(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 297 T2** 2004.05.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 759 935 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 297.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU95/00292**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 918 467.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/031476**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.05.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.03.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **16.07.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/025**
C07K 16/08, C12N 15/37, A61K 39/12, G01N 33/569

(30) Unionspriorität:
PM566794 17.05.1994 AU

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The University of Queensland, St. Lucia, Queensland, AU

(74) Vertreter:
Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80331 München

(72) Erfinder:
FRAZER, Ian, St. Lucia, AU; ZHOU, Jian, Maywood, US

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTER PAPILLOMAVIRUS L1**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf die L1-Protein-Papillomaviren. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein und dessen Verwendung zum Nachweisen und Behandeln von Papillomavirusinfektionen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Papillomaviren infizieren eine Reihe von Wirten, einschließlich Menschen, Rinder, Schafe, Hunde und Katzen. Hinsichtlich einer vollständigeren Auflistung siehe "Papilloma Virus Infections in Animals" von J. P. Sundberg, beschrieben in "Papilloma Viruses and Human Diseases", herausgegeben von K. Syrjanen, L. Gissman und L. G. Koss, Springer-Verlag 1987.

[0003] Menschliche Papillomaviren rufen gutartige hyperproliferative Läsionen des Haut- und Schleimhautepithels hervor. Von den 70 verschiedenen Virusarten, die Menschen infizieren, werden mehr als 20 mit anogenitalen Läsionen in Verbindung gebracht (de Villiers, 1989. J. Virol. 63 4898–4903). Papillomaviren wurden auch mit verschiedenen Krebsformen in Zusammenhang gebracht. Die menschlichen Papillomaviren Typ 16 und 18 wurden mit einer Reihe von zervikalen intraepithelialen Neoplasien und Gebärmutterhalskarzinomen in Verbindung gebracht (Lancaster et. al., 1987, Cancer Metast. Rev. 6 6653-6664 und Pfister, 1987, Adv. Cancer Res. 48 113–147).

[0004] Papillomaviren sind kleine DNA-Viren, die bis zu acht frühe und zwei späte Gene codieren. Die späten Gene L1 und L2 codieren für Strukturproteine, welche sich innerhalb der Zelle zu einem Capsid ansammeln (Galloway et al., 1989, Adv. Virus Res. 37 125–171). Ein einzelnes Viruscapsid ist ein T=7d-Ikosaeder, das aus 360 fünfteiligen Capsomeren zusammengesetzt ist, von denen jedes fünf Moleküle des Hauptcapsidproteins L1 enthält (Baker et al., 1991, Biophys. J. 60 1445–1456, und Finch et al., 1965, J. Mol. Bio. 13 1–12). Das kleinere Capsidprotein L2 ist zu etwa 1/10 der großen Menge von L1 vorhanden (Doorbar et al., 1987, J. Virol. 61 2793-2799).

[0005] Die in vitro-Vermehrung menschlicher Papillomaviren wurde nicht zustande gebracht (Taichman et al., 1984, J. Invest. Dermatol. 83 25), und nur geringe Mengen von HPV-Proteinen wurden aus infizierten Geweben isoliert (Androphy et al., 1987, Embo J. 6 1989; Banks et al., 1987, J. Gen. Virol. 68 1351; Firzlaff et al., 1988, Virology 164 467; Oltersdorf et al., 1987, J. Gen. Virol. 68 2933; Schneider-Gadicke et al., 1988, Cancer Res. 48 2969; Seedorf et al., Embo J. 6 139 und Smotkin et al., 1986, PNAS 83 4680). Das Gen, welches für das L1-Protein codiert, wurde jedoch kloniert und unter Verwendung des rekombinanten Vaccinia-Virus in einem Eukaryonten-Expressionssystem (Browne et al., 1988, J. Gen.

[0006] Virol. 69 1263–1273; Zhou et al., 1990, J. Gen. Virol. 71 2185-2190 und Zhou et al., 1991, Virology 185 251-257), in einem Baculovirus-Expressionssystem (Park et al., 1993, J. Virol. Meth. 45 303–318) und in einem Bakterien-Expressionssystem (Strike et al., 1989, J. Gen. Virol. 70 543–555) exprimiert.

[0007] Da das L1-Protein das Hauptcapsidprotein ist, wurde es als Grundlage für die Entwicklung von Impfstoffen zum Schutz gegen eine Papillomavirusinfektion verwendet. Zhou et al. immunisierten Mäuse mit synthetischen virusartigen HPV 16-Partikeln (VLPs), wobei ein Vaccinia-Virus eingesetzt wurde, das hinsichtlich des L1- und des L2-Proteins von HPV 16 doppelt rekombinant war. Die Maus-anti-VLP-Antiseren erkannten HPV 16-Capside mittels ELISA und das rekombinante Baculovirus-HPV16L1- und L2-Protein mittels Immunoblot. Die Maus-anti-VLP-Antiseren erkannten jedoch zwei Peptide nicht, die von gegen ein rekombinantes L1-Fusionsprotein geschaffenen, monoklonalen anti-HPV16L1-Antikörpern erkannt wurden (Zhou et al., 1992, Virology 189 592–599). Diese Forscher kamen zu dem Schluss, dass sich die immunitätsreaktiven Epitope von HPV 16, welche unter Verwendung virusartiger Partikel definiert wurden, beträchtlich von jenen unterscheiden, die unter Verwendung rekombinanter HPV16L1-Fusionsproteine definiert wurden.

[0008] Um Probleme der Darstellung zu überwinden, wurden unter Verwendung virusartiger Partikel Impfstoffe entwickelt. VLPs wurden in intrazellularer Weise aus einem rekombinanten L1- oder aus einem L1- und einem L2-Protein gebildet, welche vom rekombinanten Vaccinia-Virus codiert wurden (Zhou et al., 1991, Virology 185 251-257; Zhou et al., 1991, Virology 181 203–210 und internationale Patentschrift WO93/02184). Diese Impfstoffe, bei denen synthetische virusartige Partikel verwendet werden, haben eine Reihe von Nachteilen. Erstens wird bzw. werden das rekombinante L1- oder das L1- und das L2-Gen von einem Vaccinia-Virusvektor exprimiert, der für die Herstellung eines Impfstoffs ungeeignet sein kann. Zweitens werden die virusartigen Partikel intrazellular hergestellt, was ein geschwindigkeitsbegrenzender Schritt ist. Drittens können die virusartigen Partikel zellulare DNA inkorporieren, da sie intrazellular hergestellt werden, und virusartige Partikel, die DNA enthalten, sind für die Verwendung in Impfstoffen ungeeignet. Viertens dürfen virusartige Partikel aufgrund der Notwendigkeit, ihre Intaktheit und somit eine korrekte Epitopendarstellung zu bewahren, nur teilweise gereinigt werden. Folglich können andere Proteine oder Stoffe, die mit den virusartigen Partikeln verbunden

sind, ein Impfpräparat verunreinigen. Fünftens ist das Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffs in handelsüblichen Mengen, der virusartige Partikel aus rekombinanten Vaccinia-Viren aufweist, vergleichsweise teuer.
[0009] Ähnliche Nachteile gelten für die Verwendung der aus rekombinanten Vaccinia-Viren hergestellten, virusartigen Partikel zum Nachweisen von Antikörpern in den Seren von Patienten. Rose, R. C.; Bonnez, W.; Reichman, R. C. und Garcea, R. L. (1993), J. Virol. 67, 1936–1944, lehren den Selbstzusammenbau von aus Insektenzellen exprimiertem L1 zu virusartigen Partikeln, welche Epitope aufweisen, die in nativen Viruspartikeln vorhanden sind. Gemäß diesem Dokument führt die Denaturierung von L1 zum Verlust der zuvor genannten Epitope.

KURZFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung einer Multimerstruktur, umfassend ein oder mehrere bakteriell exprimierte rekombinante Papillomavirus-L1-Proteine, bereit, wobei dieses Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

(i) das Exprimieren eines rekombinanten DNA-Moleküls, das ein rekombinantes Papillomavirus-L1-Protein codiert, in einer Bakterienzelle;
(ii) das Erhalten des rekombinanten Papillomavirus-L1-Proteins aus dieser Bakterienzelle unter denaturierenden Bedingungen;
(iii) das Reinigen des im Schritt (ii) erhaltenen, rekombinanten Papillomavirus-L1-Proteins; und
(iv) das Bilden der Multimerstruktur aus einem oder mehreren dieser im Schritt (iii) gereinigten, rekombinanten Papillomavirus-L1-Proteine.

[0011] Vorzugsweise erfolgt im Schritt (iv) die Bildung der Multimerstruktur in Abwesenheit von Salz.
[0012] Das rekombinante DNA-Molekül kann eine 5'-Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfassen. Überdies kann das rekombinante DNA-Molekül eine 5'-Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 3 umfassen.
[0013] Das rekombinante DNA-Molekül kann eine Nucleotidsequenz umfassen, die unter Standardbedingungen mit SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 hybridisierbar ist.
[0014] Das rekombinante DNA-Molekül kann in einem korrekten Leseraster bezüglich der Expression des Papillomavirus-L1-Proteins in pTrcHisB eingefügt werden.
[0015] Das Papillomavirus-L1-Protein kann in einer E.coli-Bakterienzelle exprimiert werden.
[0016] Das erfindungsgemäße Verfahren kann außerdem den Schritt des Einbauens der Multimerstruktur in einen Impfstoff umfassen.
[0017] Das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein kann ein Fusionsprotein sein. Beim Verfahren können Multimerstrukturen verwendet werden, welche rekombinante Papillomavirus-L1-Proteine umfassen, die eine $(His)_6$ inkludierende, N-terminale Aminosäuresequenz aufweisen. Die N-terminale Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 1) kann Folgendes umfassen:

MetArgGlySerHisHisHisHisHisHisGlyMetAlaSerMetThrGly

GlyGlnGlnMetGlyArgAspLeuTyrAspAspAspAspLysAsp.

[0018] Das rekombinante DNA-Molekül kann aus einer geeigneten Quelle von Papillomavirus-DNA, wie z. B. einem menschlichen Papillomavirus oder einem Rinder-Papillomavirus, konstruiert werden, wobei standardmäßige Klonierungs- und/oder PCR-Techniken zur Anwendung kommen. Das rekombinante DNA-Molekül kann auch einen Expressionsvektor umfassen. Der Expressionsvektor kann ein Plasmid, Cosmid, Phagemid oder ein Virus sein. Ein geeigneter Expressionsvektor codiert (in folgender Reihenfolge) eine ATG-Stelle, ein $(His)_6$-Peptid und danach eine Klonierungsstelle, in welche eine Papillomavirus-L1-Protein-DNA-Sequenz in den korrekten Leseraster eingefügt werden kann, so dass aus der Translation ein Fusionsprotein des $(His)_6$-L1-Proteins resultiert. Ein bevorzugter Expressionsvektor ist jeglicher der Plasmide pTrcHisA, pTrcHisB und pTrcHisC. Ein geeigneter Wirt ist ein E. coli-Stamm.
[0019] Das bevorzugte Expressionssystem ist ein Bakterien-Expressionssystem mit E. coli und dem Plasmid pTrcHisB. Das Einbringen des rekombinanten DNA-Moleküls in einen geeigneten Wirt kann durch jedes geeignete Verfahren, einschließlich der Transfektion und der Transformation, erzielt werden. Ein bevorzugtes rekombinantes DNA-Molekül ist die vollständige DNA-Sequenz des HPV6b L1-Proteins, welche in einer korrekten Leserasterausrichtung in pTrcHisB eingefügt wird, um pTrc6bL1 zu bilden. Das rekombinante DNA-Molekül pTrc6bL1 wird vorzugsweise in den E. coli-Stamm DH5 transformiert.
[0020] Nach der Expression kann das Expressionssystem zerstört werden. Ist das Expressionssystem ein Zellsystem, so kann die Zelle mit geeigneten Techniken und Mitteln, wie z. B. einer Beschallung in einem Guanidiniumhydrochlorid enthaltenden Puffer, lysiert werden. Das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein kann teilweise oder vollständig gereinigt werden. Die Reinigung kann unter Anwendung irgendeines oder mehrerer geeigneter chromatographischer Verfahren erzielt werden. Das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein kann

unter Anwendung eines Affinitätschromatographieschritts mit einer Nickelsäule gereinigt werden. Zusätzliche Reinigungsschritte können eine präparative Gelelektrophorese umfassen.

[0021] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen prophylaktischen oder therapeutischen Impfstoff bereit, der das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein enthält. Der Impfstoff kann ein geeignetes Adjuvans, wie z. B. ISCOMS, Alum, das unvollständige Freundsche Adjuvans, das vollständige Freundsche Adjuvans, Quil A, anderen Saponine, Aluminiumhydroxid, Algammulin und Pertussigen, enthalten. Alternativ braucht der Impfstoff kein Adjuvans enthalten, wenn das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein ohne Adjuvans immunitätserzeugend ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0022] **Fig.** 1 veranschaulicht die DNA-Nucleotidsequenz und Aminosäuresequenz des HPV6bL1 HEXA-HIS-Proteins (SEQ ID NO: 3); und

[0023] **Fig.** 2 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Pentamerstrukturen von HPV6bL1 HEXA-HIS-Proteinaggregaten.

[0024] Nunmehr kann auf verschiedene bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung Bezug genommen werden. Bei diesen bevorzugten Ausführungsformen sollte angemerkt werden, dass spezifische Papillomaviren, Impfstoffe und Konstrukte rekombinanter DNA-Moleküle nur beispielhaft genannt werden.

VERSUCHE

BEISPIEL 1: Herstellung des HPV6b L1 HEXAHIS-Proteins

Konstruktion von pTRC6bL1

[0025] Der offene L1-Leseraster von HPV6b wurde aus einem klinischen Isolat mittels einer Polymerasekettenreaktion kloniert, wobei als Primer

GCGGATCCAGATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATATG (SEQ ID NO:5)

und

CGCCCGGGTTACCTTTTAGTTTTGGCCTCGCTTACGTTTTAGG (SEQ ID NO:6)

eingesetzt wurden.

[0026] Das resultierende 1,5 kb-PCR-Produkt wurde mit BamH1 und Sma1 gespalten und in eine im Plasmid pTRCHIS B (Invitrogen) geschaffene, BamH1/Klenow-abgestumpfte Eco R1-Stelle kloniert. Das resultierende rekombinante L1-Plasmid war pTRC6bL1.

Wachstum von Bakterien, die das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein codieren

[0027] 10 ml 2YT-Nährlösung (16 mg Trypton, 10 mg Hefe, 5 mg NaCl), die Ampicillin enthielt (Endkonzentration 100 µg/ml), wurden mit 10 µl eines Loops von Bakterien (E. coli DH5) aus einem Glycerin-Ausgangsmaterial beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C sechs Stunden lang unter Belüftung bei 120 upm inkubiert.

[0028] 200 ml 2YT-Nährlösung, die Ampicillin enthielt (Endkonzentration 100 µg/ml), wurden mit der Sechs-Stunden-10 ml-Kultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht unter Belüftung bei 120 upm inkubiert.

[0029] 800 ml 2YT-Nährlösung, die Ampicillin enthielt (Endkonzentration 100 µg/ml), wurden mit der 200 ml-Übernachtkultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter Belüftung bei 120 upm inkubiert, bis die Extinktion zwischen 0,6 und 0,8 O. D.-Einheiten bei 600 nm erreichte (üblicherweise 2–3 Stunden). Das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein wurde durch Hinzufügen von 0,5 mM IPTG 4–6 Stunden lang induziert.

[0030] Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation pelletiert (ein Beckman-JA14-Rotor zentrifugierte bei 20°C 10 Minuten lang mit 5000 upm). Das Pellet wurde in 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, indem das Bakterienpellet in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen resuspendiert wurde. Die gewaschenen Bakterien wurde durch eine Zentrifugation erneut pelletiert (Beckman TJ-6 für 10 Minuten bei 3000 upm und 20°C). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde bei –20°C oder –70°C gelagert, bis es gebraucht wurde.

Reinigung des HPV6b L1 HEXAHIS-Proteins

[0031] Die Bakterien wurden resuspendiert und in 50 ml Guanidinium-Lysepuffer (6M Guanidiniumhydrochlorid und 5,8 ml/Liter der Lösung A [177 mM NaH_2PO_4 und 5M NaCl], pH 7,8, unter Verwendung von HCl) lysiert. Die Suspension wurde bei 30%iger Leistung zwei Minuten lang beschallt. Die Zellbruchstücke wurden durch

eine Zentrifugation pelletiert (Beckman-JA21-Rotor für 30 Minuten bei 10000 upm und 4°C). Der Überstand, welcher das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein enthält, wurde zurückbehalten.

[0032] Das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein wurde durch ein im Wesentlichen zweistufiges Reinigungsverfahren weitgehend gereinigt.

[0033] Der das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein enthaltende Überstand wurde unter Einsatz eines BIORAD ECONO-Systems bei 4°C auf eine Nickelsäule (2,6 cm × 6 cm) aufgegeben. Vor der Aufgabe des Überstands wurde die Säule gründlich mit einem NA-Puffer gewaschen, und zwar mit 1 ml/Minute. Der NA-Puffer umfasst 6M Harnstoff, 5,8 ml/Liter Lösung A [177 mM NaH_2PO_4 und 5M NaCl], 94 ml/Liter Lösung B [200 mM Na_2HPO_4 und 5M NaCl] mit einem pH von 7,8, wobei vor dem Hinzufügen des Harnstoffs HCl verwendet wird. Der Überstand wurde mit einem ml/Minute auf die Nickelsäule aufgegeben. 10 ml-Fraktionen wurden gesammelt, im Falle, dass die Säule überladen war, und jedes ungebundene Protein wurde durch die Säule gewaschen. Nach der Aufgabe des Überstands wurde die Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von einem ml/Minute mit einem NB-Puffer gewaschen. Der NB-Puffer umfasst 6M Harnstoff und 100 ml/Liter Lösung A [177 M NaH_2PO_4 und 5M NaCl] mit einem pH von 4,0, wobei vor dem Hinzufügen des Harnstoffs HCl verwendet wird. Die Säule wurde gemäß der Verfahrensweise der Tabelle 1 mit einem NB-Puffer gewaschen, wobei ein Absenken des pH-Gradienten kontaminierende Proteine entfernte. 10 ml-Fraktionen des Elutionsmittels wurden gesammelt.

[0034] Die das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein enthaltenden Fraktionen wurden entweder durch Dot-Blot, einen direkten ELISA oder SDS PAGE bestimmt. Nach dem Identifizieren der Fraktionen wurde das Waschen der Säule mit einem 100%igen NB-Puffer fortgesetzt, bis sich der pH-Wert einpendelte. Die Säule wurde daraufhin mit einem NA-Puffer gewaschen. (Die Säule wurde in 20%igem Ethanol gelagert.) Die das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und bei 4°C über Nacht (oder bei Raumtemperatur zwei Stunden lang) gegen fünf Liter dH_2O oder 10 mM Tris HCl, pH 7,5, dialysiert. Das Protein wurde danach in einem Aceton-Probe-Verhältnis von 8 : 2 mit Aceton ausgefällt, und zwar bei –70°C zwei Stunden lang oder bei –20°C über Nacht. Die Protein-Aceton-Lösung wurde zentrifugiert (Beckman TJ-6 für 20 Minuten bei 3000 upm und 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde unter einem Strom von Stickstoffgas fünf Minuten lang getrocknet, um jegliches verbliebenes Aceton zu entfernen.

[0035] Das Pellet wurde in 1 ml ddH_2O und 4–5 ml von 4 × Ladepuffer [1,0 ml von 0,5 M Tris, pH 6,8, 0,8 ml Glycerin, 1,6 ml von 10 Gew.% SDS, 0,1 g von 1 Gew.% DTT, 0,2 ml von 0,1 Gew.% Bromphenolblau und 4,4 ml dH_2O] resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde bei 65–70°C 15 Minuten Lang erhitzt, um ein Auflösen des gesamten Proteins sicherzustellen. Die ResUspension wurde auf einen BIORAD Prep Cell aufgegeben, der ein 10%iges Trenngel (4,5 cm Höhe mal 4 cm Durchmesser) mit einem 4%igen Stapelgel (4 cm Höhe mal 4 cm Durchmesser) umfasste. Der Prep Cell wurde mit einer konstanten Leistung von 12W betrieben.

[0036] Als die Farbstofffront des Gels eine Linie 2 cm vom Boden erreichte, wurden mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/Minute 10 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden entweder durch Dot-Blot, einen direkten ELISA oder SDS PAGE (mit dem Phast-System) hinsichtlich des HPV6b L1 HEXAHIS-Proteins getestet. Positive Fraktionen wurden mittels SDS PAGE getestet, und jene, bei denen sich zeigte, dass sie ein einzelnes HPV6bL1HEXAHIS-Proteinband hatten, wurden gepoolt. Die gepoolten Fraktionen wurden zwecks Entfernung von Glycin gegen 5 Liter ddH_2O dialysiert. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C und unter Anwendung zweier ddH_2O-Wechsel.

[0037] Das dialysierte HPV6b L1 HEXAHIS-Protein wurde mit Aceton ausgefällt, um SDS zu entfernen. Ein Aceton-Probe-Verhältnis von 8 : 2 wurde entweder bei –70°C zwei Stunden lang oder bei –20°C über Nacht eingesetzt. Die Protein-Aceton-Lösung wurde zentrifugiert (Beckman TJ-6 für 20 Minuten bei 3000 upm und 4°C): Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde unter einem Strom von Stickstoffgas fünf Minuten lang getrocknet, um jegliches verbliebenes Aceton zu entfernen.

[0038] Das Protein konnte dann in einem Puffer nach Wahl resuspendiert und seine Konzentration bestimmt werden. Anschließend wurde nachgewiesen, dass dieses Protein Capsomere bildete, und zwar durch Reinigung des HPV6b L1 HEXAHIS-Proteins so wie beschrieben, durch eine allmähliche Entfernung des Harnstoffs mittels Dialyse gegen 10 mM Tris HCl, pH 7,5, und durch eine Prüfung des resultierenden Immunpräzipitats mittels Rasterelektronenmikroskopie. **Fig.** 2 zeigt die typischen Pentamerstrukturen von HPV6b L1 HEXAHIS-Proteinaggregaten.

BEISPIEL 2: Beweis der Antikörperproduktion gegen das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein

[0039] Zur Produktion eines Antikörpers gegen das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein wurden Mäusen (Stamm C57B1/6) gemäß dem Versuchsprotokoll der Tabelle 2 zweimal mit vierwöchigem Abstand subkutan 50 µg Protein/Maus injiziert. Zwei Wochen nach der zweiten Injektion wurde den Mäusen Blut abgenommen.

[0040] Unter Anwendung standardmäßiger Verfahrensweisen wurde aus dem entnommenen Blut ein Serum gewonnen.

[0041] Das Serum wurde unter Verwendung dreier verschiedener Antigene hinsichtlich der Produktion von Antikörpern gegen das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein getestet.

[0042] Das Serum wurde gegen ein HPV6B-Capsid-Präparat des menschlichen Papillomavirus getestet. Das Serum wurde 1 zu 200 verdünnt und gegen ein HPV6B-Capsid-Präparat in einem RIPA-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 2 mM EDTA; 50 mM NaCl; 1% Desoxycholat; 1% Triton X-100; 0,25% SDS; 1% Aproptinin; und 1 mM PMSF) getestet. Die Antikörper-Antigen-Präzipitate wurden über eine 10%ige SDS PAGE laufen gelassen, wobei die einzelnen Komponenten des Immunkomplexes getrennt wurden. Das Vorhandensein des HPV6b L1-Proteins wurde mit einem Kaninchen-anti-HPV6b L1-Antikörper nachgewiesen. Das Vorhandensein des HPV6b L1-Proteins zeigt an, dass anti-HPV6b L1-Antikörper in der Maus gegen das 6bL1HEXAHIS-Protein produziert wurde. Die Gruppen A, B, C, D, E und F erbrachten positive Resultate.
[0043] Das Serum wurde auch durch eine Western-Blot-Analyse mit einem vom Baculovirus produzierten HPV6b L1 getestet. Ein positives Ergebnis zeigt an, dass in der Maus ein anti-HPV6b L1-Antikörper gegen das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein produziert wurde. Die Gruppen A, B, C, D, E und F erbrachten positive Resultate, wobei sich das beste Resultat bei Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans einstellte. Die Kontrollgruppen A, B, C, D und E erbrachten negative Resultate.
[0044] Das Serum wurde mittels Dot-Blot und ELISA gegen das Rinder-Papillomavirus-L1-Protein getestet, wobei Standardtechniken zur Anwendung kamen. Das beste Ergebnis mit einem O.D.-Messwert von 0,96 wurde bei einem Serum aus den Mäusen der Gruppe D erzielt (d. h. bei Verwendung von Aluminium als Adjuvans). Darauf folgten ein Serum aus Gruppe C (d. h. mit dem vollständigen Freundschen Adjuvans) mit einem O.D.-Messwert von 0,70, ein Serum aus Gruppe E (d. h. mit Algammulin) mit einem O.D.-Messwert von 0,34, danach ein Serum aus Gruppe B (d. h. in 1% SDS gekocht und abgekühlt) mit einem O.D.-Messwert von 0,24 und ein Serum aus Gruppe A (kein Adjuvans) mit einem O.D.-Messwert von 0,34. Alle Kontrollgruppen hatten einen O.D.-Messwert von 0,05.
[0045] Das Testen des Serums gegenüber drei verschiedenen Antigenen zeigte, dass das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein immunitätserzeugend war und anti-HPV6b L1-Antikörper produzierte, wenn es als Antigen mit oder ohne Adjuvans verwendet wurde.

BEISPIEL 3: Beweis einer Überempfindlichkeit des verzögerten Typs (und Bestätigung einer Antikörperproduktion) bei Mäusen durch das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein

[0046] Eine Überempfindlichkeit des verzögerten Typs umfasst zellvermittelte Immunreaktionen sowie einige humorale Immunreaktionen. Mäuse (Stamm BALB/c) wurden unter einer Vielfalt von Bedingungen, die in Tabelle 3 umrissen sind, mit dem HPV6b L1 HEXAHIS-Protein behandelt (intraperitoneale Injektion). Am Tag 11 wurde das Ohr einer intradermalen Injektion mit dem HPV6b L1 HEXAHIS-Protein oder einem anderen HEXAHIS-Protein unterzogen. Die Dicke des Ohrs wurde am Tag 13 und am Tag 14 gemessen. Mäuse, die am Tag 14 eine positive Reaktion zeigten, wurden getötet, und die Histologie des Ohrs würde untersucht.
[0047] Mit diesern Beispiel wurde gezeigt, dass ein HPV6b L1 HEXAHIS-Protein ohne Adjuvans bei anfänglichen Dosierungen von 50 µg/Maus, jedoch nicht bei 5 µg/Maus, eine gute Überempfindlichkeit des verzögerten Typs hervorrief. Die Mäuse mussten jedoch mit Pertussigen behandelt werden, um eine Überempfindlichkeitsreaktion des verzögerten Typs hervorzurufen.
[0048] Mit Bezugnahme auf die drei Beispiele wurde gezeigt, dass das durch das Verfahren des Beispiels 1 exprimierte und isolierte HPV6b L1-Protein Capsomeraggregate bildete und die HPV6b L1-Protein-Capsomeraggregate ohne weiteres Adjuvans immunitätserzeugend waren, wobei sie eine Antikörperreaktion und eine zellvermittelte Reaktion erzeugten. Daher würde das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein als geeignete Grundlage für einen Impfstoff dienen, der dazu ausgelegt ist, eine Infektion durch das menschliche Papillomavirus durch eine Induktion neutralisierender Antikörper zu verhindern oder bestehende Läsionen durch die Induktion einer L1-Protein-spezifischen zellvermittelten Immunität zu behandeln. In den Beispielen 1 bis 3 wurde das HPV6b L1-Protein als Beispiel verwendet, um die Immunogenität des Präparats zu demonstrieren, und als Beispiel beschränkt sich die Erfindung nicht auf dieses Beispiel, und jegliches Papillomavirus-L1-Protein kann verwendet werden.

BEISPIEL 4: Beweis, dass gegen das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein beschaffene Antikörper virusartige HPV6b L1-Partikel (VLPS) erkennen

[0049] In Platten befindliche Mulden wurden bei 0,2 µg Protein/Mulde entweder mit aus E. coli hergestellem HPV6b L1 HEXAHIS, mit aus Baculovirus hergestellem HPV6 VLP-L1 und mit Baculovirus- und E. coli-Präparaten (Zellfermentierungsuberständen) als Kontrollen beschichtet, und zwar in PBS bei einem pH von 7,2, und über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren gelassen. Eine Waschung wurde mit PBS bei pH 7,2 durchgeführt. Eine nicht spezifische Bindung wurde blockiert, indem die Platten bei Raumtemperatur 1 Stunde lang mit 1 (Gew.)% Casein inkubiert wurden.
[0050] Kaninchen-HPV6b L1 HEXAHIS-Antiseren wurden in jede der Mulden hinzugefügt, die mit HPV6b L1 HEXAHIS, HPV VLP-1, Baculovirus-präparierten Kontrollen oder E. coli-präparierten Kontrollen (zweifach prä-

pariert) beschichtet waren, und wurden seriell bei der Hälfte der Platten verdünnt. Gegen das Influenzavirus A/PR-8 geschaffene. Seren wurden als negative Kontrolle eingesetzt. Gegen HPV VLP-L1 geschaffene Seren wurden auf HPV VLP-L1-Platten als positive Kontrolle eingesetzt. Die Platten wurden 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit 0,05 (Vol.)% Tween 20 enthaltendem PBS bei pH 7,2 gewaschen. Ein Ziegen-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat wurde in jede Mulde hinzugefügt, und die Platten wurden wie zuvor inkubiert und gewaschen. Unter Verwendung von TMB wurde die spezifische Bindung der Antiseren mit Antigen nachgewiesen. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten gestoppt, wobei 0,5 M HCl verwendet wurde.

Ergebnisse

[0051] Die Ergebnisse des Versuchs werden in Tabelle 4 gezeigt. Sowohl das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein als auch das HPV6 VLP-L1 bildeten mit einem gegen das HPV6b L1 HEXAHIS-Protein geschaffenen Antikörper einen Komplex, was zeigt, dass HPV6b HEXAHIS L1 in vivo einen oder mehrere, durch HPV VLP-L1 dargestellte Epitope richtig darstellt. Die gegen das HPV6 L1-Protein geschaffenen Seren waren in den Baculovirus- oder E. coli-Mulden ebenfalls negativ, was die Spezifität der Reaktion darlegte. Dies stützt die Verwendung von HPVL1 HEXAHIS als Impfstoff-Immunogen, das zum Induzieren eines Antikörpers geeignet ist, der mit einem Virus interagieren und ihn eventuell neutralisieren kann. Weiters stützt dieses Beispiel einen Immunoassay zum Nachweisen des Papillomavirus-L1-Proteins, was gezeigt wird durch das Beschichten von Mulden mit verschiedenen Proteinen und die Verwendung eines gegen das rekombinante HPV6 L1 HEXAHIS-Protein geschaffenen Antikörpers. Mulden, die beide von HPV6b abgeleitete Antigene enthielten, erbrachten ein positives Resultat. Dieses Beispiel stützt auch einen Immunoassay zum Nachweisen eines für das Papillomavirus-L1-Protein spezifischen Antikörpers, was gezeigt wird durch das Beschichten der Mulden mit dem rekombinanten HPV6b L1 HEXAHIS-Protein und die Verwendung von gegen das Influenzavirus A/PR-8 geschaffenen Seren sowie gegen das HPV6 L1 HEXAHIS-Protein geschaffenen Seren. In diesem Fall erbrachten Mulden, die gegen das HPV6 L1 HEXAHIS-Protein geschaffene Seren enthielten, ein positives Resiltat, während jene, die gegen das Influenzavirus geschaffen waren, negativ waren.

BEISPIEL 5: ELISA-Einfangassay, welcher die Bildung eines Multimerstruktur-Antikörper-Komplexes zeit

[0052] Western-Blot- und ELISA-Versuche wurden wie zuvor beschrieben oder gemäß Standardverfahrensweisen durchgeführt. Ein ELISA-Einfangassay wurde durch folgendes Verfahren durchgeführt:

(1) Ein für VLPs spezifischer, monoklonaler Antikörper (moAb 8) wurde zum Beschichten der Mulden einer Mikrotiterplatte eingesetzt;

(2) ein HPV VLP L1-Protein wurde hinzugefügt und unter geeigneten Bedingungen inkubiert und mit 0,1% Tween 20 enthaltendem PBS bei pH 7,4 gewaschen;

(3) Antikörper, die gegen verschiedene Immunogene (gezeigt in Spalte 2 der Tabelle 5) in verschiedenen Tieren (gezeigt in Spalte 1 der Tabelle 5) geschaffen waren, wurden hinzugefügt; und

(4) geeignete Nachweismittel (im Fall von Kaninchen-Antiseren wurde ein Ziegen-anti-Kaninchen-Peroxidasekonjugat verwendet) wurden hinzugefügt, um einen Multimerstruktur/VLP-Antikörper-Komplex nachzuweisen.

Ergebnisse

[0053] Die Menge an eingefangenem rekombinantem Papillomavirus HEXAHIS pro Mulde ist in Tabelle 5 angegeben. Diese Versuche zeigen, dass die gegen rekombinante Papillomavirus-L1-HEXAHIS-Proteine geschaffenen Antiseren eine Immunreaktion auslösen, die ein das L1-Protein inkludierendes Papillomavirus-VLP erkennt.

TABELLE 1: Vorgang des Waschens der Nickelsäule mit NB-Puffer

Zeit (Minuten)	% NB-Puffer
0	0
30	0
300	100
310	100
320	100
330	100

TABELLE 2: Versuchsprotokoll für das Injizieren von Mäusen mit 6b L1 HEXAHIS-Protein, um Antikörper zu produzieren

Mäuse-Gruppe[a]	Zugabe des 6b L1 HEXAHIS-Proteins[b]	andere Bedingungen
A	+	kein Adjuvans
A_1	-	kein Adjuvans
B	+	in 1% SDS gekocht und abgekühlt
B_1	-	in 1% SDS gekocht und abgekühlt
C	+	mit vollständigem Freundschem Adjuvans
C_1	-	mit vollständigem Freundschem Adjuvans

Mäuse-Gruppe[a]	Zugabe des 6b L1 HEXAHIS-Proteins[b]	andere Bedingungen
D	+	auf Aluminiumhydroxid absorbiert
D_1	-	auf Aluminiumhydroxid absorbiert
E	+	mit Algammulin
E_1	-	mit Algammulin
F	+	mit L2 (50 µg) und ohne Adjuvans

TABELLE 3: Versuchsprotokoll für das Erzeugen einer Überempfindlichkeit des verzögerten Typs gegenüber dem 6b L1 HEXAHIS-Protein bei Mäusen

Mäuse-Gruppe[a]	Antigen[a]	Adjuvans[c]	Antigendosis	Exposition[b,d]	Pertussigen	Antigendosis	Durchschnittliche Ohrschwellung am Tag 14[f]
1	L1	PBS	50 µg	L1	+	4	4,5
2	L1	PBS	50 µg	L1	+	13,8	8
3	L1	PBS	50 µg	L1	-	3,8	1,5
4	L1	PBS	50 µg	L1	-	2,4	3,8
5	L1	PBS	50 µg	IRR	+		
6	Salzlösung	PBS		L1	+	4,7	1,3
7	Salzlösung	PBS		L1	-	2,3	1
8	L1	CFA (0,1 ml)	50 µg	L1	+	19,3	16,8
9	Salzlösung	CFA (0,1 ml)		L1	+	4,8	2
10	L1	Quil A (µg)	50 µg	L1	+	15,7	8,7
11	L1	Quil A (µg)	50 µg	L1	-	7,2	0,2
12	L1	Quil A (µg)	50 µg	IRR	+		
13	Salzlösung	Quil A (µg)	50 µg	L1	+		

DE 695 31 297 T2 2004.05.27

TABELLE 4: Resultate eines ELISA unter Verwendung von Kaninchen-HPV6b L1 HEXAHIS-Antiseren

ANTIGEN	ELISA UNTER VERWENDUNG VON KANINCHEN-HPV6b L1 HEXAHIS-ANTISEREN
HPV6 VLP-L1	> 4,0 überschreitet Grenzwerte @ 1:4000
HPV6b L1 HEXAHIS	2,12 ± 0,1 @ 1:4000
Baculovirus-Kontrollpräparat	0,63 ± 0,01 @ 1:4000
E. coli-Kontrollpräparat	0,12 ± 0,00 @ 1:4000

TABELLE 5: Resultate der in Beispiel 5 durchgeführten Versuche

TIER NR.	IMMUNOGEN	ADJUVANS	IMMUNITÄTSREAKTIVITÄT MIT L1-PROTEIN			IMMUNITÄTSREAKTIVITÄT MIT L1 AUF ZELLEN	
			Western-Blot	ELISA (VLPs)	Einfang-ELISA	L1 als VLP	L1 als HEXAHIS
Kaninchen 31	HEXAHIS L1	CFA	++++	1,712 @ 1:100	0,538 @ 1:100	+++	+++
Kaninchen 39	HEXAHIS L1	Nil	++	0,095 @ 1:100	0,050 @ 1:100	+++	?
Kaninchen 10	VLPs (vom Baculovirus abgeleitet)	Nil	+++	0,972 @ 1:100	0,487 @ 1:100	?	?
Maus	HEXAHIS L1	Nil	++	?	ND	?	?
Maus	HEXAHIS L1	CFA	++++	0,400 @ 1:100	ND	?	?
MoAb 8	GST L1-Fusionsprotein	CFA/IFA	++++	++++	ND	+++	?

DE 695 31 297 T2 2004.05.27

ZEICHENERKLÄRUNG

TABELLE 2

Jede Gruppe von Mäusen umfasst vier Mäuse.

Das 6b L1 HEXAHIS-Protein wurde mit 50 µg Protein pro Maus verabreicht.

TABELLE 3

Die Gruppen bestehen aus 4 bis 6 Balb/C-Mäusen (68–102).

L1 bezeichnet das 6b L1 HEXAHIS-Protein und IRR bezeichnet ein irrelevantes HEXAHIS-Protein.

PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung und CFA ist das vollständige Freundsche Adjuvans.

Das 6b L1 HEXAHIS-Protein wurde mit 10 µg in einem Höchstvolumen von 2 µl verabreicht.

30 µg Pertussigen wurden hinzugefügt.

Ohrmessungen (µm × 10)

TABELLE 5

[0054] () kann technisch nicht bestimmt werden

Fig. 1

DNA-Nucleotidsequenz und Aminosäuresequenz des HPV6b L1 HEXAHIS-Proteins (SEQ ID NO: 3)

Fig. 2

Elektronengrobgefügebild der Pentamerstrukturen von HPV6b L1 HEXAHIS-Proteinaggregaten

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: The University of Queensland
(B) STRASSE:
(C) STADT: St. Lucia
(E) LAND: Australien
(F) POSTLEITZAHL: QLD 4072

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: rekombinantes Papillomavirus L1

(iii) ANZAHL AN SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:
(A) ART DES DATENTRÄGERS: Floppy Disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release # 1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:
ANMELDENUMMER: PCT/AU95/00292

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 32 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 96 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: beide
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISINN: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATGCGGGGTT CTCATCATCA TCATCATCAT GGTATGGCTA GCATGACTGG TGGACAGCAA 60

ATGGGTCGGG ATCTGTACGA CGATGACGAT AAGGAT 96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1599 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: beide
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISINN: nein

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) STANDORT: 1..1596

(D) ANDERE INFORMATIONEN: /Produkt= „HPV6bL1 HEXAHIS-Protein“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT        48
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
  1               5                  10                  15

GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT        96
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
            20                  25                  30

ATG TGG CGG CCT AGC GAC AGC ACA GTA TAT GTG CCT CCT CCT AAC CCT       144
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
        35                  40                  45

GTA TCC AAA GTT GTT GCC ACG GAT GCT TAT GTT ACT CGC ACC AAC ATA       192
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
    50                  55                  60

TTT TAT CAT GCC AGC AGT TCT AGA CTT CTT GCA GTG GGA CAT CCT TAT       240
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
65                  70                  75                  80

TTT TCC ATA AAA CGG GCT AAC AAA ACT GTT GTG CCA AAG GTG TCA GGA       288
Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
                85                  90                  95

TAT CAA TAC AGG GTA TTT AAG GTG GTG TTA CCA GAT CCT AAC AAA TTT       336
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
            100                 105                 110

GCA TTG CCT GAC TCG TCT CTT TTC GAT CCC ACA ACA CAA CGT TTA GTA       384
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
        115                 120                 125

TGG GCA TGC ACA GGC CTA GAG GTG GGC AGG GGA CAG CCA TTA GGT GTG       432
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
    130                 135                 140

GGT GTA AGT GGA CAT CCT TTC CTA AAT AAA TAT GAT GAT GTT GAA AAT       480
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
145                 150                 155                 160
```

```
TCA GGG AGT GGT GGT AAC CCT GGA CAG GAT AAC AGG GTT AAT GTA GGT      528
Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
                165                 170                 175

ATG GAT TAT AAA CAA ACA CAA TTA TGC ATG GTT GGA TGT GCC CCC CCT      576
Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
            180                 185                 190

TTG GGC GAG CAT TGG GGT AAA GGT AAA CAG TGT ACT AAT ACA CCT GTA      624
Leu Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
        195                 200                 205

CAG GCT GGT GAC TGC CCG CCC TTA GAA CTT ATT ACC AGT GTT ATA CAG      672
Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
    210                 215                 220

GAT GGC GAT ATG GTT GAC ACA GGC TTT GGT GCT ATG AAT TTT GCT GAT      720
Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
225                 230                 235                 240

TTG CAG ACC AAT AAA TCA GAT GTT CCT ATT GAC ATA TGT GGC ACT ACA      768
Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
                245                 250                 255

TGT AAA TAT CCA GAT TAT TTA CAA ATG GCT GCA GAC CCA TAT GGT GAT      816
Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
            260                 265                 270

AGA TTA TTT TTT TTT CTA CGG AAG GAA CAA ATG TTT GCC AGA CAT TTT      864
Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
        275                 280                 285

TTT AAC AGG GCT GGC GAG GTG GGG GAA CCT GTG CCT GAT ACA CTT ATA      912
Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
    290                 295                 300

ATT AAG GGT AGT GGA AAT CGC ACG TCT GTA GGG AGT AGT ATA TAT GTT      960
Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
305                 310                 315                 320

AAC ACC CCG AGC GGC TCT TTG GTG TCC TCT GAG GCA CAA TTG TTT AAT     1008
Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn
                325                 330                 335

AAG CCA TAT TGG CTA CAA AAA GCC CAG GGA CAT AAC AAT GGT ATT TGT     1056
Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
            340                 345                 350

TGG GGT AAT CAA CTG TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACC ACA CGC AGT ACC     1104
Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
        355                 360                 365

AAC ATG ACA TTA TGT GCA TCC GTA ACT ACA TCT TCC ACA TAC ACC AAT     1152
Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
    370                 375                 380
```

```
TCT GAT TAT AAA GAG TAC ATG CGT CAT GTG GAA GAG TAT GAT TTA CAA      1200
Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
385                 390                 395                 400

TTT ATT TTT CAA TTA TGT AGC ATT ACA TTG TCT GCT GAA GTA ATG GCC      1248
Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
                405                 410                 415

TAT ATT CAC ACA ATG AAT CCC TCT GTT TTG GAA GAC TGG AAC TTT GGG      1296
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
            420                 425                 430

TTA TCG CCT CCC CCA AAT GGT ACA TTA GAA GAT ACC TAT AGG TAT GTG      1344
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
        435                 440                 445

CAG TCA CAG GCC ATT ACC TGT CAA AAG CCC ACT CCT GAA AAG GAA AAG      1392
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
    450                 455                 460

CCA GAT CCC TAT AAG AAC CTT AGT TTT TGG GAG GTT AAT TTA AAA GAA      1440
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
465                 470                 475                 480

AAG TTT TCT AGT GAA TTG GAT CAG TAT CCT TTG GGA CGC AAG TTT TTG      1488
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
                485                 490                 495

TTA CAA AGT GGA TAT AGG GGA CGG TCC TCT ATT CGT ACA GGT GTT AAG      1536
Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys
            500                 505                 510

CGC CCT GCT GTT TCC AAA GCC TCT GCT GCC CCT AAA CGT AAG CGC GCC      1584
Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala
        515                 520                 525

AAA ACT AAA AGG TAA                                                 1599
Lys Thr Lys Arg
    530
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 532 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1               5                  10                  15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
            20                  25                  30

Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
        35                  40                  45

Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
    50                  55                  60

Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
65                  70                  75                  80

Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
                85                  90                  95

Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
            100                 105                 110

Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
        115                 120                 125

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
    130                 135                 140

Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
                165                 170                 175

Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
            180                 185                 190

Leu Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
        195                 200                 205

Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
    210                 215                 220

Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
225                 230                 235                 240

Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
                245                 250                 255

Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
            260                 265                 270
```

```
Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
        275                 280                 285

Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
    290                 295                 300

Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
305                 310                 315                 320

Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn
                325                 330                 335

Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
            340                 345                 350

Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
        355                 360                 365

Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
    370                 375                 380

Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
385                 390                 395                 400

Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
                405                 410                 415

Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
            420                 425                 430

Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
        435                 440                 445

Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
    450                 455                 460

Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
465                 470                 475                 480

Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
                485                 490                 495

Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys
            500                 505                 510

Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala
        515                 520                 525

Lys Thr Lys Arg
    530
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 41 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISINN: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCGGATCCAG ATGTGGCGGC CTAGCGACAG CACAGTATAT G 41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISINN: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CGCCCGGGTT ACCTTTTAGT TTTGGCCTCG CTTACGTTTT AGG 43

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Multimerstruktur, umfassend ein oder mehrere bakteriell exprimierte rekombinante Papillomavirus-L1-Proteine, wobei dieses Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
(i) das Exprimieren eines rekombinanten DNA-Moleküls, das ein rekombinantes Papillomavirus-L1-Protein codiert, in einer Bakterienzelle;
(ii) das Erhalten des rekombinanten Papillomavirus-L1-Proteins aus dieser Bakterienzelle unter denaturierenden Bedingungen;

(iii) das Reinigen des im Schritt (ii) erhaltenen, rekombinanten Papillomavirus-L1-Proteins; und
(iv) das Bilden der Multimerstruktur aus einem oder mehreren dieser im Schritt (iii) gereinigten, rekombinanten Papillomavirus-L1-Proteine.

2. Verfahren des Anspruchs 1, wobei im Schritt (iv) die Bildung der Multimerstruktur in Abwesenheit von Salz erfolgt.

3. Verfahren des Anspruchs 1, wobei das rekombinante DNA-Molekul eine 5'-Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.

4. Verfahren des Anspruchs 1, wobei das rekombinante DNA-Molekül eine Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 3 umfasst.

5. Verfahren des Anspruchs 1, wobei das rekombinante DNA-Molekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die unter Standärdbedingungen mit SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 hybridisierbar ist.

6. Verfahren des Anspruchs 1, wobei das rekombinante DNA-Molekül in einem korrekten Leseraster bezüglich der Expression des Papillomavirus-L1-Proteins in pTrcHisB eingefügt wird.

7. Verfahren des Anspruchs 1, wobei das Papillomavirus-L1-Protein in einer E.coli-Bakterienzelle exprimiert wird.

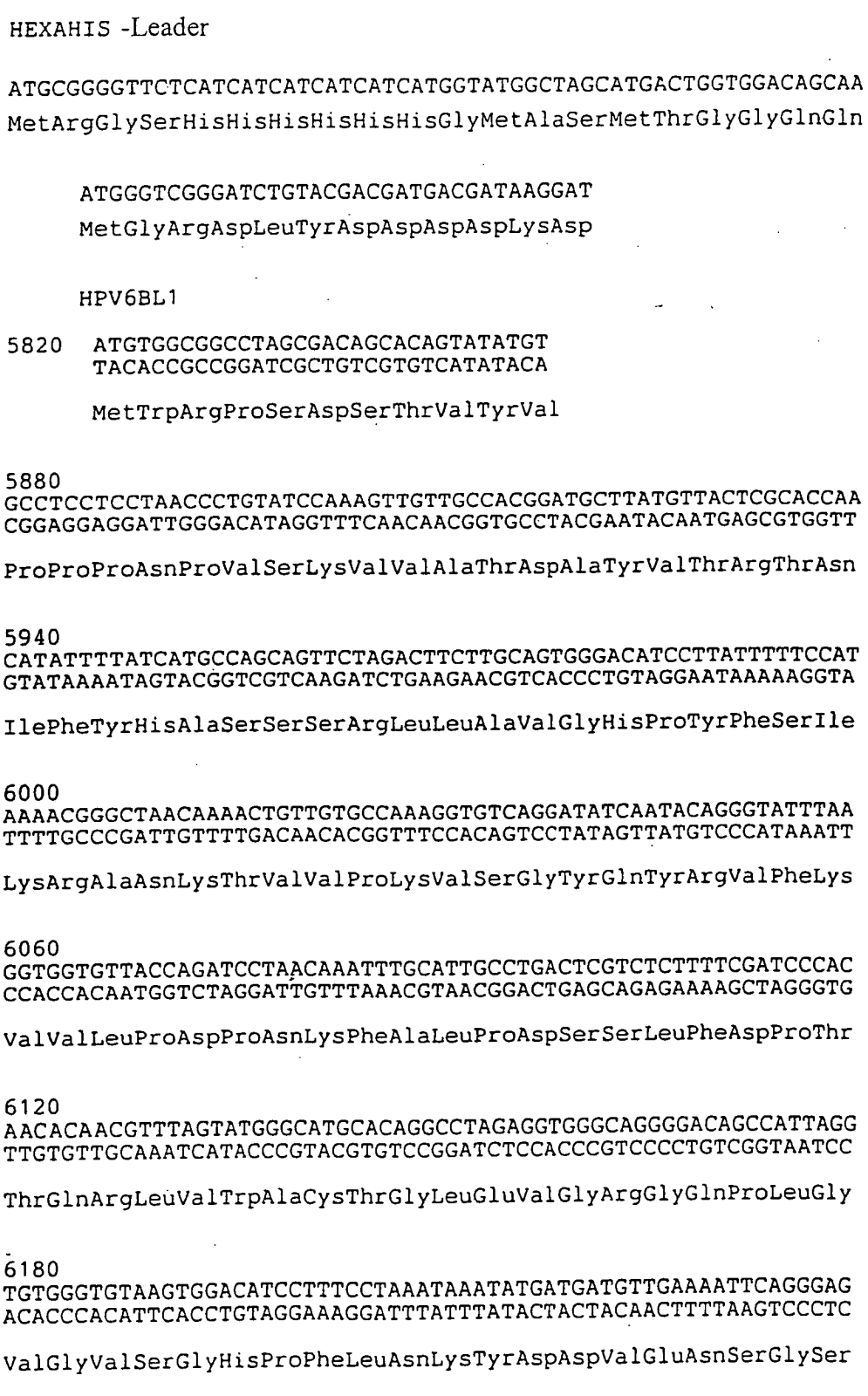
8. Verfahren des Anspruchs 1, welches weiters den Schritt des Einbauens der Multimerstruktur in einen Impfstoff umfasst.

9. Verfahren des Anspruchs 1, wobei das rekombinante Papillomavirus-L1-Protein ein Fusionsprotein ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1



6240

TGGTGGTAACCCTGGACAGGATAACAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACACA
ACCACCATTGGGACCTGTCCTATTGTCCCAATTACATCCATACCTAATATTTGTTTGTGT

GlyGlyAsnProGlyGlnAspAsnArgValAsnValGlyMetAspTyrLysGlnThrGln

6300
ATTATGCATGGTTGGATGTGCCCCCCCTTTGGGCGAGCATTGGGGTAAAGGTAAACAGTG
TAATACGTACCAACCTACACGGGGGGGAAACCCGCTCGTAACCCCATTTCCATTTGTCAC

LeuCysMetValGlyCysAlaProProLeuGlyGluHisTrpGlyLysGlyLysGlnCys

6360
TACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGACTGCCCGCCCTTAGAACTTATTACCAGTGTTAT
ATGATTATGTGGACATGTCCGACCACTGACGGGCGGGAATCTTGAATAATGGTCACAATA

ThrAsnThrProValGlnAlaGlyAspCysProProLeuGluLeuIleThrSerValIle

6420
ACAGGATGGCGATATGGTTGACACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTTGCTGATTTGCAGAC
TGTCCTACCGCTATACCAACTGTGTCCGAAACCACGATACTTAAAACGACTAAACGTCTG

GlnAspGlyAspMetValAspThrGlyPheGlyAlaMetAsnPheAlaAspLeuGlnThr

6480
CAATAAATCAGATGTTCCTATTGACATATGTGGCACTACATGTAAATATCCAGATTATTT
GTTATTTAGTCTACAAGGATAACTGTATACACCGTGATGTACATTTATAGGTCTAATAAA

AsnLysSerAspValProIleAspIleCysGlyThrThrCysLysTyrProAspTyrLeu

6540
ACAAATGGCTGCAGACCCATATGGTGATAGATTATTTTTTTTTCTACGGAAGGAACAAAT
TGTTTACCGACGTCTGGGTATACCACTATCTAATAAAAAAAAAGATGCCTTCCTTGTTTA

GlnMetAlaAlaAspProTyrGlyAspArgLeuPhePhePheLeuArgLysGluGlnMet

6600
GTTTGCCAGACATTTTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGATACACT
CAAACGGTCTGTAAAAAAATTGTCCCGACCGCTCCACCCCCTTGGACACGGACTATGTGA

PheAlaArgHisPhePheAsnArgAlaGlyGluValGlyGluProValProAspThrLeu

6660
TATAATTAAGGGTAGTGGAAATCGCACGTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTTAACACCCC
ATATTAATTCCCATCACCTTTAGCGTGCAGACATCCCTCATCATATATACAATTGTGGGG

IleIleLysGlySerGlyAsnArgThrSerValGlySerSerIleTyrValAsnThrPro

6720
GAGCGGCTCTTTGGTGTCCTCTGAGGCACAATTGTTTAATAAGCCATATTGGCTACAAAA
CTCGCCGAGAAACCACAGGAGACTCCGTGTTAACAAATTATTCGGTATAACCGATGTTTT

SerGlySerLeuValSerSerGluAlaGlnLeuPheAsnLysProTyrTrpLeuGlnLys

```
6780
AGCCCAGGGACATAACAATGGTATTTGTTGGGGTAATCAACTGTTTGTTACTGTGGTAGA
TCGGGTCCCTGTATTGTTACCATAAACAACCCCATTAGTTGACAAACAATGACACCATCT

AlaGlnGlyHisAsnAsnGlyIleCysTrpGlyAsnGlnLeuPheValThrValValAsp


6840
TACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTAACTACATCTTCCACATACAC
ATGGTGTGCGTCATGGTTGTACTGTAATACACGTAGGCATTGATGTAGAAGGTGTATGTG

ThrThrArgSerThrAsnMetThrLeuCysAlaSerValThrThrSerSerThrTyrThr


6900
CAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAATTTATTTT
GTTAAGACTAATATTTCTCATGTACGCAGTACACCTTCTCATACTAAATGTTAAATAAAA

AsnSerAspTyrLysGluTyrMetArgHisValGluGluTyrAspLeuGlnPheIlePhe


6960
TCAATTATGTAGCATTACATTGTCTGCTGAAGTAATGGCCTATATTCACACAATGAATCC
AGTTAATACATCGTAATGTAACAGACGACTTCATTACCGGATATAAGTGTGTTACTTAGG

GlnLeuCysSerIleThrLeuSerAlaGluValMetAlaTyrIleHisThrMetAsnPro


7020
CTCTGTTTTGGAAGACTGGAACTTTGGGTTATCGCCTCCCCCAAATGGTACATTAGAAGA
GAGACAAAACCTTCTGACCTTGAAACCCAATAGCGGAGGGGGTTTACCATGTAATCTTCT

SerValLeuGluAspTrpAsnPheGlyLeuSerProProProAsnGlyThrLeuGluAsp


7080
TACCTATAGGTATGTGCAGTCACAGGCCATTACCTGTCAAAAGCCCACTCCTGAAAAGGA
ATGGATATCCATACACGTCAGTGTCCGGTAATGGACAGTTTTCGGGTGAGGACTTTTCCT

ThrTyrArgTyrValGlnSerGlnAlaIleThrCysGlnLysProThrProGluLysGlu


7140
AAAGCCAGATCCCTATAAGAACCTTAGTTTTTGGGAGGTTAATTTAAAAGAAAAGTTTTC
TTTCGGTCTAGGGATATTCTTGGAATCAAAAACCCTCCAATTAAATTTTCTTTTCAAAAG

LysProAspProTyrLysAsnLeuSerPheTrpGluValAsnLeuLysGluLysPheSer


7200
TAGTGAATTGGATCAGTATCCTTTGGGACGCAAGTTTTTGTTACAAAGTGGATATAGGGG
ATCACTTAACCTAGTCATAGGAAACCCTGCGTTCAAAAACAATGTTTCACCTATATCCCC

SerGluLeuAspGlnTyrProLeuGlyArgLysPheLeuLeuGlnSerGlyTyrArgGly


7260
ACGGTCCTCTATTCGTACAGGTGTTAAGCGCCCTGCTGTTTCCAAAGCCTCTGCTGCCCC
TGCCAGGAGATAAGCATGTCCACAATTCGCGGGACGACAAAGGTTTCGGAGACGACGGGG

ArgSerSerIleArgThrGlyValLysArgProAlaValSerLysAlaSerAlaAlaPro

          TAAACGTAAGCGCGCCAAAACTAAAAGGTAA  7291
          ATTTGCATTCGCGCGGTTTTGATTTTCCATT

          LysArgLysArgAlaLysThrLysArgTer
```

FIG. 2

