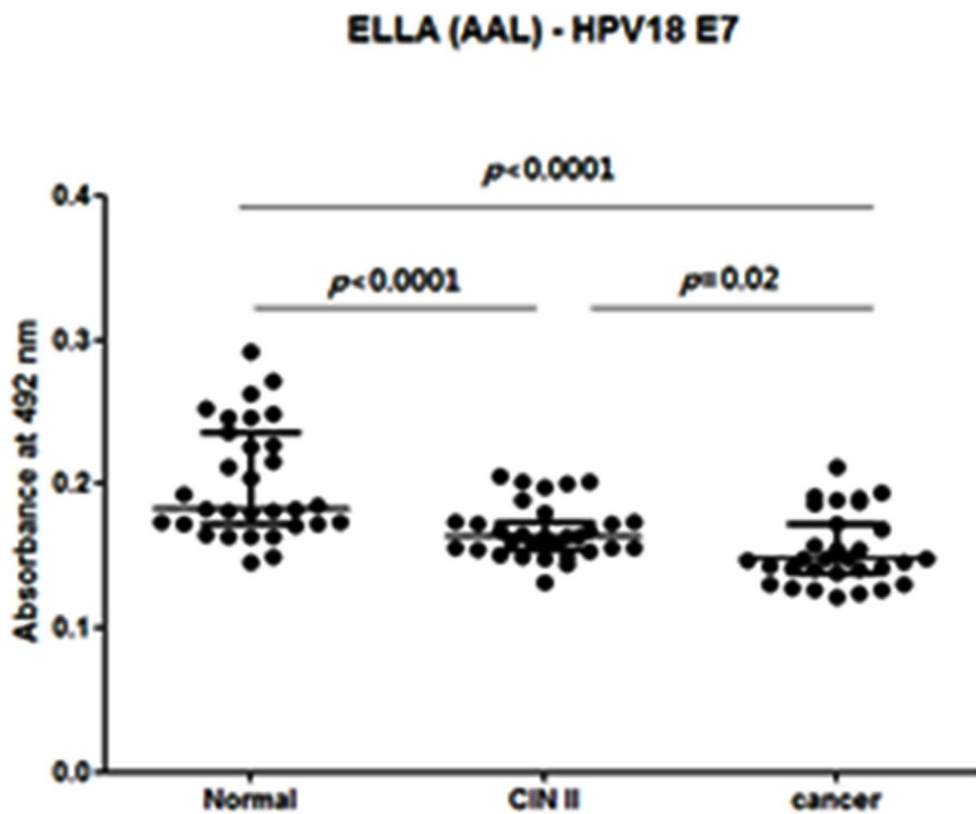
도면35



도면36



도면37



서열 목록

- <110> Chung-Ang University Industry-Academy Cooperation Foundation
Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Method of diagnosis of cervical cancer using glycosylation
anaylsis of serum antibody and kit for diagnosis of cervical
cancer using the same
- <130> MP16-215
- <150> KR 10-2015-0015316
- <151> 2015-01-30
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 500
- <212> PRT
- <213> Protein A
- <400> 1

Met Lys Lys Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Arg Lys Leu Gly Val Gly Ile

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

Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln			
85	90	95	
Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu			
100	105	110	
Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser			
115	120	125	
Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys			

130 135 140
 Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys

 145 150 155 160
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn

 165 170 175
 Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser

 180 185 190
 Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln

 195 200 205
 Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe

 210 215 220

 Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
 225 230 235 240
 Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu

 245 250 255
 Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn

 260 265 270
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu

 275 280 285
 Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys

 290 295 300
 Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 305 310 315 320
 Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys

 325 330 335
 Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys

 340 345 350
 Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys Lys Pro Gly Lys

 355 360 365

 Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys Lys Pro Gly Lys

 370 375 380

Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys
 385 390 395 400
 Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly Asp Thr Val Asn
 405 410 415
 Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys Ile Ala Ala Asp
 420 425 430
 Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly Gln Glu Leu Val
 435 440 445
 Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala Asn Lys Ala Gln
 450 455 460
 Ala Leu Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile Gly Thr Thr Val
 465 470 475 480
 Phe Gly Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg
 485 490 495
 Arg Arg Glu Leu
 500
 <210> 2
 <211> 593
 <212> PRT
 <213>
 > Protein G
 <400> 2
 Met Glu Lys Glu Lys Lys Val Lys Tyr Phe Leu Arg Lys Ser Ala Phe
 1 5 10 15
 Gly Leu Ala Ser Val Ser Ala Ala Phe Leu Val Gly Ser Thr Val Phe
 20 25 30
 Ala Val Asp Ser Pro Ile Glu Asp Thr Pro Ile Ile Arg Asn Gly Gly
 35 40 45
 Glu Leu Thr Asn Leu Leu Gly Asn Ser Glu Thr Thr Leu Ala Leu Arg
 50 55 60
 Asn Glu Glu Ser Ala Thr Ala Asp Leu Thr Ala Ala Ala Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Thr Val Ala Ala Ala Ala Glu Asn Ala Gly Ala Ala Ala Trp Glu

85 90 95
 Ala Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ala Lys Ala Lys Ala Asp Ala Leu
 100 105 110
 Lys Glu Phe Asn Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
 115 120 125
 Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val

 130 135 140
 Val Glu Ser Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu
 145 150 155 160
 Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser
 165 170 175
 Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
 180 185 190
 Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr
 195 200 205

 Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Ala Lys
 210 215 220
 Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys
 225 230 235 240
 Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu
 245 250 255
 Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
 260 265 270
 Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys

 275 280 285
 Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Thr Asp Thr Tyr
 290 295 300
 Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu
 305 310 315 320
 Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn
 325 330 335
 Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr

				340				345				350			
Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr
355				360				365							
Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	Ile	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Lys
370				375				380							
Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Val
385				390				395				400			
Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr
405				410				415							
Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile
420				425				430							
Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	Ile
435				440				445							
Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Asp	Ala
450				455				460							
Glu	Thr	Ala	Glu	Lys	Ala	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val
465				470				475				480			
Asp	Gly	Val	Trp	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr
485				490				495							
Glu	Met	Val	Thr	Glu	Val	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Thr	Glu	Pro	Glu	Lys
500				505				510							
Pro	Glu	Ala	Ser	Ile	Pro	Leu	Val	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Thr	Pro	Ile
515				520				525							
Ala	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Thr	Lys	Lys	Glu	Asp	Ala	Lys
530				535				540							
Lys	Pro	Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Ala	Glu	Thr	Leu	Pro
545				550				555				560			
Thr	Thr	Gly	Glu	Gly	Ser	Asn	Pro	Phe	Phe	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala
565				570				575							
Val	Met	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Lys	Arg	Lys	Glu
580				585				590							

Asp

<210> 3

<211> 98

<212> PRT

<213> HPV16 E7

<400> 3

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Val Gln

1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser

20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp

35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr

50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu

65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln

85 90 95

Lys Pro

<210> 4

<211> 105

<212> PRT

<213> HPV18 E7

<400> 4

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu

1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser

20 25 30

Asp Ser Lys Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His

35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met

50	55	60	
Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala			
65	70	75	80
Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe			
	85	90	95
Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln			
100	105		