



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월18일
(11) 등록번호 10-2433541
(24) 등록일자 2022년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C07K 16/08 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
C07K 16/084 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7020463
(22) 출원일자(국제) 2017년12월13일
심사청구일자 2020년12월11일
(85) 번역문제출일자 2019년07월12일
(65) 공개번호 10-2019-0097155
(43) 공개일자 2019년08월20일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/082506
(87) 국제공개번호 WO 2018/108957
국제공개일자 2018년06월21일
(30) 우선권주장
10 2016 124 171.7 2016년12월13일 독일(DE)
(56) 선행기술조사문헌
JP2005524076 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 19 항

(73) 특허권자
아브비리스 도이칠란트 게엠베하
독일 22926 아렌스부르크 바이무르크암프 6
(72) 발명자
힐프리흐, 랄프
독일 65597 흰펠든 줌 롬베르크 24
(74) 대리인
특허법인다나

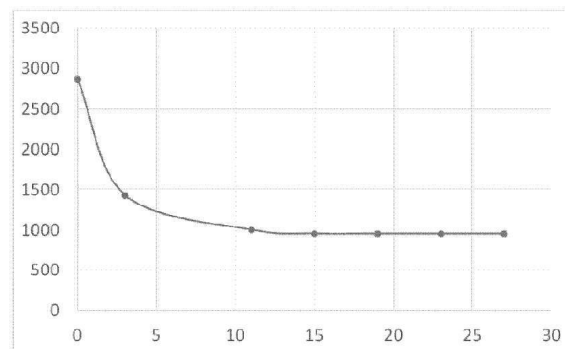
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 HPV 16 양성 암종의 치료 조절을 위한 혈청학적 검사

(57) 요약

본 발명은 HPV16 양성 암종의 치료 조절 방법, 해당 진단 방법에 사용하기 위한 항체 및 상기 방법을 수행하기 위한 검사에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 미리 결정된 기간 동안 HPV16 양성 암종을 치료하기 전후에 환자로부터 채취한 샘플에서 항체 양의 발생을 모니터링하기 위한 혈청학적 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 방법을 수행할 수 있는 키트 형태의 면역학적 검사를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
G01N 33/558 (2021.08)
G01N 33/57488 (2013.01)
C12N 2710/20022 (2013.01)
C12N 2710/20023 (2013.01)
G01N 2333/025 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)
G01N 2800/54 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Neil D Christensen et al, *Virology* (1996), vol 223, pp 174-184.
Qinjian Zhao et al, *Virology Journal* (2012), vol 9, no 1, pp 52.
Zhaohui Wang et al, *Journal of General Virology* (1997), vol 78, pp 2209-2215.
D Skiba et al, *Anticancer Research* (2006), vol 26, pp 4921-4926.
Kurt Heim et al, *Am J Obstet Gynecol* (2002), vol 186, pp 705-711.

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 HPV16-양성 암종의 처치 후 치료 조절을 위한 생체의(*in vitro*) 방법:

(a) 항종양 치료를 받은 HPV16-양성 암종을 갖는 환자의 샘플을, 단량체성 또는 변성된 HPV16 L1에는 존재하지 않는 항원결정기인 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머의 구조적 항원결정기(conformational epitope)를 포함하는 복수의 항원과 접촉시키는 단계; 및

(b) 환자에서 항종양 치료의 성공과 음의 상관관계(negative correlation)를 갖는, 항원과 결합한 샘플에서 항체의 결합을 감지하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 항원과 결합한 샘플에서 상기 항체의 결합은 샘플을 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 표지된 항체와 접촉시켜 감지하는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 표지된 항체는 수탁번호 DSM ACC3306을 갖는 하이브리도마 세포주로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체의 결합은 결합의 기준 수준(reference level)과 비교되고, 상기 환자에서 미리 결정된 시간 동안 상기 결합의 감소는 성공적인 항암 치료를 나타내고, 시간 동안 상기 결합의 증가는 HPV16-양성 암종의 재발을 나타내는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항체의 결합은 미리 결정된 시간 간격에서 상기 환자로부터 채취한 하나 이상의 샘플에서의 항체의 결합과 비교되는 것인, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 표지된 항체는 검사 스트립 상에 이동가능한 형태(mobile form)로 존재하고, 항원 및 표지된 항체의 복합체는 다른 항체와의 결합에 의해 검출되는 것인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 다른 항체는 수탁번호 DSM ACC3306을 갖는 하이브리도마 세포주로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

하기 단계를 포함하거나 또는 하기 단계로 이루어지는 HPV16 양성 암종의 처치 후 치료 조절을 위한 생체의 방법:

(a) 환자의 샘플을 단량체성 또는 변성된 HPV16 L1에는 존재하지 않는 구조적 항원결정기를 갖는 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 복수의 항원과 혼합하는 단계;

(b) 단계 (a)의 혼합물을 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합

하는 표지된 항체와 접촉시키는 단계;

(c) HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조-제시-항원과 결합한, 샘플의 표지된 항체 또는 항체를 각각 정량하는 단계;

(d) 미리 결정된 시간 간격으로 동일한 환자로부터 채취한 샘플로 단계 (a) 내지 (c)를 1회 이상 반복하여 환자에서 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합하는 항체의 양의 경향을 미리 결정된 기간 동안 샘플에 기초하여 추적하는 단계; 및

하기 (e) 및 (f) 중 적어도 하나의 단계;

(e) 샘플에서 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합한 항체의 양을 결정하여 성공적 치료 후의 양의 감소를 관찰하는 단계,

(f) 샘플에서 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합한 항체의 양을 결정하여 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합한 항체의 양이 샘플에서 미리 결정된 기간 내에 다시 증가하는지 관찰하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 표지된 항체는 수탁번호 DSM ACC3306을 갖는 하이브리도마 세포주로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원은 고정되지 않고 환자 샘플이 첨가되는 액상으로 제공되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자 샘플은 항원과 동시에 접촉되거나 또는 혼합되고, 표지된 항체와 접촉되는 것인, 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 단계 (b)의 혼합물은 표지된 항체가 이동가능한 형태로 존재하는 검사 스트립을 가로질러 이동하고, 상기 단계 (c)에서 항원 및 표지된 항체의 복합체는 다른 항체와의 결합에 의해 검출되는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 다른 항체는 수탁번호 DSM ACC3306을 갖는 하이브리도마 세포주로부터 수득된 항체인 것인, 방법.

청구항 15

HPV16-양성 암종을 표적하는 적어도 하나의 항암 치료를 이전에 투여받은 환자를 치료하기 위한 정보를 제공하는, 하기 단계를 포함하는 방법:

(A) 미리 결정된 기간 동안 환자 샘플에서 HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머의 구조적 항원결정기에 결합하는 항체가 증가하는지 확인하는 단계; 및

(B) 환자에서 항체 증가가 검출되는 경우 HPV16 양성 암종을 표적으로 하는 추가 항암 치료가 필요한 것으로 결정하는 단계.

청구항 16

기탁 번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한, HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 17

삭제

청구항 18

HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 항원으로서,

상기 HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머 구조는 기탁 번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한 항체에 특이적으로 결합하는 구조적 항원결정기를 갖는 것인, 항원.

청구항 19

삭제

청구항 20

HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 바이러스 유사 입자로서,

상기 HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머 구조는 기탁 번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한 항체에 특이적으로 결합하는 구조적 항원결정기를 갖는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 21

삭제

청구항 22

다음을 포함하거나 또는 다음으로 구성되는 환자의 샘플에서 항체의 양을 결정하기 위한 키트:

- (a) HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조의 구조적 항원결정기를 나타내는 항원을 포함하는 조성물, 및
- (b) HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 포함하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 표지된 항체는 기탁 번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한 항체인 것인, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HPV16 양성 암종의 치료 조절 방법, 해당 진단 방법에 사용하기 위한 항체 및 상기 방법을 수행하기 위한 검사(test)에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 미리 결정된(predetermined) 기간 동안 HPV16 양성 암종을 치료하기 전후에 환자로부터 채취한 샘플에서 항체 양의 발생을 모니터링하기 위한 혈청학적 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 방법을 수행할 수 있는 키트 형태의 면역학적 검사를 제공한다.

배경 기술

[0002] 한편, 피부 또는 다양한 점막의 상피 세포를 감염시킬 수 있는 100종 이상의 인간 유두종 바이러스(human papilloma viruses, HPV)가 알려져 있다. HPV 감염은 널리 전파되며 상이한 HPV 유형은 다른 임상적 특징에 기여한다. 유형 1의 HPV 및 유형 2의 HPV는 손과 발에 사마귀(wart)를 일으키는 반면, 유형 6의 HPV와 유형 11의 HPV는 11 생식기 사마귀(genital wart)를 유발한다. 많은 경우에, 이러한 감염은 임상적 증상이 없지만, 영향을 받은 상피 세포의 종양-유사(tumor-like) 성장을 초래할 수 있다. 그러한 종양이 대부분 양성(benign)임에도 불구하고, 전술한 바와 같이, 사마귀의 형성만을 유도하지만, 한편 일부 HPV는 또한 악성 변화(malignant change)를 일으킬 수 있고, 따라서 예를 들어, 생식기 부위뿐만 아니라 입이나 목 부위에서도 암 발생의 원인이 될 수 있다.

[0003] 이러한 악성 종양의 치료 방법으로는 수술, 방사선치료(radiotherapy), 화학치료(chemotherapy), 면역치료(immunotherapy) 또는 이들 방법의 조합이 있다. HPV 양성 암종의 처치(treatment) 후 치료 조절과 관련하여, 인체에 남아있는 종양 세포뿐만 아니라 재발 또는 전이를 검출하여, 가시적인 이차 종양이 형성되기 전에 예를

들어, 화학치료 또는 면역치료와 같은 처치가 재개될 수 되도록 하는 것이 바람직하다.

- [0004] 다양한 간행물은 환자의 혈청 내 HPV 특이적 항체의 측정 및 HPV 양성 암종의 발생 또는 재발생과 관련하여 수득한 데이터의 진단과 예후 값(value)에 대해 다루고 있다.
- [0005] 진단 또는 예후 값의 추론에 구체적으로 유용한 것은 종양 항원으로 불리는, 즉 종양 세포의 일부이고, 그것에 특이적이며, 면역계에 의해 인식되고, 면역 반응을 일으킬 수 있는 특정 항원 구조이다. 그러나 종양 항원으로 불리는 HPV E6 및 HPV E7은 제한된 범위에서만 적합하며, 이러한 단백질 항원은 모든 HPV 유형에서 발생하고, 거의 동종(homologous)이어서 예를 들어, HPV16 특이적 E6 또는 E7 단백질이 혈청학적 검출에 사용될 때조차도 유형 특이적 평가를 허용하지 않기 때문이다. 그러나 혈청학적 반응의 이러한 유형 특이적 검출은 예를 들어, 위양성(false-positive) 결과로 간주되어 환자에게 치명적인 결과를 초래할 수 있는 발의 양성 사마귀에 대한 면역 반응이 아니라 종양을 유발한 HPV 유형에 대한 면역계의 반응을 측정하는데 필요하다.
- [0006] HPV는 dsDNA 바이러스이다. 비캡슐화된 비리온(non-encapsulated virion)은 정이십면체 캡시드로 구성된다. L1(후기 단백질(late protein) 1)은 다른 것들 사이에서 HPV의 캡시드 형성을 결정하며 주로 HPV 유형의 면역원성(immunogenicity)을 담당한다.
- [0007] Af Geijerstam 등은 Journal of Infectious Diseases, 177, 1998, 1710-1714에서 두 번째 임신까지의 기간 동안 초산 여성(primiparous women)에서 HPV16 캡시드 특이적 항체의 혈청 수준을 측정한 연구를 기술한다. 이 연구에서 혈청 내 HPV16 캡시드 특이적 항체의 양은 수년 동안 안정적이고, 항체의 양은 의학적 상태가 아니라 성교 파트너의 수와 관련이 있다는 것을 추론할 수 있다.
- [0008] 추가 연구는 HPV16 감염이 자궁 경부암(cervix carcinoma)의 늦은 발생에 대한 위험 인자에 해당하는지 여부에 대한 문제를 다루고 있다(Shah et al., Cancer Epidemiology, Bi-omarkers & Preventions, 6, 1997, 233-237). 혈청 내 많은 양의 HPV16 캡시드 항체의 존재는 자궁 경부암 발생의 높은 위험과 관련이 있다. 또한 HPV16 캡시드 항체가 7 내지 13년의 기간 동안 현저하게 감소하지 않았다는 사실이 검사에서 밝혀졌다.
- [0009] Koslabova 등은 International Journal of Cancer, 133, 2013, 1832-1839에서 종양 환자의 치료 후에 HPV16 바이러스 유사 입자(VLPs), 즉 캡시드에 대하여 오래 지속되는 혈청반응양성(seropositivity)이 관찰된다고 기재하였다. 이는 치료 후 L1 특이적 항체의 양의 감소는 치료의 성공을 조절하기에 적합하지 않은 것으로 보임을 의미한다. 요약해서 말하자면, HPV16 캡시드 항원에 특이적인 항체의 역가(titer)는 처치 후 관찰 기간 동안 변하지 않는다. 따라서 L1은 발달을 모니터링하거나 또는 심지어 재발을 탐지하는데 적합한 마커에 해당하지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이미 상기에서 언급했듯이 추가의 문제는 기존의 항체 검사의 유형 특이성의 결여이다. 또한 HPV의 L1 또는 주요 캡시드(main capsid) 단백질은 단량체성(monomeric) 또는 다량체성(multimeric) 형태일 수 있다. 파이프 단일 L1 단백질(Fife single L1 protein)은 결합하여 소위 캡소머(또는 오량체)를 만든다. 72개 캡소머는 캡시드의 하위 단위로서 바이러스의 캡시드를 형성하기 위해 결합하고, 유전 물질은 자연적으로 발생하는 감염(naturally occurring infection) 중에 포장된다. L1 유전자 내의 10% 핵산 서열의 차이는 새로운 HPV 유형을 기술하기 위한 요구 사항으로 정의된다. 이것은 심지어 다른 HPV 유형이더라도 L1 유전자와 단백질의 거의 90%가 동일할 수 있음을 의미한다. 주요 캡시드 단백질(L1) 외에도, 또한 소수(minor) 캡시드 단백질 L2가 있다. L2 단백질은 또한 고도로 보존, 즉 많은 부분에서 동일한 단백질이다. 따라서 L2 단백질은 특정 HPV 유형에 특이적이지 않다.
- [0011] 그럼에도 불구하고 두 단백질 모두 특정 HPV 유형에 특이적인 부분이 있을 수 있다(예를 들어, Christensen 참조). 이는 유형-특이적 및 비-유형-특이적 (그룹-특이적, 예를 들어, 고위험 유형 또는 속-특이적) 항원결정기(항체에 대한 결합 부위)가 서로 인접하여 존재할 수 있음을 의미한다.
- [0012] 환자 샘플의 항체가 다클론 기원(polyclonal origin), 즉 많은 다른 항원 또는 항원의 상이한 부분에 대해 지시되기 때문에, 유형-특이적 및 비-유형-특이적 L1 항체는 과산화효소 또는 형광 표지된 항-IgG 특이적 접합체(conjugate)를 갖는 ELISA 검사의 '전통적인' 배치에서 단량체성 L1 단백질을 사용한 경우 구분될 수 없다. L1 단백질이 HPV 유형 16으로부터 유래된 경우라 할지라도, 100가지 이상의 상이한 HPV의 항-L1 항체의 존재만이

검출된다. HPV 그룹 내에서 단백질의 매우 높은 상동성으로 인하여, 사용된 L1 항원의 보여지는(seeming) 유형 특이성은 매우 오도된 것이다.

[0013] 결과적으로, HPV 혈청학은 항체의 양이 수년 동안 안정하게 유지되고 치료 후에 반드시 감소하지는 않는 것이 당해 기술 수준에서 인정되어, 이 변수(parameter)가 조건을 모니터링하기에 적합하지 않기 때문에 HPV16 양성 암종의 치료 조절에 적합하지 않다. 또한, 상이한 HPV 유형은 통상적인 항체 검사를 사용하여 구별할 수 없다.

[0014] 그러나 놀랍게도, 현재 단량체성 및/또는 변성된 HPV16 L1 단백질에는 존재하지 않는 항원결정기인, HPV16 L1 캡시드의 적어도 하나의 구조적 항원결정기 (conformational epitope)에 결합하는 특정 HPV16 L1 캡시드 특이적 항체에 대하여, 항체 양의 감소 및 반등(rebound)이 관찰된다. 따라서, 처음으로, HPV16 L1 캡시드 특이적 항체의 임의량(ad hoc amount)의 진단적 측정뿐만 아니라 재발의 검출도 가능하다.

[0015] HPV16 양성 1차 종양(primary tumor)을 치료할 때, 통상적 모니터링의 맥락에서, 수주(예를 들어, 2주) 내에 HPV16 특이적 L1 항체의 양의 감소가 관찰될 수 있다. 상기 양은 꾸준히 감소하지만 기선(ground line)에서 수평을 유지하므로 안정기(plateau)가 형성된다(도 1). 인체에 남아있는 1차 종양의 HPV16 양성 세포가 다시 자라기 시작하면(재발 또는 전이), 항체 양의 빠른 증가가 관찰된다(도 2).

[0016] 항체 양의 이러한 변화(반등)은 현미경적으로 작고, 임상이가 볼 수 없는 속발성 종양(secondary tumor)의 경우 미리 관찰되므로 반등 치료 방법(rebound therapy measures)은 오늘날 일반적으로 이루어지는 것보다 훨씬 일찍 시작될 수 있고, 환자를 위한 치유의 기회가 크게 증가한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명에 의해 해결되어야 할 문제는 초기 단계에서 HPV16 양성 암종의 고도하고 유형 특이적인 치료 조절을 가능하게 하고, 재발 또는 전이와 같은 상기 질병의 재발생의 검출을 촉진하는 혈청학적 검사를 제공하는 것이다.

[0018] 이 문제는 하기 단계를 포함하는 HPV16-양성 암종의 처치 후 치료 조절용 생체의 방법에 의한 본 발명에 따라 해결된다:

[0019] (a) 항종양 치료를 받은 HPV16-양성 암종을 갖는 환자의 샘플을 단량체성 및/또는 변성된 HPV16 L1에는 존재하지 않는 항원결정기인 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머의 구조적 항원결정기(conformational epitope)를 포함하는 복수의 항원 (plurality of antigen)과 샘플 내에 존재하는 항체가 상기 항원에 결합할 수 있는 조건 하에서 접촉시키는 단계; 및

[0020] (b) 환자에서 항종양 치료의 성공과 음의 상관관계(negative correlation)를 갖는, 항원과 결합한 샘플에서 항체의 결합을 감지하는 단계.

[0021] 샘플은 처치 전 또는 항암 치료가 개시된 시점에 환자로부터 채취되어, 나중 샘플과 비교할 수 있는 샘플 내 항체의 양의 기준값(reference value)을 얻을 수 있다. 이 시점에서 환자에서는 50000 ng/ml까지의 높은 항체 수준이 관찰될 수 있다.

[0022] 바람직하게는, 항원과 결합한 샘플 내 항체의 결합은 샘플을 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 표지된 항체, 바람직하게는 기탁번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한 표지된 항체와 접촉시킴으로써 검출될 수 있다.

[0023] 보다 바람직하게는, 상기 항체의 결합은 결합의 기준 수준(reference level)과 비교되고, 바람직하게는 상기 항체의 결합은 미리 결정된 시간 간격으로 상기 환자로부터 채취한 하나 이상의 샘플에서 상기 항체의 결합과 비교하며, 미리 결정된 시간 동안 상기 결합의 감소는 성공적인 항암 치료를 나타내고, 시간 동안 상기 결합의 증가는 상기 환자에서 HPV16 양성 암종의 재발을 나타낸다.

[0024] 표지된 항체는 검사 스트립 상에 이동가능한 형태(mobile form)로 존재할 수 있고, 항원과 표지된 항체의 복합체는 다른 항체와의 결합에 의해 검출되며, 바람직하게 상기 다른 항체는 기탁번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득되는 것이다.

[0025] 본 발명에 따른 방법에서, HPV16 양성 암종의 재발로 판정된 환자는 항종양 치료를 받을 수 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, HPV16 양성 암종의 처치 후 치료 조절을 위한 방법은 하기 단계를 포함하거나 또는 하기 단계로 이루어진다:

- [0027] (a) 샘플 내에 존재하는 항체가 HPV16 L1 항원에 결합할 수 있는 조건에서, 환자의 샘플을 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내고, 단량체성 및/또는 변성된 HPV16 L1에는 존재하지 않는 구조적 항원결정기를 갖는 복수의 항원과 혼합하는 단계;
- [0028] (b) 단계 (a)의 혼합물을 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 표지된 항체, 구체적으로 기탁번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한 표지된 항체와 접촉시키는 단계;
- [0029] (c) HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원 각각에 결합된 샘플의 표지된 항체 및/또는 항체를 정량하는 단계;
- [0030] (d) 미리 결정된 시간 간격으로 동일한 환자로부터 채취한 샘플로 단계 (a) 내지 (c)를 1회 이상 반복하여 환자에서 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합하는 항체의 양의 경향을 미리 결정된 기간 동안 샘플에 기초하여 추적하는 단계; 및
- [0031] (e) 샘플에서 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합한 항체의 양을 측정하여 성공적 치료 후의 상기 양의 감소를 관찰하는 단계; 및/또는
- [0032] (f) 샘플에서 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합한 항체의 양을 측정하여 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원에 결합한 항체의 양이 샘플에서 미리 결정된 기간 이내에 다시 증가하면 HPV16--양성 암종의 재발생을 관찰하는 단계.
- [0033] 본 발명에 따른 상기 방법은 일정 기간 동안 환자의 샘플에서 항체의 양을 정량할 수 있게 하며, 따라서 치료 후의 상태의 진전을 추적할 수 있게 한다. 예를 들어, 단계 (a) 내지 (c)는 1년 내지 10년의 기간 동안 1주 내지 4주마다 반복될 수 있다.
- [0034] 성공적인 치료의 경우, 환자의 샘플에서 발견되는 항체의 양은 처치의 시작 전 또는 시작 시점에서 발견되는 항체의 양과 비교하여 2주 내에 50% 이상 감소할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 방법에서, 구조적 항원결정기를 갖고, HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 항원 또는 바이러스 유사 입자가 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 구조적 항원결정기는 기탁번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득한 항체에 특이적으로 결합한다.
- [0036] 샘플로서는 예를 들어, 전혈 또는 예를 들어, 혈청 또는 혈장과 같은 전혈의 유도체뿐만 아니라 환자의 손가락 패드로부터의 모세 혈액 또는 전혈과 같은 체액이 적합하다. 상기 방법을 수행하려면 한 방울(약 25 μ l)이면 충분하다.
- [0037] 단계 (a)에서, 환자의 샘플은 1 내지 15분, 바람직하게는 3 내지 10분의 기간 동안 배양될 수 있다. 따라서, 특이적 상호작용이 보장된다.
- [0038] 상기 치료는 구체적으로 수술, 방사선치료, 화학치료 또는 면역치료 또는 이들 방법의 조합에 의한 일차 치료이다.
- [0039] 전형적으로, 여성 환자에서 HPV16 양성 암종의 93%는 항문생식기 부위(anogenital area)에서 발견되고, 7%만이 입 또는 목에서 발견되는 반면, 남성 환자에서는 약 80%가 입 또는 목에 국소화되고(localized), 20%만이 항문생식기 부위에 있다.
- [0040] 본 발명의 맥락에서, HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조는 HPV16 L1 단백질의 응집체 또는 다량체이며, 몇 개의 L1 단백질의 상호작용에 의해 그것의 표면 상에 L1 단량체나 변성된 단백질에는 존재하지 않는 구조적 항원결정기를 형성한다. 구체적으로, HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 바이러스 유사 입자 (VLP)는 본 발명에 따라 사용된다. 일부 VLP는 몇 개의 구조적 에피토프, 즉 특이적 결합 부위를 지닐 수 있다.
- [0041] 본 발명의 맥락에서, 바이러스 유사 입자(VLP)는 바이러스 캡시드로 이루어지나, 핵산은 함유하지 않는 바이러스 입자이다. 따라서, VLP는 복제의 가능성 없이 상기 언급한 구조적 항원결정기의 제시에 적합하다.
- [0042] 상기 표지된 항체는 HPV L1 캡시드 또는 캡소머 구조의 구조적 항원결정기에는 특이적으로 결합하고 따라서 단량체성 및/또는 변성된 HPV16 L1 단백질에는 결합하지 않는 HPV16 L1에 대한 항체이다. 본 발명에 따른 바람직한 항체는 부다페스트 조약(Budapest Treaty) 하에 애브비리스 도이칠란트 게엠베하(Abviris Deutschland GmbH)에 의해 2016년 9월 14일에 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

(DSMZ)(Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany)에 기탁된, 기탁번호 DSM ACC3306의 하이브리도마 세포주로부터 수득할 수 있다. 항체의 표지를 위해, 당업자는 결합된 및 결합되지 않은 항체의 양을 정량할 수 있는 최신 기술의 적절한 방법을 알고 있다. 특히 바람직하게, 상기 항체는 금 입자로 표지된다.

- [0043] 검출을 위해, 상업적으로 이용 가능한 검사 스트립(test strip)용 판독기, 예를 들어, QIAGEN의 EseQuant가 사용될 수 있다. 측정은 광-광학적으로(photo-optically) 또는 전도도를 결정하여 수행될 수 있다. 대안으로, 착색되거나 방사능으로 표지된 입자(소포)가 사용될 수 있다.
- [0044] 상기 방법은 HPV 유형 16에 절대적으로 특이하며, 다른 항체와는 교차 반응(cross-reaction)이 없다. 그 이유는, 구체적으로, 캡소머 구조가 L1 응집체로서 존재하여, 구조적 항원결정기가 표면에 존재하기 때문이다.
- [0045] L1 단백질이 특정 HPV 유형(즉, 유형 특이적)에 특이적인 응집체(동의어는 다량체, 오량체 또는 또한 캡소머)를 형성할 때, 몇 개의 L1 단백질의 상호작용에 의해 이들 응집체의 표면(외부를 향해 위치된 캡시드 영역)에 구조(구조적 항원결정기-항체 결합 부위)가 형성된다.
- [0046] 다른 한편으로, L1 단백질의 높은 상동성 영역은 표면이 아니라 내부에 있도록 배향된다(oriented). 이러한 영역은 바이러스성 유전 물질의 통합(integration)에 필요하다. 이는 검사에 사용된 바이러스성 또는 비감염성 바이러스 유사 입자(VLP)의 경우, 유두종 바이러스의 과(family) 내에서 강력하게 일치하는, 상기 기술한 영역이 입자의 내부에 숨겨져 있음을 의미한다. 따라서 인간 샘플에서 이러한 영역은 그룹 특이적 항체로 VLP에 더 이상 접근할 수 없으며, 배타적으로 특정 유형 항체가 검출가능하다.
- [0047] 그러나 VLP 정제 동안 단량체성 단백질은 100% 제거될 수 없다. 따라서 정제된 VLP는 항상 캡소머를 포함한다. 이는 상기 정제된 L1 단백질을 운반 매체(carrier medium)(예를 들어, 고전적인 ELISA 플레이트)에 직접 고정하는 경우, 유형 특이적 VLP뿐만 아니라 비유형 특이적 영역을 갖는 단량체성 L1 단백질 및 캡소머 모두를 검사에 사용할 수 있음을 의미한다.
- [0048] 단량체성 또는 변성된 단백질을 갖는 유형 특이적 L1 VLP의 이러한 오염은 검사 결과가 유형 특이적 또는 집단 특이적 결합 부위에 기인할 수 있는지 여부를 결정할 수 없기 때문에 인간 샘플과 같은 항체 혼합물에서 유형 특이적 항체를 더 이상(신뢰성있게) 식별할 수 없도록 한다.
- [0049] L1 및 L2 단백질로 구성된 VLP에 대해서도 마찬가지이다.
- [0050] 본 발명에 따른 환자 항체 및 HPV16 특이적 L1 항체 간의 경쟁 접촉(approach)을 사용하여, 검사 시스템이 본 발명에 따른 항체와 경쟁하는 HPV16 L1 특이적 항체를 배타적으로 측정할 수 있기 때문에 이러한 오염 문제는 해결될 수 있다.
- [0051] 따라서, 항원은 고정되지 않고 환자 검체가 첨가되는 액상으로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0052] 이것은 중요한 장점 또는 각각 다음과 같은 배경을 가지고 있다: ELISA 플레이트 판매에 필요한 고정화 및 순차적 보존(건조에 의한-수화 껍질(hydrate shell)의 손실은 단백질의 구조 변화를 일으킴)에 의하여, 항원(VLPs)은 변형되고, 즉, 그들은 그들의 유형 특이적 항원결정기를 소실하며, 따라서 검사에 무용하게 된다. 환자 샘플을 VLP 용액에 첨가할 때, 환자 샘플의 항체 및 항원이 아주 근접하게 된다. 따라서 결합 반응의 동역학이 현저하게 빨라지며, 신속 검사(quick test)에 매우 유용하다. 또한, 환자 샘플 내의 모든 항체가 검사에 '신속하게' 이용가능하기 때문에 분석 민감도가 증가한다.
- [0053] 한편, 운반 매체에 고정된 경우, 예를 들어, 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate), 표면에 근접하게 있는 항체만 반응물로 이용가능하다. 반응 용기의 루멘(lumen) 내의 항체는 실질적으로 '전혀' 반응 용기의 표면에 도달하지 못하며, 그들은 시간이 '많이' 걸리는 브라운 운동만으로 표면까지 1 ~ 2 mm의 거리를 가로질러야 하기 때문이다.
- [0054] 또한, 환자 샘플을 항원과 동시에 혼합하고 표지된 항체와 접촉시키는, 상기 기재된 방법이 또한 바람직하다.
- [0055] 유리하게는, 환자 샘플을 항원과 동시에 혼합하고 이를 항체와 접촉시키는 것도 가능하다. 이러한 방식으로, 환자 샘플로부터의 항체 및 결합 부위에 대한 표지된 항체 사이의 직접 경쟁이 이루어지고, 상기 기술된 바와 같은 빠른 결합 동역학으로 인해, 본 발명에 따른 방법에서 보다 정확한 검사 결과가 유도된다. 따라서, 상기 검사 방법은 단일 단계로 수행될 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 기술된 본 발명에 따른 방법은 상기 단계 (b)에서 혼합물은 표지된 항체가 이동 가능한 형태로 존재하는 검사 스트립을 가로질러 이동하고, 단계 (c)에서 항원 및 표지된 항체의 복합체는 다른 항체, 바람직하게

또한 기탁번호 DSM ACC3306인 하이브리도마 세포주로부터 수득한 것인 다른 항체에 의해 검출되는 방법이다.

- [0057] 이 구현에는 반응부(reaction zone)에서 신속하게 판독가능한 검사 결과 라인이 가시화되는 신속 검사를 제공한다.
- [0058] 단계 (a)의 혼합물은 검사 스트립의 적용 구역에 적용되고, 이후, 예를 들어 모세관력 사용에 의해, 막을 가로질러 이동하며, 그동안 반응부까지의 스트레치에서 표지된 항체와 접촉하게 된다. 상기 표지된 항체는 모든 항원 또는 결합 부위가 채워지지 않도록 집중된다. 반응부에서, 추가의 항체가 고정되고, 이는 또한 본 발명에 따른 항원 또는 결합 부위에 특이적이며, 자유 결합 부위가 여전히 이용가능하다면, 표지된 항체-항원 복합체에 결합한다. 따라서, 표지된 항체-항원 복합체는 반응부에 유지되어 검사 라인이 가시화된다. 경쟁적 접촉으로 인해 항원 또는 결합 부위가 각각 환자 샘플로부터의 항체에 의해 이미 점유되어 있는 경우, 즉, 적용 시점에 모든 결합 부위가 이미 환자 샘플로부터의 항체에 의해 이미 점유된 경우 표지된 항체를 갖는 항체-항원 복합체가 덜 형성되고 검사 라인은 덜 강하거나 전혀 보이지 않는다. 단계 (a)에서 항원 또는 결합 부위 각각의 양 및 단계 (b)에서 표지된 항원의 양의 정확한 조정은 이러한 문맥에서 중요하며, 따라서 사전 측정에 대하여 환자 샘플에서의 항체 양의 변화를 검출할 수 있다.
- [0059] 본 발명은 또한 (A) 미리 결정된 기간 동안 환자에서 HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머의 구조적 항원결정기에 결합하는 항체가 증가하는지 여부를 측정하기 위한 분석 결과를 제공하는 테스트를 요청하는 단계 및 (B) 환자에서 항체의 증가가 검출되는 경우 HPV16 양성 암종을 표적으로 하는 추가 항암 치료를 투여하는 단계를 포함하는, HPV16-양성 암종을 표적하는 적어도 하나의 항암 치료를 이전에 투여받은 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0060] 또 다른 양상에 따르면, 본 발명은 또한 HPV16-L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 항체, 바람직하게는 기탁번호 DSM ACC3306인 하이브리도마 세포주로부터 수득한 항체에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명은 또한 상기 기술한 항체의 진단 방법, 구체적으로 처치 후 HPV16 양성 암종의 재발생을 측정하는 방법에서의 용도에 관한 것이다.
- [0062] 또한, 본 발명은 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 항원 또는 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 바이러스 유사 입자에 관한 것이다.
- [0063] 기탁번호 DSM ACC3306인 하이브리도마 세포주로부터 수득한 항체에 특이적으로 결합하는 구조적 항원결정기를 갖는 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조를 나타내는 항원 또는 바이러스 유사 입자가 바람직하다.
- [0064] 본 발명은 또한 상기 기술한 항원 또는 바이러스 유사 입자의 진단 방법, 구체적으로 처치 후 HPV16 양성 암종의 재발생을 측정하는 방법에서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 환자의 샘플에서 항체의 양을 결정하기 위한 하기를 포함하거나 하기로 이루어지는 키트에 관한 것이다:
- [0065] (a) HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조의 구조적 항원결정기를 나타내는 항원을 포함하는 조성물, 및
- [0066] (b) HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조 제시 항원의 구조적 항원결정기에 특이적으로 결합하는 표지된 항체, 바람직하게는 기탁번호 DSM ACC3306인 하이브리도마 세포주로부터 수득된 표지된 항체를 포함하는 조성물.
- [0067] 상기 (a)의 조성물은 바람직하게는 HPV16 L1 캡시드 또는 캡소머 구조의 구조적 항원결정기를 나타내는 바이러스 유사 입자를 포함하는 조성물이다.
- [0068] 본 발명에 따른 키트는 또한 단계 (a)의 혼합물의 적용뿐만 아니라 검사 라인 및 바람직하게는 대조 라인을 관찰하기 위한 개구부(opening)를 갖는 검사 카세트에 선택적으로 제공되는 검사 스트립(test strip)을 포함할 수 있다.
- [0069] 상기 검사 스트립은 일 말단에 단계 (a)의 혼합물을 위한 적용부(application zone), 표지된 항체를 제공하고 적용부와 연결되는 패드뿐만 아니라, 적용부에서 볼 때 패드의 다른 면과 연결되는 반응부(reaction zone) 및 바람직하게는 반응부를 넘어서 추가로 대조부(control zone)를 포함한다. 반응부에는, 본 발명에 따른 항원결정기에 특이적으로 결합하는 추가 항체가 제공되고, 표지된 항체-항원 복합체의 결합에 의해 검사 라인이 가시화된다. 대조부에서의 다른 독립적인 항체 반응은 검사가 올바르게 진행되었음을 보여준다. 대조부에서 라인의 출현(appearance)은 샘플 부피가 충분하고 검사가 의도한대로 실행되었음을 확인해준다.

발명의 효과

[0070] 본 발명은 미리 결정된 기간 동안 HPV16 양성 암종을 치료하기 전후에 환자로부터 채취한 샘플에서 항체 양의 발생을 모니터링하기 위한 혈청학적 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 HPV16 양성 암종의 1차 치료 후 27주 동안 양성 치료 과정을 받은 환자의 혈청에서 항체 양의 발달을 보여준다. X축에는 1차 치료의 시점에서 0에서 시작하는 주(weeks)가 표시되고, Y축에는 본 발명에 따른 항체 농도가 ng/ml로 표시된다.

도 2는 HPV16 양성 암종의 1차 치료 후 약 35주 후에 재발이 일어난 환자의 혈청 내 항체 양의 발달을 보여준다. 27주까지 항체 양의 지속적 감소가 관찰되었다. 31주에 시작하여 항체의 양이 다시 증가하였다. 상기 증가는 35주까지 계속되었고, 그때 임상적 상관관계가 발견되었다. X축에는 1차 치료의 시점에서 0에서 시작하는 주가 표시되고, Y축에는 본 발명에 따른 항체 농도가 ng/ml로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 실시예 1: 본 발명에 따른 항체 및 항원의 스크리닝

[0073] 파필로마 바이러스 유사 입자(papillom virus like particles, VLPs)의 준비. HPV16의 L1 유전자(GenBank: K02718.1)를 PCR로 증폭하고 전달 벡터 pVL1392에 클로닝시켰다. 상기 재조합 벡터를 인산 칼슘 침전을 사용하여 BaculoGold DNA (Pharminggen)와 함께 Sf9 세포에 도입하였다. 재조합 바이러스는 제조사의 지시에 따라 플라크 분석(plaque assay)에 의해 증폭되고 정제되었다.

[0074] 바이러스 유사 입자는 Volpers 등에 따라 정제하였다. (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).

[0075] 단일클론 항체의 생산, 스크리닝 및 클로닝. BALB/c 마우스는 완전 프로인트 보조제(complete Freund's adjuvant)와 혼합한 후 인산 완충염 용액(PBS)에 용해시킨 온전한(intact) HPV16 VLP 20 µg을 피하에 면역화시켰다. 상기 면역화는 1개월 후 및 3개월 후에 반복하였다.

[0076] 세 번째 면역화 후 3일 차에 비장을 분리하고, 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 상기 비장 세포는 폴리에틸렌 글리콜 2500 (Boehringer Mannheim)을 사용하여 마우스 골수종 세포주 X63Ag8.653과 융합시키고 96-웰 플레이트에서 10% 태아 소 혈청(fetal calf serum, FCS) 존재 하에 이스코브 변형 이글 배지 (Iscoves modified Eagle Medium, IMDM)에서 배양하였다. 융합된 세포는 아자세린(azaserine) 및 하이포크산틴(hypoxanthine)으로 선별하였다. 6 내지 8일 후에, ELISA를 사용하여 세포의 상등액을 HPV16 L1 특이적 항체의 분비에 대해 검사하였다. 변성된 L1 단백질뿐만 아니라 HPV-6, HPV-11, HPV-18, HPV-31, HPV-33 및 HPV-39의 VLP는 비특이적 반응을 배제하기 위한 대조군으로 사용하였다.

[0077] 실시예 2: 성공적 치료 후 환자에서 항체 양의 감소의 관찰

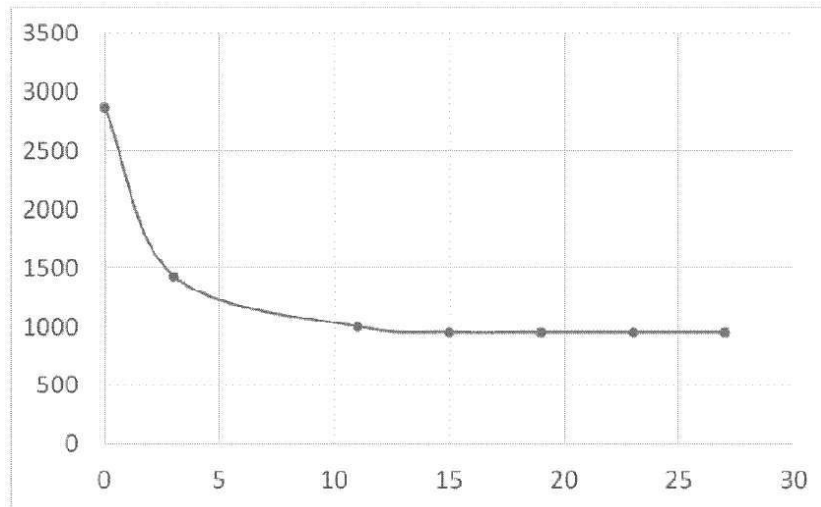
[0078] HPV16 양성 편도 암종(tonsillar carcinoma)에 대한 종양 병용 치료(수술/방사선-화학치료)를 받은 나이 53, 남성 환자. 치료가 시작되기 전날, 환자로부터 5 ml의 혈액을 채취하여 환자 혈청을 수득하였다. 치료의 시작에서 혈청의 검사는 13200 ng/ml의 항체 농도를 나타냈다.

[0079] 초기 치료 후 6주 차에, 환자로부터 5 ml의 혈액을 채취하여 환자 혈청을 수득하였다. 항체 농도는 5600 ng/ml로 측정되었다. 이것은 6주 이내에 50% 이상의 항체 농도의 감소에 상응한다.

[0080] 항체의 양이 감소하면, 종양 항원 HPV16 L1 형성 종양 세포가 성공적으로 제거되고 종양 항원(HPV16 L1 단백질)이 HPV16 L1 특이적 항체를 형성하는 면역계를 더이상 유도하지 않기 때문에 성공적인 치료는 조절될 수 있다.

도면

도면1



도면2

