



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 694 34 383 T2 2005.11.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 688 227 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 694 34 383.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US94/02443

(96) Europäisches Aktenzeichen: 94 912 186.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 94/020137

(86) PCT-Anmeldetag: 08.03.1994

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.09.1994

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 27.12.1995

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 25.05.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.11.2005

(51) Int Cl.⁷: A61K 39/12

C12N 15/09, C12N 7/04

(30) Unionspriorität:

28517 09.03.1993 US
207309 07.03.1994 US

(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 Rochester, Rochester, N.Y., US

(72) Erfinder:

ROSE, Robert C., Dansville, US; BONNEZ, William,
Rochester, US; REICHMAN, Richard C., Pittsford,
US

(74) Vertreter:

Strohschänk und Kollegen, 81667 München

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON MENSCHLICHEM PAPILLOMAVIRUS HÜLLPROTEIN UND VIRUS-ÄHNLICHEN TEILCHEN

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 eingelebt, 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

[0001] Die vorliegende Anmeldung ist eine „Continuation-in-part“-Anmeldung zur US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/028,517, die am 9. März 1993 eingereicht wurde und nun anhängig ist, sowie zur US-Patentanmeldung mit einer noch zu vergebenden Seriennummer, die am 7. März 1994 eingereicht wurde und nun anhängig ist.

[0002] Die Regierung der Vereinigten Staaten hat möglicherweise gewisse Rechte an dieser Erfindung gemäß den Public Health Service Awards AI-82509, AI-35159 und CA-11198 des National Institute of Health.

Bereich der Erfindung

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein den Papillomavirus (PV). Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Expression der das Capsidprotein des humanen Papillomavirus Typ 6 (HPV 6) und Typ 11 (HPV 11) kodierenden Sequenz unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems, zur Produktion HPV-Virus-ähnlicher Partikel (VLPs) und zur Verwendung dieser VLPs bei der Herstellung von Antikörpern, die Epitope auf HPV erkennen, zur Entwicklung von HPV-Impfstoffen, und zur Entwicklung serologischer Tests zum Nachweis von HPV-Infektionen.

Hintergrund der Erfindung

[0004] Die Familie der Papovaviridae umfasst eine Gruppe von DNA-Viren, die sowohl lytische Infektionen als auch benigne oder maligne Tumoren induzieren. Strukturell handelt es sich dabei um nackte icosahedrische Virionen mit 72 Capsomen, die alle doppelsträngige zirkuläre DNA enthalten. Viren, die zu der Familie gehören, sind: (1) humane und tierische Papillomaviren, (2) das Maus-Polyomavirus, (3) das Simian-Vacuolating-Virus und (4) die humanen Viren BK und JC.

[0005] Humane Papillomaviren (HPV) infizieren kutane, genitale, orale und respiratorische Epithelien in einer gewebespezifischen Art und Weise. Die Infektion mit HPV wurde mit der Bildung von sowohl benignen als auch malignen Geschwülsten in engen Zusammenhang gebracht (Reichmann et al., Papillomaviruses, 1990, Seiten 1191–1200; und Mandell et al., Principles and Practice of Infectious Diseases, dritte Ausgabe, Churchill Livingstone, New York, NY). So sind z. B. das HPV Typ 1 (HPV-1) in Plantar- bzw. Fußsohlenwarzen und die HPV Typen 6 oder 11 (HPV-6 oder HPV-11) in Condylomata acuminata (Ano-Genitalwarzen) vorhanden, wohingegen die HPV Typen 16 oder 18 (HPV-16 oder HPV-18) häufig in bösartigen Geschwülsten des zervikalen Schwamm-Epithels oder deren Vorstufen vorkom-

men (siehe Crum et al., „Human papillomavirus infection and cervical neoplasia: New perspectives“ 1984, Int. J. Gynecol. Pathol., Band 3, Seiten 376–388; zur Hausen, Genital Papillomavirus Infections, 1985, Seiten 83–90; Rigby et al., Viruses and Cancer, Cambridge University Press, Cambridge, UK; und Koutschy et al., „Epidemiology of genital human papillomavirus infection“, 1988, Epidemiol. Rev., Band 10, Seiten 122–163).

[0006] Jedoch haben Schwierigkeiten bei der in vitro erfolgenden Vermehrung des HPV zur Entwicklung alternativer Methoden zur Antigenproduktion für immunologische Studien geführt. So haben z. B. Bonnez et al., „The PstI-XbaI restriction fragment of the HPV-6b L1 ORF lacks immunological specificity as determined by sera from HPV 6 condyloma acuminatum patients and controls,“ 1990, UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New Series, Band 124, Seiten 77–80; Jenison et al., „Identification of immunoreactive antigens of human papillomavirus type 6b by using Escherichia coli-expressed fusion proteins,“ 1988, J. Virol., Band 62, Seiten 2115–2123; Li et al., „Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera,“ 1987, J. Virol., Band 61, Seiten 2684–2690; Steele et al., „Humoral assays of human sera to disrupted and nondisrupted epitopes of human papillomavirus type 1,“ 1990, Virology, Band 174, Seiten 388–398; und Strike et al., „Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the 'common antigen',“ 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555, die kodierenden Sequenzen recombinanter Capsidproteine in prokaryotischen Systemen exprimiert und diese in Western-blot-Analysen von Seren benutzt, die von Individuen mit HPV-Infektionen des Genitaltraktes gewonnen worden waren. Die Ergebnisse dieser Studien haben nahe gelegt, dass Antikörper gegen denaturierte, d. h. lineare Epitope des HPV Capsidproteins in den Seren einiger der infizierten Individuen nachgewiesen werden können.

[0007] Es wurden auch ganze Viruspartikel benutzt, um Antikörper in humanen Seren nachzuweisen, zu denen auch gegen konformative Epitope gerichtete Antikörper gehören. Diese Untersuchungen waren sehr schwer durchzuführen, da die meisten natürlich auftretenden HPV-induzierten Geschwülste wenige Partikel produzieren. Es ist jedoch möglich, aus durch das HPV Typ 1 induzierten Plantarwarzen ganze Viruspartikel in ausreichenden Mengen zu gewinnen, um immunologische Untersuchungen durchzuführen (Kienzler et al., „Humoral and cell-mediated immunity to human papillomavirus type 1 (HPV-1) in human warts,“ 1983, Br. J. Dermatol., Band 108, Seiten 65–672; Pfister et al., „Seroepidemiological studies of human papilloma virus (HPV-1) infections,“

1978, Int. J. Cancer, Band 21, Seiten 161–165; und Steele et al., „Humoral assays of human sera to disrupted and nondisrupted epitopes of human papillomavirus type 1, „1990, Virology, Band 174, Seiten 388–398) sowie auch aus experimentell induzierten HPV-11 athymischen Maus-Xenographien (Kreider et al., „Laboratory production in vivo of infectious human papillomavirus type 11," 1987, J. Virol., Band 61, Seiten 590–593; und Kreider et al., „Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata," 1985, Nature, vol 317, Seiten 639–641). Insbesondere beschreibt die US-Patentschrift 5,071,757 von Kreider et al. eine Methode zur Vermehrung infektiöser HPV-11 Virionen im Labor unter Verwendung eines athymischen Maus-Xenograph-Modell-Systems. Obwohl dieses System in der Lage ist, Quantitäten infektiöser Viren zu erzeugen, die für die Entwicklung eines serologischen Tests auf eine genitale HPV-Infektion verwendet werden könnten, so ist dieses System doch sehr teuer und umständlich in seiner Handhabung. Des Weiteren wurde mit diesem System bisher nur ein genitaler HPV-Typ vermehrt, was die Nützlichkeit des Systems einschränkt. Darüber hinaus stellt das unter Verwendung dieses Systems produzierte infektiöse Virus ein biologisches Risiko dar und wäre deshalb schwierig in einer Impfstoffzubereitung zu verwenden.

[0008] Zhou et al. haben in „Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles", 1992, Virology, Band 185, Seiten 251–257, über die Bildung von HPV-16 virusähnlichen Partikeln in CV-1-Zellkernen in Folge einer Infektion mit einem doppelt recombinanten Expressionsvektors des Vaccinia-Virus HPV-16 L1/L2 berichtet. Die Autoren waren jedoch nicht in der Lage, VLPs mit einem Vektor zu produzieren, der ausschließlich L1 exprimiert. Des Weiteren fehlte den produzierten VLPs eine klar definierte Symmetrie und sie zeigten größere Variabilität in Bezug auf ihre Größe und sie waren kleiner, nur etwa 35–40 nm im Durchmesser, als HPV-Virionen (55 nm) und auch kleiner als die VLPs der vorliegenden Erfindung (aus Baculoviren produzierte HPV-11 VLPs, ungefähr 50 nm im Durchmesser).

[0009] Die US-Patentschrift 5,045,447 von Minson beschreibt eine Methode zur Suche nach monoklonalen Antikörpern mit gewünschten Eigenschaften in den Überständen von Hybridomakulturen. Das Verfahren nach Minson wird beispielhaft erläutert durch die Produktion von Antikörpern gegen das L1 Protein des humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV-16) unter Verwendung dieses Proteins als Zielantigen in Mäusen. Minson versäumt es jedoch, die Expression des L1 Proteins oder die Produktion der HPV-virusähnlichen Partikel (VLPs) zu beschreiben.

[0010] Die US-Patentschrift 4,777, 239 von Schoolnik et al., beschreibt kurze Peptidsequenzen, die von verschiedenen offenen Leserahmen des frühen Bereichs des Papillomavirus abgeleitet sind und welche Typ-spezifische Antikörper zum Papillomavirus locken. Die Erfinder versäumen es jedoch, irgendwelche Sequenzen zu beschreiben, die sich auf den größeren spät offenen Leserahmen L1 beziehen.

[0011] Die US-Patentschrift 5,057,411 von Lancaster et al. beschreibt eine Polynukleotid-Sequenz von etwa 30 Nucleotiden des offenen Leserahmens des Papillomavirus L1 Capsidproteins, von dem die Erfinder behaupten, dass dieses ein Typ-spezifisches Epitop des Papillomavirus kodiere. Die Erfinder beschreiben jedoch keine infizierten Tiere, die Antikörper produzieren, welche diese Sequenz erkennen. Stattdessen haben sie eine Version des Rinder-Papillomavirus Typ 1 (BPV-1) der Sequenz (ein 10 Aminosäurenpeptid oder Dekapeptid) synthetisiert, dann Kaninchen immunisiert und das Antiserum auf seine Fähigkeit zur Reaktion mit entweder durch BPV-1 oder durch BPV-2 induziertem Fibro-Papilloma-Gewebe getestet. Das Peptid-Antiserum reagierte lediglich mit BPV-1- und nicht mit BPV-2-Gewebe. Die Erfinder schlussfolgerten dann, dass das Peptid eine Typ-spezifische antigene Determinante enthalte, und dass folglich alle das Papillomavirus L1 kodierenden Sequenzen an dieser Stelle ein Typ-spezifisches Epitop enthalten. Es handelt sich hierbei um eine theoretische Vermutung der Erfinder, die keine unterstützenden Daten für diese Hypothese liefern. Darüber hinaus ist man im allgemeinen der Meinung, dass die beschriebenen Aminosäure-Sequenzen (10 Aminosäuren) nicht in der Lage sind, übergeordnete Antigenstrukturen anzunehmen, d. h., konformative Epitope zu bilden, die eine dreidimensionale Struktur besitzen, so wie die durch das hierin beschriebene Verfahren produzierten.

[0012] Ein weiteres bei Papillomavirus-Infektionen auftretendes Problem ist die Notwendigkeit von alternativen therapeutischen und prophylaktischen Modalitäten. Eine solche, bisher wenig untersuchte Modalität wären Papillomavirus-Impfstoffe. 1944 behandelte Biberstein Condyloma-Acuminatum-Patienten mit einem autogenen Impfstoff, der aus den Warzen der Patienten gewonnen worden war (Biberstein, „Immunization therapy of warts," Arch. Dermatol. Syphilol, 1944, Band 50, Seiten 12–22). Danach entwickelten Powell et al., eine Technik, die heute üblicherweise verwendet wird, um autogene Warzenimpfstoffe zur Behandlung von Condyloma Acuminatum herzustellen (Powell et al., „Treatment of condylomata acuminata by autogenous vaccine," 1970, South Med. J., Band 63, Seiten 202–205). Mit lediglich einer placebo-kontrollierten Doppelblindstudie wurde versucht, die Wirksamkeit des autogenen Impfstoffes zu bestimmen (Malison et al., „Autogenous vaccine therapy for condyloma acuminatum: A double-blind con-

trolled study," 1982, Br. J. Vener. Dis., Band 58, Seiten 62–65). Die Autoren schlussfolgerten, dass autogene Impfung nicht effektiv für die Behandlung von Condylomata acuminata ist, obwohl diese Interpretation falsch sein könnte. Die kleine Zahl der untersuchten Patienten machte es von vorne herein unmöglich, eine gültige negative Schlussfolgerung zu ziehen. In jedem Fall haben autogene Impfstoffe, so wie sie bis heute beschrieben wurden, einige Nachteile. Erstens muss der Patient für die Herstellung des Impfstoffes relativ große Warzen (2 g bis 5 g) aufweisen. Zweitens muss der behandelnde Arzt Zugang zu Laborausstattung haben und Erfahrung besitzen jedes mal wenn ein neuer Patient behandelt werden soll. Deswegen ist die Impfstoffherstellung sehr teuer, mühsam und in Fällen, in denen die Geschwulstmasse relativ ist, nicht möglich.

[0013] Bedauerlicherweise würden die traditionellen Verfahren zur Virusvermehrung bisher noch nicht zur Untersuchung von Papillomaviren angepasst und mit den zuvor beschriebenen alternativen Verfahren ist es nicht möglich, infektiöse Virionen in für immunologische Studien nennenswerten Mengen zu produzieren. Auch die *in vivo* erfolgende Vermehrung von HPV-11 im athymischen Maussystem ist nicht von besonders großem praktischen Nutzen, da sie teuer, arbeitsaufwendig und momentan auf HPV-11 beschränkt ist. Folglich wird ein alternatives Verfahren zur Produktion von Epitopen des HPV-Capsids für die Verwendung in immunologischen Untersuchungen und für die Impfstoffproduktion benötigt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Expression der kodierenden Sequenz des Capsid-Proteins des Papillomavirus (PV) in einer Zelle und umfasst die Transfektion der Zelle mit einem Expressionsvektor, der die das Papillomavirus-Capsidprotein kodierende Sequenz enthält, unter Bedingungen, die die Expression des Proteins in der Zelle ermöglichen.

[0015] Ein weiterer Teil der Erfindung beschreibt einen oder mehrere virusähnliche Partikel (VLPs), ein Fragment oder Fragmente, ein Capsomer oder Capsomere oder einen Teil oder Teile davon, das bzw. die vom Papillomavirus-Capsidprotein gebildet werden. Es wurde beobachtet, dass das virusähnliche oder die virusähnlichen Partikel eine oder mehrere antigenen Eigenschaften besitzen, die denen von nativen infektiösen Papillomavirus-Partikeln ähnlich ist bzw. ähnlich sind.

[0016] Eine bevorzugte Ausführung der Erfindung liefert ein Verfahren zur Expression der Sequenz, die das L1 Capsid-Protein des humanen Papillomavirus Typ 6 (HPV-6) und Typ 11 (HPV-11) kodiert in Sf-9 Insektenzellen unter Verwendung des Baculovirus-Ex-

pressionssystems. Die HPV-6 und HPV-11 kodierenden Sequenzen wurden unter Verwendung von in der Fachwelt bekannten Standardmethoden in einen Baculovirus-Transfer-Vektor kloniert. Die resultierenden Baculovirus-Transfer-Vektoren wurden zur Co-Transfektion von Sf-9 Insektenzellen mit dem *Autographa californica nuclear polyhedrose Virus* (AcNPV) benutzt, wodurch ein rekombinanter Baculovirus entstand (Ac6L1 oder Ac11L1), der anschließend gereinigt wurde. Anschließend wurden Sf-9 Insektenzellen entweder mit Ac6L1 oder mit Ac11L1 unter Bedingungen infiziert, die die Expression des Proteins in den Zellen ermöglichen. Es war zu beobachten, dass das L1 Protein virusähnliche Partikel (VLPs) bildete. VLPs wurden mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von negativ gefärbten Sacharose-Banden-Faktionen identifiziert, die aus mit dem rekombinantern Ac11L1 Baculovirus infizierten Sf-9 Zellen gewonnen worden waren. Außerdem wurde erkannt, dass die VLPs immunologische und morphologische Eigenschaften besaßen, ähnlich denen von nativen HPV-11-Virionen, die mit Hilfe von Kaninchen-Antiseren definiert worden waren.

[0017] Ein oder mehrere virusähnliche Partikel, die in Übereinstimmung mit der Erfindung produziert wurden, können in diagnostischen Untersuchungen verwendet werden, eine Rolle bei der Identifikation und Charakterisierung eines HPV-Zell-Rezeptors spielen und für die Entwicklung von Impfstoffen (so-wohl therapeutischer als auch prophylaktischer Art) verwendet werden. Es versteht sich, dass das Verfahren der Erfindung, so wie es hier für die Herstellung von HPV-11 und HPV-6 beschrieben wird, zur Herstellung ähnlicher immunologischer Reagenzien aus anderen tierischen und/oder menschlichen Papillomaviren verwendet werden kann. Darüber hinaus werden VLPs, die in Übereinstimmung mit der Erfindung produziert werden, eine Vielzahl von Reagenzien liefern, mit denen immunologische Studien von Papillomaviren durchgeführt und Impfstoffe gegen Papillomaviren entwickelt werden können.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0018] [Fig. 1A](#) zeigt ein mit Coomassie-blue gefärbtes SDS Polyacrylamidgel von Lysaten von SF-9 Zellen, die mit Wildtyp AcNPV und mit rekombinantem Ac11L1 infiziert waren.

[0019] [Fig. 1B](#) zeigt einen Westernblot von Lysaten von SF-9 Zellen, die mit Wildtyp AcNPV und mit rekombinantem Ac11L1 infiziert waren, der mit einem für das gemeinsame HPV L1 Epitop spezifischen, polyclonalen Kaninchen-Antiserum detektiert wurde.

[0020] [Fig. 2](#) zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV-11 virusähnlichen Partikeln, die mit Hilfe von Sacharose Dichte-Zentrifugation aus mit Ac11L1 infizierten SF-9 Zellen gereinigt wurden. Die

VLPs weisen einen Durchmesser von näherungsweise 52 nm (durch Vergrößerungsstandards skaliert) auf und besitzen icosahedrische Symmetrie, in Übereinstimmung mit publizierten Beobachtungen bezüglich der morphologischen Charakteristika von natürlich vorkommenden Papilloma-Virionen.

[0021] [Fig. 3](#) zeigt Vergleiche von Westernblots mit Immunodotblots der Immunoreaktivitäten von Kaninchen-Antiseren mit rekombinannten L1. In Feld A wurde ein rekombinantes L1 Insektenzellen-Lysat unter denaturierenden Bedingungen westerngeblotet. Im Feld B wurden nicht rekombinante (+) oder rekombinante L1 (L1) Insektenzellen-Lysate unter nicht denaturierenden Bedingungen auf eine Blotmembran aufgetragen. Die Streifen A wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum detektiert, das spezifisch für das gewöhnliche HPV L1 Epitop ist; die Streifen B wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum detektiert, das spezifisch für die amino-terminale Aminosäuresequenz von HPV L1 ist; die Streifen C wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum gegen ganze Viruspartikel detektiert.

[0022] [Fig. 4](#) zeigt eine Westernblot-Bestimmung, bei der die Zell-Lysate rekombinanter L1 Insektenzellen verwendet wurden. Die Streifen A-X entsprechen den verschiedenen verwendeten primären Antikörpern (die Streifen A und B wurden mit Prä- bzw. Post-Immuno-Kaninchen-Antiseren gegen ganze Viruspartikel behandelt; der Streifen C wurde mit einem post-immunen Kaninchen-Antiserum gegen das denaturierte gewöhnliche L1 Epitop behandelt; die Streifen D-O wurden mit Seren von Condyloma Acuminatum Patienten behandelt. Die Streifen P-X wurden mit Kontrollseren behandelt).

[0023] [Fig. 5](#) zeigt eine Immunodotblot-Bestimmung, bei der Insektenzellen-Lysate verwendet wurden. Die Buchstaben über den Streifen beziehen sich auf die verschiedenen verwendeten primären Antikörper. Es handelt sich dabei um dieselben wie bereits in [Fig. 4](#) beschrieben.

[0024] [Fig. 6](#) ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV Typ 6 (VLPs), die durch die Konstruktion und Expression eines HPV-6 L1 rekombinannten Baculovirus (Ac6L1) hergestellt wurden.

[0025] [Fig. 7](#) ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV Typ 16 (VLPs), die durch die Konstruktion und Expression eines HPV-16 L1 rekombinannten Baculovirus (Ac16L1) hergestellt wurden.

[0026] [Fig. 8](#) zeigt die Seroreaktivität von Condyloma Acuminatum Patienten auf HPV-11 L1 VLPs.

[0027] [Fig. 9](#) zeigt die Korrelation zwischen den Seroreaktivitäten auf HPV-11-Virionen und auf VLPs.

[0028] [Fig. 10\(a\)](#) zeigt einen Westernblot (linkes Feld) von HPV-11 L1 (Spur 2) und HPV-16 L1 (Spur 3) Proteinen. Molekulare Referenzmarker befinden sich auf der linken Seite, der Pfeil zeigt die ungefähre Position der HPV-11 und HPV-16 rekombinannten L1 Proteine an.

[0029] [Fig. 10\(b\)](#) ist ein Immunodotblot (rechtes Feld) mit Spur 1: AcNPV (mit einem Wildtyp Baculovirus infizierte Probe); Spur 2: Ac11L1 (mit rekombinantem Ac11L1 infizierte Probe); Spur 3: Ac16L1 (mit rekombinantem Ac16L1 infizierte Probe).

[0030] [Fig. 11](#) zeigt die Detektion von rekombinantem HPV-11 L1 im Überstand einer mit Ac11L1 infizierten Sf-9 Zellkultur durch SDS Page und Westernimmunoblot (Feld A: SDS Page (Coomassie gefärbt); Feld B: Westernblot, bei dem das gewöhnliche PV L1 Antigenserum verwendet wurde; Spur 1: Hochgeschwindigkeits sediment aus dem Überstand einer mit nicht rekombinantem AcNPV infizierten Zellkultur; Spur 2: Hochgeschwindigkeits sediment aus dem Überstand einer mit Ac11L1 infizierten Sf-9 Zellkultur; Molekulargewichtsmarker (M_r) befinden sich auf der linken Seite; der Pfeil auf der rechten Seite kennzeichnet die Position des 55 kD M_r rekombinannten L1).

[0031] [Fig. 12](#) zeigt eine elektronenmikroskopische Analyse von unbehandelten und von CsCl-gereinigten VLP-Präparaten (A-VLPs, aus dem zellfreien Überstand einer Zellkultur von mit Ac11L1 infizierten Sf-9 Zellen sedimentiert; B- mit CsCl gereinigte VLPs; Balken = 50 nm).

[0032] [Fig. 13](#) zeigt die Immunodotblot-Bestimmung von gereinigtem VLPs und von ganzen HPV-11 Virionen (Spur 1: Prä-Immunseren; Spur 2: Post-Immunseren; A- Kaninchen R-366 mit ganzen, gereinigten HPV-11 Virionen immunisiert; B- Kaninchen R-399 mit gereinigten HPV-11 VLPs immunisiert; Antigene: VLP (HPV-11 L1 virusähnliche Partikel); WVP (HPV-11 ganze Viruspartikel)).

[0033] [Fig. 14](#) zeigt eine Dotblot-Bestimmung der geometrischen Mitte der Durchmesser (GMD) von Xenographien.

[0034] [Fig. 15](#) zeigt eine Westernblot-Immununtersuchung von gereinigten HPV-11, HPV-16 und HPV-18 VLP-Präparaten (Spur A, HPV-11 L1 VLPs; Spur B, HPV-16 L1 VLPs; Spur C, HPV-18 L1 VLPs)

[0035] [Fig. 16\(A-C\)](#) zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Cäsiumchlorid gereinigten VLPs, das von den HPV-Typen 11, 16 und 18 hergeleitet wurde. Die VLPs wurden, wie in der Beschreibung erläutert, gereinigt und mit zweiprozentiger Phosphor-Wolfram-Säure negativ gefärbt. A) HPV-11 L1 VLPs; B) HPV-16 L1 VLPs; C) HPV-18 L1

VLPs; die Balken entsprechen 100 nm.

[0036] [Fig. 17](#) zeigt die Immunoreaktivitäten von post-immunen VLP-Kaninchen-Antiseren mit homologen und heterologen VLP-Präparationen. Antigene: HPV-11 L1 VLPs, weiße Balken; HPV-16 L1 VLPs, gestreifte Balken; HPV-18 L1 VLPs, schwarze Balken. Antiseren A) gewöhnliches Anti-PVL1-Antigen-Kaninchen-Antiserum; B) HPV-11 ganze Virionen Kaninchen-Antiserum; C, D) von zwei mit HPV-11 L1 VLPs immunisierten Kaninchen; E, F) von zwei mit HPV-16 L1 VLPs immunisierten Kaninchen; G, H) von zwei mit HPV-18 L1 VLPs immunisierten Kaninchen

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0037] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Expression der kodierenden Sequenz des Papillomavirus-Capsidproteins in einer Zelle unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems unter Bedingungen, welche die Expression des Proteins in der Zelle ermöglichen. Gemäß einem anderen Gesichtspunkt der Erfindung wurde erkannt, dass ein oder mehrere virusähnliche Partikel (VLPs), ein oder mehrere Fragmente, ein oder mehrere Capsomere bzw. ein Teil oder Teile davon durch das Papillomavirus-Capsidprotein gebildet werden. Des Weiteren wurde erkannt, dass das oder die virusähnlichen Partikel antigene Eigenschaften besitzen, die denen nativer infektiöser Papillomavirus-Partikel ähnlich sind.

[0038] Die Verwendung des Begriffes „ein oder mehrere virusähnliche Partikel (VLPs)“ bezieht sich auf ein oder mehrere virusähnliches oder virusähnliche Partikel, ein oder mehrere Fragmente, ein oder mehrere Capsomere bzw. einen Teil oder Teile davon, die von der Sequenz des Papillomavirus, die das Capsidprotein kodiert, produziert wurden und außerdem eine oder mehrere antigene Eigenschaften besitzen, die denen von infektiösen Papillomavirus-Partikeln ähnlich sind. Die Verwendung des Begriffs „antigene Eigenschaft oder Eigenschaften“ bezieht sich hierbei 1) auf die Fähigkeit des bzw. der virusähnlichen Partikel zur Kreuzreaktion mit Wildtyp-Partikeln (native infektiöse Viruspartikel desselben HPV-Typs) sowie mit in Tieren und/oder Menschen durch Immunisierung mit entweder VLPs oder infektiösen Viren gewonnenen Antiseren festgestellt; und/oder 2) auf die Fähigkeit, Antikörper in humanen Seren von Personen zu erkennen oder nachzuweisen, von denen bekannt ist, dass sie mit homologen Viren infiziert sind.

[0039] Die Verwendung der Begriffe „die das L1 Protein kodierende Sequenz“ oder „die das L1 Capsidprotein kodierende Sequenz“ oder „die L1 kodierende Sequenz“ bezieht sich hierbei jeweils auf den offenen Leserahmen, der für das L1 Protein in Papil-

lomaviren kodiert. Wenn die das L1 Protein kodierende Sequenz exprimiert wird, produziert sie ein Protein, oder einen Proteinkomplex oder ein Aggregat, das bzw. der immunologische und morphologische Eigenschaften besitzt, die denen nativer Papillomavirus-Virionen ähnlich sind. Die in der Erfindung verwendete L1 kodierende Sequenz kann aus genomicscher Papillomavirus DNA isoliert und gereinigt werden oder unter Verwendung von gentechnologischen Standardmethoden synthetisiert werden.

[0040] Die Verwendung des Begriffs „transfizieren“ beschreibt hierbei jedes Mittel, um ein Virus, ein Plasmid oder einen Vektor in eine Zelle einzubringen. Zu Beispielen für solche Mittel gehören Infektion, Kalziumphosphat-Ausfällung und Elektroporation.

[0041] Gemäß einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird ein Verfahren zum Exprimieren der das L1 Capsid-Protein des humanen Papillomavirus Typs 11 (HPV-11) oder des humanen Papillomavirus Typs 6 (HPV-6) kodierende Sequenz in Sf-9 Insektenzellen unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems geschaffen. Es versteht sich, dass die das Capsidprotein dieser HPV Typen kodierenden Sequenzen nur zu Illustrationszwecken verwendet werden und dass jede ein L1 Capsidprotein kodierende Sequenz von jedem tierischen oder humanen Papillomavirus Typ verwendet werden kann, ohne von dem angestrebten Umfang der Erfindung abzuweichen. Zu solchen HPV Typen gehören, ohne hierauf beschränkt zu sein, die HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35 (siehe den Artikel von Gissman et al., Cancer Cells, 1987, Band 5, p. 275, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird); und solche HPV Typen, die in der PCT-Veröffentlichung WO 92/16636 von Boursnell et al., publiziert wurden und deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird).

[0042] Bei dem bevorzugten Expressionssystem, das für das Verfahren gemäß der Erfindung benutzt wird, handelt es sich um das Baculovirus-Expressionssystem. Es versteht sich jedoch, dass ein anderes Expressionssystem oder andere Expressionssysteme hierfür unter der Voraussetzung eingesetzt werden können, dass das System oder die Systeme, die das L1 Protein kodierende Sequenz exprimieren können. Als Beispiele für solche Systeme können, ohne hierauf beschränkt zu sein, alle prokaryotischen und/oder eukaryotischen Systeme angeführt werden, die Adenoviren, SV40, E. coli, March 9, 1993 CHO Zellen, Vacciniairen, Insektenviren, Hefe, ein bakteriophages Virus oder modifizierte Viren, DNA Plasmide, Vektoren und dergleichen enthalten. Die Wirtszelle für die Expression der L1 kodierenden Sequenz ist von dem verwendeten Expressionssystem abhängig. Als Beispiele für geeignete Wirtszellen können, ohne hierauf beschränkt zu sein, Bakterien (Prokaryonten), Mikroorganismen wie z. B. Hefe, Säugerzellen (Eukaryonten) und Insektenzellen aufgeführt werden.

Unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems sind Insektenzellen, wie z. B. Sf-9 oder Sf-21 zu bevorzugen.

[0043] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wurde erkannt, dass das L1 Protein virusähnliche Partikel (VLPs), ein Fragment oder Fragmente, ein Capsomer oder Capsomere oder einen Teil oder Teile hiervon produziert, die vom Papillomavirus-Capsidprotein gebildet werden. Es wurde erkannt, dass das oder die virusähnlichen Partikel eine oder mehrere antigene Eigenschaften besitzen, die denen nativer infektiöser Papillomavirus-Partikel ähnlich sind. Insbesondere enthalten diese VLPs eine antigene Determinante, die spezifisch von Antikörpern erkannt wird, die in Seren enthalten sind, die von mit genitalen HPV infizierten Patienten gewonnen wurden. So ließ z. B. die Reaktion von Insektenzellextrakten, die VLP enthalten, mit Antiseren gegen entweder denaturierte oder nicht denaturierte Capsid-Epitope, die aus Immunreaktionen in Westernblot und Immunodotblot nachweisen, hergeleitet wurde, vermuten, dass konformativne Epitope, die in nativen infektiösen HPV-11 Virionen vorhanden sind, ebenfalls auf den durch Baculoviren produzierten HPV-11 VLPs der vorliegenden Erfindung vorkommen. Immunodotblot-Bestimmungen, bei denen humane Seren verwendet wurden, die von Personen gewonnen wurden, bei denen mit Biopsien Condylomata acuminatum nachgewiesen werden konnte, stimmten genau mit Ergebnissen überein, die zuvor bei auf ganzen HPV-11 Viruspartikeln basierenden ELISA-Tests erhalten worden waren, beschrieben im Artikel von Bonnez et al., „Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata“ 1991, J. Gen. Virol., vol 72, Seiten 1343–1347, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird).

[0044] Diese morphologischen und immunologischen Ähnlichkeiten zu nativen HPV-11 Virionen legen nahe, dass rekombinante, mit Hilfe des Baculovirus-Systems produzierte VLPs bei sero-epidemiologischen und Pathogenese-Studien nützlich sein werden, die sich nicht nur auf genitale HPV-Infektionen, sondern auf jeden Papillomavirus beziehen können, sowie für die Entwicklung von Impfstoffen. L1 hat eine inhärente Fähigkeit zum Selbstzusammensetzen. Somit werden keine anderen Papillomavirus-Proteine für die VLP-Bildung im Baculovirus-System benötigt. Dies unterstützt die Behauptung, dass VLPs für alle Arten von Papillomaviren in Übereinstimmung mit dem hier beschriebenen Verfahren produziert werden können.

[0045] Die VLPs der Erfindung können zur Erzeugung von Antikörpern verwendet werden, entweder in Individuen, die gegen eine Infektion durch HPV geschützt werden sollen, d. h. als Impfstoffe, oder zur Erhöhung der Immunantwort gegen eine bereits vor-

liegende HPV-Infektion. Die VLPs der Erfindung können in Tierarten injiziert werden, um für die Diagnose nützliche Antiseren zu erhalten. Zusätzlich zu polyclonalen Antiseren können monoklonale Antikörper gewonnen werden, durch Einsatz der Verfahren nach Kohler und Milstein, oder durch Abwandlungen davon, durch Immortalisierung von Milz- oder anderen Antikörper produzierenden Zellen aus geimpften Tieren, um Antikörper produzierende Klone, d. h. Hybridenzellen zu erhalten.

[0046] Die gewonnenen Antikörper können zur Diagnose von HPV-Infektionen in zervikalen Biopsien oder Papanicolaou-Abstrichen benutzt werden und zur Beurteilung von Krankheitsstadien bei Menschen oder bei anderen Patienten. Eine Diagnose unter Verwendung der Antikörper der Erfindung erlaubt insbesondere die Überwachung des Fortschreitens der Erkrankung. Die Antikörper können bei der Serumsanalyse zur Feststellung des Virus benutzt werden, so wie auch zur Überwachung des Fortschritts einer Therapie mit antiviralen oder anderen therapeutischen Wirkstoffen, die zur Eingrenzung der Infektion oder des Karzinoms bestimmt sind. Die Antikörper können unter Berücksichtigung artspezifischer Variationen auch für eine passive Therapie verwendet werden.

[0047] Die VLPs der Erfindung können für Immunbestimmungen verwendet werden, um im Serum von Patienten, die verdächtigt werden, HPV-Infektionen in sich zu tragen, das Vorhandensein von Antikörpern zu bestimmen, die gegen HPV erzeugt wurden, oder zur Titration von Seren von Patienten, die mit einem Anti-HPV-Impfstoff behandelt werden.

[0048] Die VLPs der Erfindung können einem Wirt direkt verabreicht werden, um die Bildung neutralisierender Antikörper einzuleiten (Bonnez et al., 1992, an anderer Stelle zitiert; und Rose et al, in press, an anderer Stelle in diesem Text zitiert, wobei der Inhalt dieser Artikel durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), um entweder eine schützende Immunität gegen HPV zu verleihen oder, falls der Patient bereits infiziert ist, um die dem Patienten eigene Immunantwort zu verstärken. Für alle Anwendungen werden die VLPs in immunogener Form verabreicht. Wahlweise können die VLPs mit einem Immunogenität verleihenden Trägermaterial gepaart werden, wobei das Material vorzugsweise antigenneutral sein sollte. In Abhängigkeit vom benötigten Einsatzbereich können die VLPs der Erfindung entweder als artspezifische oder als Breitband-Impfstoffe und Diagnostika dienen.

[0049] VLPs, die als Impfstoffe verabreicht werden sollen, können gemäß herkömmlicher und/oder zukünftiger Verfahren für die Verabreichungen an den zu schützenden Patienten zubereitet werden, und können mit herkömmlichen Hilfsstoffen gemischt

werden. Das exprimierte Peptid kann in aus Untereinheiten bestehenden Impfstoffzubereitungen, welche polyvalent sein können, als Immunogen verwendet werden. Die polyvalente Impfstoffzubereitung kann VLPs enthalten, von denen jedes ein anderes L1 Protein von verschiedenen HPVs kodiert. Das Produkt kann zum Zwecke der Herstellung von Impfstoffzubereitungen aus jedem Vektor/Wirt-System gereinigt werden, das das heterologe Protein exprimiert. Die gereinigten VLPs sollten auf eine geeignete Konzentration eingestellt werden, mit einem geeigneten Impfhilfsstoff als Rezeptur verarbeitet und für die Verwendung verpackt werden. Solche geeigneten Hilfsstoffe beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein: Mineralgele, z. B. Aluminiumhydroxid; oberflächenaktive Substanzen wie z. B. Lysolecithin, pluronische Polyole; Polyanionen, Peptide; Ölemulsionen; und möglicherweise nützliche menschliche Hilfsstoffe, wie z. B. BCG (Bazille Calmette-Guerin) und *Corynebacterium parvum*. Das Immunogen kann auch in Liposomen eingelagert oder mit Polysacchariden und/oder anderen Polymeren, die in Impfstoffzubereitungen Verwendung finden, gepaart sein. Viele Verfahren zur Verabreichung der oben beschriebenen Impfstoffzubereitungen können angewandt werden; diese beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, orale, intradermale, intramuskuläre, intraparitoneale, intravenöse, subkutane und intranasale Wege. Wenn sie direkt als diagnostische Reagenzien verwendet werden sollen, werden sie unter Verwendung gebräuchlicher Verfahren aufgereinigt und entsprechend für die jeweilige Verwendung verpackt. Wenn sie für die Produktion von Antikörpern für diagnostische Zwecke verwendet werden sollen, können passende Versuchstiere für die Herstellung der geeigneten Antiseren verwendet werden. Zu den geeigneten Versuchstieren zählen Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen oder auch größere Säugetiere wie z. B. Schafe. Die Antikörper können therapeutisch solange verwendet werden, wie sie mit dem zu behandelnden Wirt verträglich sind. Monoklonale Antikörper, die die richtigen Arteigenschaften aufweisen, sind für diese Anwendung zu bevorzugen.

[0050] Die folgenden Beispiele dienen dazu, die vorliegende Erfindung weiter zu veranschaulichen.

BEISPIEL I

Methoden

1. Konstruktion von HPV-11 Viraler DNA und des pVL11L1 Baculovirus-Transfervektors

[0051] Genomische HPV-11 DNA wurde aus Viruspartikeln gewonnen, die aus experimentell induzierten Xenotransplantaten athymischer Mäuse gereinigt worden waren, wie im Artikel „Expression of the full-length products of the HPV-6b and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus,

and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles“, 1990, J. Gen. Virol., Band 71, Seiten 2725–2729 von Rose et al. beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die L1 kodierende Sequenz wurde kloniert mittels PCR-Amplifikation gereinigter genomicscher DNA unter Verwendung von Primern, die so entworfen wurden, dass sie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BglII und EcoRI am 5' bzw. 3' Ende einfügen. Die Sequenzen des Vorwärts- bzw. des Rückwärts-Primers lautet wie folgt: 5'-CGC AGA TCT ATG TGG CGG CCT AGC-3' und 5'-CAT ATG AAT TCC CAC AAC ACA CTG ACA CAC-3'. Die Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) wurden nahe dem vermuteten L1 Startkodon (in Fettschrift und ungefähr 30 Nukleotide downstream des vermuteten L1 Stopkodons durch primer-gerichtete Mutagenese eingeführt. Die Amplifikation wurde im wesentlichen durchgeführt wie in dem Artikel „Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction,“ 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 von Bonnez et al. beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, unter Verwendung von 500 ng von jedem Primer und zwei Units der Taq DNA Polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT). Nach der Amplifikation wurde das PCR Produkt mit BglII und EcoRI geschnitten. Das 1539 Basenpaar (bp)-Spaltprodukt, das den gesamten offenen Leserahmen (ORF) von HPV-11 L1 enthielt, wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese gereinigt wie in dem Artikel „Expression of the full-length products of the HPV-6B and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles,“ 1990, J. Gen. Virol., Band 71, Seiten 2725–2729 von Rose et al. beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und in die entsprechenden Stellen eines Baculovirus-Transfervektors, pVL-1392 (M. D. Summers, Texas A & M University, College Station, TX) kloniert. Das resultierende Konstrukt, pVL11L1, wurde benutzt, um Sf-9 Zellen mit genomicscher DNA des *Autographa californica* Nuklear-Polyhedrose-Virus (AcNPV) zu ko-transfizieren, laut den Verfahren von Summers et al., die in dem Artikel A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, 1987, Texas A & M University, College Station, Texas, beschrieben sind, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Rekombinante Baculoviren wurden durch visuelle Begutachtung und Selektion occlusions-negativer (occ-) Plaques wieder gewonnen und wurden zwei weiteren Runden per Plaque-Reinigung unterzogen, laut den Verfahren von Summers et al., die in dem Artikel A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, 1987, Texas A & M University, College Station, Texas, beschrieben sind, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die Proteinexpression

isolierter Virenbestände wurde mittels Westernblot bestimmt.

2. SDS-PAGE und Westernblot-Nachweis der Expression von rekombinantem L1 in Sf-9 Zellen

[0052] Infizierte Sf-9 Zellkulturen wurden in 150 cm² Gewebekulturgefäßen gezüchtet und für analytische SDS-PAGE und Westernblot-Bestimmungen vorbereitet. Nicht rekombinante oder rekombinante L1 infizierte Zellen wurden aus den Gefäßen durch Resuspendieren mit einer Pasteurpipette abgenommen und gleiche Anzahlen von Wildtyp oder rekombinannten L1 infizierten Zellen wurden bei 500 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die Zellsedimente wurden auf Eis gestellt und sofort in einem ml Lyse-Puffer resuspendiert (30 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Leupeptin (10 µg/ml); 1% NP-40) und für 15 min bei Raumtemperatur und gelegentlichem Vortexen stehengelassen. Nach Zentrifugation bei 500 g für 2 min bei 4°C wurde die im Überstand enthaltene NP-40-lösliche Fraktion entfernt und 1 : 1 mit 2X Laemmli-Probenpuffer verdünnt, so wie in dem Artikel „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4“ 1970, Nature, Band 277, Seiten 680–685, von Laemmli beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und für 3 min auf 95°C erhitzt. Das NP-40-unlösliche Sediment (welches Kernmaterial enthielt) wurde einmal mit kaltem PBS (1 mM PMSF: 10 µg/ml Leupeptin) gewaschen und durch Kochen und Vortexen in 1X Laemmli-Puffer löslich gemacht. Die Proben wurden elektrophoretisch auf 10% SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt mit Coomassie-blue gefärbt (**Fig. 1, Feld A**) oder auf eine Immobilon-P-Membran (Millipore Corp., New Bedford, MA) geblottet (**Fig. 1, Feld B**) wie im Artikel „Expression of the full-length products of the HPV-6b and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles,“ 1990, J. Gen. Virol., Band 71, Seiten 2725–2729, von Rose et al. Beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.

3. Herstellung von nicht rekombinanten und rekombinanten L1 Vorratslösungen

[0053] Die Bestimmungsversuche wurden unter Verwendung von Verdünnungen geklärt (Hochgeschwindigkeits-)Vorratslösungen von Überständen durchgeführt, die aus Extrakten von entweder AcNPV oder Ac11L1 infizierten Insektenzellen gewonnen worden waren. Suspensionskulturen (100 ml) von Sf-9 Zellen, die entweder mit AcNPV oder Ac11L1 zu einer Infektionsmultiplizität von näherungsweise 10 plaque-bildenden Einheiten pro Zelle infiziert worden waren, wurden für 72 Stunden bei 27°C inkubiert. Die Kulturen wurden dann bei 1000 × g für 10 min bei 4°C

zentrifugiert und die Zellsedimente in 20 ml Homogenisierungspuffer (Lyse-Puffer mit 1 M NaCl) resuspendiert und mit 50 Hüben in einem Dounce-Homogenisator auf Eis homogenisiert. Die Homogenate wurden in kalte 30 ml Corex-Röhrchen mit Schraubdeckeln überführt und bei 3000 × g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Fraktionen von Niedergeschwindigkeitsüberständen wurden dann in ein sauberer Röhrchen überführt und bei 100.000 × g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Die Gesamtproteinkonzentrationen von Fraktionen der Hochgeschwindigkeitsüberstände wurden durch spektrophotometrische Absorption bei 280 nm gemessen, laut der Vorgehensweise von Stoscheck die in dem Artikel „Quantitation of proteins“ 1990, in Methods in Enzymology, Band 182, p. 54, Academic Press, Inc., New York, beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und mit frischem Homogenisierungspuffer gleichwertig eingestellt (die Proteinkonzentrationen näherungsweise gleich 30 mg/ml). 10% Glycerol (v/v) wurden zugefügt und Vorratslösungen wurden in Teilmengen aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

4. Westernblot- und Immunodotblot-Bestimmungen

[0054] Westernblot- und Immunodotblot-Bestimmungen wurden benutzt, um lineare und konformativ Epitop-Antikörperbesonderheiten in Kaninchen-Antiseren und in humanen Seren festzustellen. Die Westernblot-Bestimmungen (**Fig. 3, Feld A** und **Fig. 4**) wurden unter Verwendung von 2 µl (etwa 60 µg Gesamtprotein) rekombinanter L1 Vorratslösung 1 : 100 verdünnt mit 1X Laemmli Probenpuffer durchgeführt, welcher Proteine denaturierende Reagenzien enthält, wie dies in dem Artikel „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4,“ 1990, Nature, Band 277, Seiten 680–685, von Laemmli beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und für 3 min auf 95°C erhitzt. Die denaturierte Probe wurde in eine einzelne 100 mm breite Probenetasche geladen, durch Elektrophorese in einem 10% SDS Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Immobilon-P-Membran geblottet. Nach Blockierung mit einer 2% BSA-Lösung (Kirkegaard und Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD) für 2 Stunden bei 37°C wurde die Membran in 24,4 mm breite Streifen geschnitten, wobei jeder Streifen etwa 2,5 µg Gesamtprotein enthielt. Danach wurden die Streifen in Sonden in Form von Antiseren behandelt (**Fig. 3, Feld A, und Fig. 4**).

[0055] Für die Immunodotblot-Bestimmungen wurden nicht rekombinante oder rekombinante L1 Vorratslösungen 1 : 1000 mit kaltem PBS (1 mM CaCl₂) verdünnt und 100 µl Teilmengen (die etwa 3,0 µg Gesamtprotein enthielten) wurden auf eine Immobilon-P-Membran getropft. Proteine denaturierende Reagenzien wurden bei der Zubereitung der Immunodotblot-Proben weggelassen, um die native Konformation von rekombinanten L1 zu erhalten. Blocki-

er-primäre und sekundäre Antikörperverdünnungslösungen, Waschlösungen und Substrate, die hier verwendet wurden, sind so wie in dem Artikel „Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen),“ 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555, von Strike et al. Beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die Inkubation mit den primären Antikörpern wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt, die Inkubationen mit den sekundären Antikörpern fanden bei Raumtemperatur für 90 min statt. Für die Immunoblottingen enthielten alle Lösungen mit Ausnahme der Substratlösung 1 mM CaCl₂. Die primären Antikörper wurden 1 : 2000 für Kaninchen-Antiseren und 1 : 1000 für humane Seren verdünnt.

[0056] Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Affinität gereinigten antikaninchen (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) oder antihumanen (TAGO Immunodiagnostic, Burlingame, CA) IgG alkalischen Phosphatase-Konjugaten, die in Verdünnungen von 1 : 2000 bzw. 1 : 5000 verwendet wurden, unter Verwendung von BCIP/NBT als Substrat nachgewiesen (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.). Die Immunoblotting-Reaktionen wurden mittels visuellem Vergleich von nicht rekombinannten und rekombinannten L1 Punktintensitäten beurteilt. Eine Reaktion wurde als positiv eingestuft, wenn die Farbintensität des rekombinannten L1 Punktes größer war als die Farbintensität des nicht rekombinannten Kontrollpunktes der ebenfalls auf demselben Streifen lag.

5. Antiseren

[0057] Das verwendete denaturierte L1 Antiserum wurde früher von Strike et al. in dem Artikel „Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen),“ 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, als Anti-pEX480 beschrieben. Dieses Antiserum wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit einem Gel gereinigtem bakteriell exprimierten Fusionsprotein gewonnen, das eine 160 Aminosäuresequenz enthielt, die aus der Mittelregion des offenen Leserahmens von HPV-6b L1 abgeleitet und an den Carboxy-Terminus der Betagalactosidase fusioniert worden war, wie dies von Stanley et al. in dem Artikel „Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: Identification of cDNA clones coding for human liver protein,“ 1984, EMBO J., Band 3, Seiten 1429–1434; und von Strike et al. in dem Artikel „Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the locati-

on of the (common antigen),“ 1989. J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555 beschrieben wird, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Diese Sequenz enthält das gewöhnliche Papillomavirus L1 Antigen, so wie von Strike et al. in dem Artikel „Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen),“ 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555, beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Das verwendete Kaninchenserum mit ganzen Viruspartikeln wurde von Bonnez et al. in dem Artikel „Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction,“ 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und durch die Immunisierung von Kaninchen mit gereinigten, nicht denaturierten HPV-11 Virionen produziert, die aus Vorhaut-Xenotransplantaten von athymischen Mäusen gewonnen worden waren, wie dies von Bonnez et al. in dem Artikel „Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction,“ 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380, und Kreider et al. in dem Artikel „Laboratory production in vivo of infectious human papillomavirus type 11,“ 1989, J. Virol., Band 61, Seiten 590–593 beschrieben wird, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Patientenserien wurden von solchen Personen gewonnen, bei denen Condyloma acuminatum mit Hilfe von Biopsien nachgewiesen worden war. Serumsproben, die bereits zuvor mit auf ganzen HPV-11 Viruspartikeln basierenden ELISA-Untersuchungen als positiv befunken worden waren, so wie von Bonnez et al. in dem Artikel „Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata,“ 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, wurden verwendet, um die Fähigkeit zu maximieren, gegen VLPs gerichtete Antikörper nachzuweisen. Kontrollseren wurden von Nonnen gewonnen, die zuvor erklärt hatten, bisher in ihrem Leben noch keinerlei sexuelle Kontakte gehabt zu haben. Diese Seren waren HPV-11 Antikörper-negativ, was durch den HPV-11 Partikelbasierten ELISA nachgewiesen wurde, so wie von Bonnez et al. in dem Artikel „Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata,“ 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.

6. Produktion und Reinigung von HPV-11 L1 virusähnlichen Partikeln

[0058] Rekombinante VLPs wurden direkt auf dem zellfreien Kulturüberstand von Sf-9 Zellsuspensionskulturen, die mit Ac11L1 infiziert worden waren, durch eine Reihe von Zentrifugationsschritten bei niedriger und bei hoher Geschwindigkeit gereinigt. Infizierte Sf-9 Zellen wurden auf einer 200 ml Suspensionskulatur bei niedriger Geschwindigkeit (1000 g) sedimentiert und der zellfreie Überstand wurde dann noch einmal bei hoher Geschwindigkeit (100.000 g) für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Das Hochgeschwindigkeitssegment wurde in Puffer A (50 mM Tris, pH 8,0, 1 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂; 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 10 µg/ml Leupeptin) resuspendiert, 5,2 g festes CsCl wurden zugegeben und das Endvolumen wurde mit frischem Puffer A (0,4 g/ml Endkonzentration) auf insgesamt 13 ml eingestellt. Nach einer Zentrifugation (100.000 g, 22 Stunden, 10°C) wurde die erhaltene einzelne Bande entfernt und mit 12 ml frischem Puffer A (ohne CxCl) verdünnt und erneut zentrifugiert (100.000 g, 90 min, 4°C) um die gereinigten VLPs zu sedimentieren. Die durch Saccharose Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten VLPs wurden nach Anfärben mit 2% neutral gepufferter Phosphor-Wolfram-Säure durch Elektronenmikroskopie identifiziert ([Fig. 2](#), [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#)).

BEISPIEL II

Expression und immunologische Detektion von rekombinantem HPV-11 L1 Protein in Sf-9 Zellen

[0059] Die SDS-PAGE-Bestimmungen der gesamten Proteine aus Sf-9 Zellen aus Insektenzellen, die mit dem rekombinanten Ac11L1 Virus infiziert worden waren, wiesen ein neues 55 kD Protein nach, das durch, Coomassie-blue Färbung in mit Ac11L1 infizierten Zellen zu sehen war ([Fig. 1A](#), Spur 3). In Bezug auf die [Fig. 1](#) (A und B), zeigt [Fig. 1A](#) ein Coomassie-gefärbtes SDS Polyacrylamid-Gel der Lysate von mit Wildtyp AcNPV und mit rekombinantem Ac11L1 infizierten Sf-9 Zellen und [Fig. 1B](#) zeigt einen Westernblot von Lysaten von mit Wildtyp AcNPV und mit rekombinantem Ac11L1 infizierten Sf-9 Zellen, der mit einem polyklonalem Kaninchen-Antiserum, das spezifisch für das gemeinsame HPV L1 Epitop ist, markiert worden war.

[0060] Die Lysate von mit nicht rekombinantem (Spuren 1, 2) und mit rekombinantem L1 infizierten (Spuren 3, 4) Sf-9 Zellen wurden in unlösliche (Spuren 1, 3) und lösliche (Spuren 2, 4) Fraktionen fraktionierte und auf 10%-igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Molekulare Referenzmarker (M_r) sind auf der linken Seite dargestellt und der Pfeil rechts zeigt die ungefähre Position von rekombinantem L1 (ungefähr 55 kD M_r) an. Dieses Protein ist in

Wildtyp AcNP Lysaten nicht vorhanden und wandert gemeinsam mit einem Protein, das sich als immunoaktiv ([Fig. 1B](#), Spuren 3 und 4) mit einem Kaninchenantiserum erweist, welches gegen das gewöhnliche lineare HPV L1 Antigen hergestellt wurde, so wie von Strike et al. in dem Artikel „Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen)“, 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. L1 immunoaktive Banden mit geringerem M_r wurden ebenfalls entdeckt und röhren möglicherweise von der Degradation des Vollängen L1 Produktes ([Fig. 1B](#), Spuren 3 und 4) her. Obwohl der überwiegende Teil des in diesem System produzierten L1 in der NP-40-unlöslichen Fraktion auftrat, waren näherungsweise 25 bis 30% in der NP-40-löslichen Fraktion ([Fig. 1B](#), Spur 4) vorhanden. Die maximale Ansammlung von L1 fand 72 Stunden nach der Infektion statt.

BEISPIEL III

Elektronenmikroskopische Visualisierung von VLPs

[0061] Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ gefärbten Präparationen von Saccharose gebandeten VLPs ([Fig. 2](#), [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#)) zeigten ausgeprägte VLPs. [Fig. 2](#) zeigt HPV-11 capsid-ähnliche Partikel, die an der 50–60%-Schnittstelle des Saccharose-Dichtegradienten vorhanden waren. [Fig. 6](#) zeigt HPV Typ 6b (HPV-6b) capsid-ähnliche Partikel, die von der Expression der HPV-6b L1 kodierenden Sequenz im Baculovirus-System her stammen und die nach exakt demselben Verfahren gereinigt wurden. [Fig. 7](#) demonstriert, dass dieses Verfahren auch geeignet ist, für die Produktion von HPV Typ 16 (HPV-16) VLPs, nach Expression der HPV-16 L1 kodierenden Sequenz. Die [Fig. 12](#) und [16](#) demonstrieren, dass VLPs auch durch Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt werden können. Die durch direkte Messung der VLPs in [Fig. 2](#) bestimmten Partikeldurchmesser lagen bei näherungsweise 52 nm. Diese Messung stimmt überein mit dem Durchmesser mit isolierten Papillomavirus-Virionen, so wie von Klug et al. in dem Artikel „Structure of viruses of the papilloma-polyoma type I: Human wart virus,“ 1965, J. Mol. Biol., Band 11, Seiten 403–423 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.

BEISPIEL IV

Immunoreaktivität von Insektenzellextrakten, die HPV-11 VLP enthalten, mit Kaninchen-Antisera

[0062] Die immunologischen Eigenschaften des rekombinanten L1 Proteins wurden unter Verwendung

von Kaninchenantiseren untersucht, die mit nativen oder denaturierten L1 Protein-Epitopen reagierten. Das Kaninchenantiserum pEX480, das gegen das gewöhnliche Papillomavirus-Antigen gerichtet ist, reagierte gut mit denaturiertem rekombinannten L1 in Westernblot-Bestimmungen, reagierte jedoch nicht mit derselben Antigen-Aufbereitung im Immunodotblot, einer Art von Immunbestimmung, bei der das Antigen unter nicht denaturierenden Bedingungen auf die Blotmembran platziert wird (**Fig. 3**, vgl. Streifen A). Im Gegensatz zu dem von Anti-pEX480 gezeigten Reaktivitätsmuster reagierte das gegen das ganze HPV-11 Viruspartikel erzeugte polyklonale Kaninchenantiserum nicht mit rekombinantem L1 im Westernblot, reagierte jedoch stark mit rekombinantem L1 in der Immunodotblot-Bestimmung (**Fig. 3**, vgl. Streifen C). Es handelte sich hierbei um eine spezifische Reaktion, was durch das Ausbleiben einer Reaktion in dem Post-Immunserum gegen die native, nicht rekombinante Kontrollaufbereitung gezeigt werden kann (**Fig. 3**, Feld B, Streifen C). Das Kaninchenantiserum pEX215 wurde in diese Immunbestimmungen mit einbezogen, um einen Vergleich der in den beiden Arten von Immunbestimmungen vorhandenen relativen Mengen an L1 zu erlauben. Der Grad der Immunoreaktivität des pEX215 Antiseraums mit rekombinantem L1 ist in beiden Ausführungsformen mehr oder weniger gleich (**Fig. 3**, Streifen B), wodurch angezeigt wird, dass die vorhandenen Mengen an L1 näherungsweise gleich sind. Des Weiteren deutet die Beobachtung, dass dieses Antiserum in der Lage ist, mit L1 in beiden Ausführungsformen zu reagieren, darauf hin, dass das lineare, immunreaktive, aminoterminale L1 Epitop bzw. die linearen, immunreaktiven, aminoterminalen L1 Epitope, das bzw. die von dem pEX215 Antiserum erkannt werden, nicht durch das Eingehen einer übergeordneten L1 Konformation verdeckt werden.

BEISPIEL V

Imunoreaktivität von Insektenzellextrakten, die VLP enthalten, mit humanen Seren

[0063] Um in humanen Seren die Verbreitung von Antikörpern, die gegen die linearen bzw. die konformativen Epitope gerichtet sind, zu bestimmen, wurden die Seren, die von Patienten erhalten worden waren, bei denen Condyloma acuminatum anhand von Biopsien nachgewiesen worden war, mit Hilfe von Westernblot- und Immunodotblot-Bestimmungen unter der Verwendung von VLPs als Antigen ausgewertet. Keines der Patienten- oder Kontrollseren zeigte Immunoreaktivität mit denaturiertem rekombinannten L1 im Westernblot (**Fig. 4**, Streifen D, O (Patienten) und P, X (Kontrollen)). Umgekehrt zeigten 11 von 12 Patientenserien (**Fig. 5**, Streifen D, O) wurden als positiv gewertet, mit Ausnahme von Streifen H) und 0 von 9 Kontrollserien (**Fig. 5**, Streifen P, X) Immunoreaktivität mit rekombinantem L1 im Immuno-

dotblot, ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ($p = 7 \times 10^{-5}$; Fisher's exact test). Dieses Ergebnis stimmt gut mit Ergebnissen überein, die zuvor unter Verwendung derselben Seren in einem auf HPV-11 Partikeln basierenden ELISA gewonnenen worden waren, wie von Bonnez et al. in dem Artikel „Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condyloma acuminata," 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.

BEISPIEL VI

ELISA-Untersuchung

[0064] CsCl-gereinigte VLPs wurden mit einem Spektrophotometer (A_{280}) quantifiziert und auf eine Konzentration von 8 ng/ μ l in kaltem PBS verdünnt. Teilmengen (100 μ l) entweder von PBS oder von verdünnter VLP Lösung (800 ng Gesamtprotein) wurden in die Vertiefungen geladen und die Platten über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer einprozentigen BSA-Lösung blockiert worauf die Zugabe der Antiseren in doppelter Ausfertigung in einer Verdünnung von 1 : 100 erfolgte. Die Reaktion mit den primären Antiseren wurde bei Raumtemperatur für 90 min durchgeführt. Die Platten wurden viermal gewaschen und der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Human-IgG-alkalisches Phosphatasekonjugat) wurde zugegeben (TAGO, 1 : 5000) und die Platten wurden bei Raumtemperatur für 90 min stehen gelassen. Jeder Vertiefung wurde Substrat zugegeben und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die spezifische Absorption wurde berechnet durch Subtrahieren der PBS-Absorption von der VLP Absorption jeder einzelnen Messung und durch Bestimmen des durchschnittlichen Absorptionswertes.

[0065] Die unter Verwendung der VLPs (**Fig. 8**) erhaltenen Ergebnisse waren äquivalent zu den zuvor in Zusammenhang mit einem ELISA-Test berichteten Ergebnissen, mit denselben Seren (von RRP-Patienten), bei dem ganze HPV-11 Viruspartikel als Antigen (50%) verwendet wurden. Eine gute Korrelation mit Ergebnissen von einem zuvor durchgeföhrten, auf ganzen Viruspartikeln basierenden ELISA ist in **Fig. 9** ($r^2 = 0,75$) dargestellt.

BEISPIEL VII

Westernblot- und Immunodotblot-Bestimmungen

[0066] Sf-9 Suspensionskulturen (100 ml) wurden entweder mit AcNPV (nicht rekombinante Kontrolle) oder mit Ac11L1 oder Ac16L1 rekombinannten Baculoviren infiziert, wie dies von Rose et al. in einem Artikel in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944 berichtet wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier

mit aufgenommen wird, und für 72 Stunden bei 27°C inkubiert. In Bezug auf **Fig. 11** wurden die Proben vorbereitet, elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunodotblot bestimmt, wie dies von Rose et al. in einem Artikel in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, und von Rose et al. in einem Artikel in 1990, J. Virol., Band 71, Seiten 2725–2729 beschrieben wird, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. VLPs waren bei beiden Verfahren zur Probenherstellung beinhaltet, was durch Elektronenmikroskopie verifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Proteingesamtkonzentrationen der Proben wurden vor der Verwendung mit Hilfe eines Spektrophotometers (A_{280}) equilibriert.

[0067] In Bezug auf **Fig. 10(a)** wurden die Proben (20 µg Gesamtprotein/Spur) in einem 10%-igen SDS Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über Nacht in einem Westernblot bestimmt, wie dies von Bonnez et al. in einem Artikel in 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Für den Nitrozellulose-Blot wurde das Kaninchenantiserum R5-409 in einer Verdünnung 1 : 1000 als Sonde verwendet, wie von Christensen et al. in einem Artikel in 1991, Virus Research, Band 21, Seiten 169–179 beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Wie in **Fig. 10(a)** (linkes Feld) gezeigt, wurden die rekombinanten HPV-11 L1 (Spur 2) und die rekombinanten HPV-16 L1 (Spur 3) Proteine in näherungsweise gleichen Mengen durch das gewöhnliche Anti-Papillomavirus L1 Epitop-Antiserum R5-409 bestimmt. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz für das HPV-16 L1 Protein ist um fünf Aminosäuren länger als die vorhergesagte Sequenz für das HPV-11 L1 Protein, was durch die für das rekombinante HPV-16 L1 Protein gezeigte, geringfügig langsamere Migrationsrate bestätigt wird.

[0068] In Bezug auf **Fig. 10(b)** wurden die Proben verdünnt (zweifach Verdünnungsreihen mit PBS hergestellt) und unter nicht denaturierenden Bedingungen auf Nitrozellulose aufgetragen, beginnend mit einer Gesamtproteinkonzentration von 25 µg (unten) und endend mit einer Gesamtproteinkonzentration von 25 ng (oben)). Das Kaninchen-Antiserum R-366 wurde in einer Verdünnung von 1 : 1000 verwendet. Im rechten Feld (d. h. der Immunodotblot) wies das Antiserum mit ganzen Viruspartikeln das native, rekombinante HPV-11 L1 VLP-Präparat über ein 1000-faches Verdünnungsintervall nach. Trotzdem zeigte dieses selbe hyperimmune Kaninchenantiserum keine Immunoreaktivität mit dem nativen rekombinanten HPV-16 L1 VLP-Präparat bei einer sogar noch höheren Antigenkonzentration (25 µg) als bei der für die Westernblot benutzten (20 µg).

[0069] Das hyperimmune Kaninchenantiserum, welches native HPV-11 Virionen neutralisiert, zeigte

keine Kreuzreaktion mit dem nativen HPV-16 L1 Protein, was darauf hin deutet, dass das bzw. die konformativen Epitope des HPV-11 Capsids, die von diesem Antiserum erkannt werden, sich immunologisch von den in dem HPV-16 VLP-Präparat vorhandenen konformativen Epitope unterscheiden.

BEISPIEL VIII

Western-Immunoblot-Bestimmung

[0070] Die VLPs wurden bestimmt in und direkt gereinigt aus dem Überstandsmedium einer mit Ac11L1 infizierten Sf-9 Zellsuspensionskultur (200 ml). Die Zellen wurden bei niedriger Geschwindigkeit (1000 g) sedimentiert und der zellfreie Überstand wurde dann bei hoher Geschwindigkeit (100.000 g) zentrifugiert. Zellen wurden durch Zentrifugation mit niedriger Geschwindigkeit (1000 g) entfernt und die VLPs wurden aus den Kulturüberständen gewonnen, wie dies von Rose et al. in dem Artikel „Human papillomavirus type 11 (HPV-11) virus-like particles (VLPs) induce the formation of neutralizing antibodies.“ (zur Publikation eingereicht.) 1993 beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Feld A zeigt ein 10%iges SDS Polyacrylamid-Gel, das mit Coomassie-blue gefärbt wurde. Feld B zeigt einen Western-Immunoblot eines identisch beladenen Gels, wobei als Sonde ein Kaninchenantiserum, welches spezifisch für das gemeinsame HPV Antigen ist, verwendet wurde, wie dies von Strike et al. in einem Artikel in 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555 beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, bei einer Verdünnung von 1 : 1000. Untersuchungen der Hochgeschwindigkeitssedimente, die aus den Überständen von mit nicht rekombinantem oder rekombinantem L1 infizierten Sf-9 Zellkulturen gewonnen worden waren, wiesen auf das Vorkommen auf VLPs in den mit rekombinantem L1 infizierten Überstandsfraktionen hin. Das resuspendierte Hochgeschwindigkeits sediment von rekombinantem L1 wurde durch Gleichgewichtsdichthegradienten-Zentrifugation gereinigt, wie dies von Bonnez et al. in einem Artikel in 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die durch dieses Verfahren erhaltene Einzelbande wurde mit einer sterilen Nadel der Dicke 18 entfernt, mit frischem Puffer A (50 mM Tris, pH 8,0; 1 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂; 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 10 µg/ml Leupeptin) auf ein Volumen von 12 ml verdünnt und erneut bei 100.000 g für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Resuspension des Sediments in 0,5 ml frischem Puffer A (50% Glycerol) wurde das Vorkommen in intakten HPV VLPs (**Fig. 12**) in einem mit 2%iger Phosphor-Wolfram-Säure negativ gefärbten Teil der Probe durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung bestimmt.

[0071] Wie zuvor beschrieben zeigten rekombinante VLPs Immunoreaktivität mit gegen ganze HPV-11 Viruspartikel gerichteten Antikörpern. (Siehe Rose et al. in einem Artikel in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. In dieser Studie immunisierten die Anmelder Kaninchen mit gereinigten VLPs und untersuchten die Post-Immunseren auf Immunoreaktivität mit ganzen Virionen. Weiße neuseeländische Kaninchen wurden intramuskulär an zwei Stellen mit einer 1 : 1 Emulsion von gereinigten VLPs (Schlangenlinie 20 µg Protein) in vollständigem Freund's Hilfsstoff (0,25 ml pro Stelle) immunisiert. Aufgefrischt wurde nach 30 Tagen mit einer unvollständigem Freund's Hilfsstoff hergestellten VLP Emulsion und die Immunseren wurden 14 Tage später gesammelt. Die Seren wurden entweder mit nativen HPV-11 Virionen oder mit rekombinanten VLPs in einer Dotblot-Immunbestimmung zur Reaktion gebracht, wie von Rose et al. in einem Artikel in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die immunologische Kreuzreaktivität der Anti-VLP-Antikörper mit ganzen Virionen, so wie in **Fig. 13** dargestellt, zeigt, dass die VLPs immunogen sind und das antigene Profil von infektiösen HPV-11 Virionen originalgetreu wiederzugeben scheinen. In Bezug auf **Fig. 13** wurden nicht denaturierte gereinigte Probenpräparate auf Nitrozellulose aufgetragen, wie von Rose et al. in einem Artikel in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944 beschrieben wird, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.

BEISPIEL IX

Neutralisierungsaktivität

[0072] Die Herstellung der infizierenden viralen HPV-11_{Hershey} Suspension (ursprünglich zur Verfügung gestellt von John Kreider, Department of Pathology and Microbiology and Immunology, The Milton S. Hershey Medical Center, Hershey, PA.) wurde von Bonnez et al. in einem Artikel in 1992., J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. In vier parallelen Experimenten wurden jeweils 450 µl der infizierenden viralen Suspension (Charge 4/90) bei 37°C für eine Stunde mit 50 µl (1 : 10 Endverdünnung) von entweder Prä-Immun-Anti-HPV-11-Serum (Gruppe 1), Post-Immun-Anti-HPV-11-Serum (Gruppe 2), Prä-Immun-Anti-VLP-Serum (Gruppe 3) oder Post-Immun-Anti-VLP-Serum (Gruppe 4) inkubiert. Bei den Gruppen 1 und 2 handelte es sich um Neutralisationskontrollen, die von Bonnez et al. in einem Artikel in 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben werden, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und bei den Gruppen 3 und 4 handelte es sich um Testgruppen. Die Präparation von menschlicher Vorhaut, die im Rahmen von Routinebeschneidungen operativ entfernt wurde,

wurde ebenfalls von Bonnez et al. in einem Artikel in 1991. J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die Vorhäute wurden in 1 × 1 mm große Quadrate geschnitten und eine kleine Zahl an Fragmenten von jeder verwendeten Vorhaut wurde schockgefroren und aufbewahrt. Die übrigen Fragmente wurden gleichmäßig in vier Gruppen aufgeteilt und jede Gruppe wurde am Ende der Inkubationsphase zu einer der vier viralen Suspensions-Serumsmixturen gegeben. Die Mixturen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Aus jeder experimentellen Gruppe wurde jeweils ein Vorhautfragment unter der Nierenkapsel jeder Niere von drei weiblichen, vier bis sechs Wochen alten athymischen nu/nu-Mäusen mit einem BALB/c Familienhintergrund platziert, die aus einem Wurf stammten, (Taconic Farms, Germantown, NY). Das Experiment wurde an einem anderen Tag mit einer anderen Vorhaut wiederholt. Somit wurden für jede experimentelle Gruppe insgesamt zwölf Transplantate platziert. Die Tiere wurden zwölf Wochen nach der Transplantation seziert, und zu diesem Zeitpunkt wurden die Transplantate entfernt und weiterbehandelt (siehe einen Artikel von Bonnez et al. in 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Mit Bezug auf **Fig. 14** wurden die Transplantate so wie hierin beschrieben, für die Untersuchungen vorbereitet und mit viralem Lysat infiziert, welches vorbehandelt war mit entweder (1) prä- und (2) post-immunen Kaninchenserien ganzer HPV-11 Viruspartikel oder mit (3) prä- und (4) post-immunen Kaninchenserien virusähnlicher HPV-11 L1 Partikel. Die vollen Kreise entsprechen dem ersten experimentellen Durchgang, die offenen Kreise entsprechen dem zweiten experimentellen Durchgang. Die horizontalen Balken zeigen den mittleren GMD an. Zum Vergleich der Transplantat-Größe wurde der geometrische mittlere Durchmesser (GMD) durch Bestimmen der Quadratwurzel aus dem Produkt von Länge, Breite und Höhe der zurück gewonnenen Transplantate berechnet.

[0073] Zum Zeitpunkt der Euthanasie fehlte jeweils ein Transplantat aus dem mit prä- und post-immunem Anti-HPV-11 Neutralisationskontrollgruppen. Somit standen aus jeder dieser Gruppen 11 Transplantate zur weiteren Analyse zur Verfügung (**Fig. 14**). Die mittleren [Bereich] GMDs (mm) der Transplantate in prä- bzw. post-immunen Kontrollgruppen lagen bei 2,9 [1,0, 4,9] bzw. 1,3 [1,0, 2,6]. Der Unterschied, 1,6 mm war statistisch signifikant ($P = 0,004$, Mann-Whitney U test). Alle zwölf implantierten Transplantate, sowohl aus den prä- als auch aus den post-immunen, mit Anti-VLP-Antikörpern behandelten Gruppen (**Fig. 4**) waren für weitere Untersuchungen verfügbar. Die mittleren [Bereich] GMDs (in mm) der Transplantate lagen bei 2,3 [1,3, 4,2] bzw. 1,0 [1,0, 1,8]. Der Größenunterschied, 1,3 mm, war statistisch signifikant. ($p < 10^{-4}$). Obwohl der Un-

terschied der Transplantatgrößen zwischen dem ersten und dem zweiten Experiment in der Prä-Immungruppe nicht statistisch signifikant war ($P = 0,62$), war er hingegen in der Post-Immungruppe signifikant ($P = 0,007$). Deshalb verglichen die Anmelder die Unterschiede der Transplantatgrößen zwischen den prä- und den post-immunen, mit Anti-VLP-Antikörper behandelten Gruppen innerhalb jedes Wiederholungsexperiments. Beide waren statistisch signifikant ($P = 0,002$ bzw. $P = 0,04$, für die erste bzw. die zweite Wiederholung).

BEISPIEL X

Quelle der viralen DNAs

[0074] Die Quelle der genomischen HPV-11 DNA (siehe einen Artikel von Bonnez et al. in 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) und die Konstruktion des rekombinanten Ac11L1 Baculovirus (siehe einen Artikel von Rose et al. in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) wurde beschrieben. Die genomische HPV-16 Sequenz wurde aus einer CIN III Läsion wieder gewonnen und Standardklonierungsverfahren wurden zur Konstruktion des Ac16L1 Baculovirus verwendet (Chesters and McCance, nicht veröffentlichte Daten). Die HPV-18 L1 Sequenz wurde durch Polymerase-Kettenreaktion aus dem HPV-18 Prototyp (zur Verfügung gestellt von H. zur Hausen) herausamplifiziert und zur Konstruktion des Ac18L1 Baculovirus mit demselben Verfahren, das für die Konstruktion von Ac11L1 verwendet worden war, verwendet (siehe einen Artikel von Rose et al. in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird).

BEISPIEL XI

Reinigung von rekombinanten VLPs

[0075] Rekombinante VLPs wurden gereinigt wie im Artikel von Rose et al., „Human papillomavirus type 11 (HPV-11) virus-like particles (VLPs) induce the formation of neutralizing antibodies and detect genital HPV-specific antibodies in human sera“, 1993, im Druck, beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Einzelbanden, die gereinigte HPV-11, HPV-16 oder HPV-18 VLPs enthielten, wurden mit Spritzen aus CsCl-Dichtegradienten entfernt, mit Puffer A (Phosphat-gepufferte Saline (PBS); 1 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) auf 12 ml verdünnt und bei 1000 g für 90 min bei 4°C sedimentiert. Die Sedimente wurden in 200 µl Puffer A, der 50% Glycerol enthielt, resuspendiert, spektrophotometrisch (280 nm) quantifiziert und bei -20°C gelagert. Rekombinante L1 Proteine wurden durch SDS-PAGE und

Westernblot-Immuno-Bestimmungen untersucht wie zuvor beschrieben (siehe den Artikel von Rose et al. in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.) Proben, die 5 µg gereinigter HPV-11, -16 oder -18 VLPs enthielten, wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblotet und mit gewöhnlichem Anti-Papillomavirus-L1-(Anti-PVL1)-Antigen-Kaninchenserum als Sonde behandelt, so wie zuvor beschrieben (siehe die Artikel von Strike et al. in 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555; und von Rose et al. in 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 1936–1944, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird.) Die vorhergesagten kodierenden Kapazitäten der offenen Leserahmen (ORF) von HPV-11, -16 und -18 L1 umfassen 501 Aminosäuren (siehe den Artikel von Dartmann et al. in 1986, Virology, Band 151, Seiten 124–130, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), bzw. 505 Aminosäuren (siehe den Artikel von Seedorf et al. in 1985, Virology, Band 145, Seiten 181–185, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), bzw. 507 Aminosäuren (siehe den Artikel von Cole et al. in 1987, J. Mol. Biol., Band 193, Seiten 599–608, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) und eine immunoreaktive L1 Bande der zu erwartenden Größe (Schlangenlinie 55 kD M_r) taucht bei jedem der drei Probenpräparate, die in der Westernblot-Immuno-Bestimmung getestet wurden auf ([Fig. 15](#)). Immunoreaktive L1 Proteine mit geringerem molekularem Gewicht wurden bei Westernblot-Immuno-Bestimmungen der CsCl-gereinigten VLP-Präparate ebenfalls festgestellt ([Fig. 15](#)) und es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Abbauprodukte des Vollängen-L1-Proteins, da relative Mengen dieser Proteine in nachfolgenden Untersuchungen variierten (Daten nicht gezeigt). Die wichtigsten immunoreaktiven ~55 kD M_r L1 Banden in jeder der Proben variierten jedoch nicht, weder in ihrer Mobilität, noch in ihren relativen Mengen (Daten nicht gezeigt). Elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Proben (negativ gefärbt mit zweiprozentiger Phosphor-Wolfram-Säure) bestätigten die VLP-Formation in den HPV-11 ([Fig. 16A](#)), HPV-16 ([Fig. 16B](#)) und HPV-18 ([Fig. 16C](#)) VLP-Präparaten.

BEISPIEL XII

Zubereitung von Kaninchen-VLP-Immunseren und Bedingungen des ELISA

[0076] HPV-11, HPV-16 und HPV-18 L1 VLP Kaninchen-Immunseren wurden durch intramuskuläre Immunisierung von jeweils zwei weißen Neuseeland-Kaninchen an jeweils zwei Stellen mit jedem der VLP-Präparate gewonnen (d. h. sechs Kaninchen wurden immunisiert), unter Verwendung zuvor beschriebener Verfahren (siehe die Artikel von Bonnez et al. in 1992, J. Infect. Dis., Band 165, Seiten 376–380 und von Rose et al. in 1993, J. Virol., Band

67, Seiten 1936–1944, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Gewöhnliches PVL1 Anti-Kaninchenantigen (siehe den Artikel von Strike et al. in 1989, J. Gen. Virol., Band 70, Seiten 543–555, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), ganze HPV-11 Virionen (siehe den Artikel von Bonnez et al. in 1992, J. Infect. Dis., Band 165, Seiten 376–380, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), und HPV-11, -16 und -18 VLP Antiseren wurden mit ELISA gegen die drei rekombinannten VLP-Präparate ([Fig. 17](#)) getestet. Für diesen ELISA wurden gereinigte VLPs auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l in PBS verdünnt und Teilmengen, die näherungsweise 1 μ g Antigen enthielten, oder PBS alleine wurden abwechselnd auf die Reihe von 96-well ELISA Platten verteilt. Die Bedingungen für diese Bestimmung entsprachen exakt den zuvor beschriebenen (siehe den Artikel von Rose et al., „Human papillomavirus type 11 (HPV-11) virus-like particles (VLPs) induce the formation of neutralizing antibodies and detect genital HPV-specific antibodies in human sera“, 1993 im Druck, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), mit der Ausnahme, dass die primären Antiseren vor der Untersuchung mit dem in Blockierlösung (2% v/v) verdünnten Lysat von nicht rekombinannten (AcNPV), mit Baculoviren infizierten Sf-9 Zellen vor-absorbiert wurden. Alle Antiseren wurden zweifach getestet, bei zahlreichen Gelegenheiten, in Verdünnungen, die von 1 : 1000 bis zu 1 : 128.000 reichten. Die in [Fig. 17](#) gezeigten Absorptionswerte für alle Kaninchen-Anti-VLP-Antiseren wurden bei der für diese Antiseren optimalen Verdünnung von 1 : 16.000 gemessen.

[0077] Die Absorptionswerte für das gewöhnliche Anti-PVL1-Antigen und das ganze HPV-11 Virionen Kaninchenantiserum wurden bei geringeren Verdünnungen ermittelt (1 : 1000). Die spezifischen Absorptionswerte wurden bestimmt, indem die Kontrollwerte (PVS-Vertiefungen) von den experimentellen Werten (Antigen enthaltende Vertiefungen) für jeden Durchgang subtrahiert wurden und mittlere (405 nm) Absorptionswerte wurden bestimmt.

BEISPIEL XIII

VLP ELISA

[0078] VLPs wurden in ELISA Immunobestimmungen getestet, um ihre Fähigkeit zur Detektion spezifischer Antikörper in Patientenserien bewerten zu können und die Ergebnisse wurden mit zuvor erhaltenen Ergebnissen verglichen, die unter Verwendung derselben Seren in einer ganzen HPV-11 Virionen ELISA Immunobestimmung erhalten worden waren (siehe den Artikel von Bonnez et al. in 1993, J. Med. Virol., Band 39, 340–344, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Das Antigen wurde in Phosphatgepufferter Saline (PDS) verdünnt, um eine Menge zu erhalten, die der Menge der vorangegan-

genen ganze Virionen ELISA gleich war (siehe den Artikel von Bonnez et al. in 1993, J. Med. Virol., Band 39, 340–344, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) und entweder die Antigenlösung oder PBS ohne jedes Antigen wurden abwechselnd in Reihen von 96-well Platten in Teilmengen aufgeteilt. Nach Beschichtung für 16 Stunden bei 4°C wurden diese Lösungen abgesaugt und die Vertiefungen mit Verdünnungsmittel/Blockierlösung (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) 2 Stunden lang bei Raumtemperatur blockiert. Eine Gesamtzahl von 59 humanen Seren (43 Patienten, 16 Kontrollen), die zuvor ganze HPV-11 Virusartikel ELISA getestet worden waren (siehe den Artikel von Bonnez et al. in 1993, J. Med. Virol., Band 39, 340–344, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) wurden 1 : 100 in Verdünnungsmittel/Blockierlösung verdünnt und 100 μ l Teilmengen wurden in die Vertiefungen gegeben, die entweder mit PBS allein oder mit Antigenlösung behandelt worden waren (je zwei Ansätze pro Serumsprobe). Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert und anschließend viermal gewaschen (Waschlösung, Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). anti-human-IgG-alkalisches Phosphatasekonjugat (100 μ l Teilmengen, 1 : 5000 verdünnt, TAGO, Burlingame, CA), wurde in jede Vertiefung zugegeben und die Platten wurden bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert. Die Platten wurden viermal gewaschen und mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase (p-Nitrophenylphosphat in Dietanolamin-Puffer) entwickelt. Die spezifische Absorption bei 405 nm für jede Serumsprobe wurde berechnet indem der von den PBS behandelten Vertiefungen erhaltene Wert von dem von den antigenbeschichteten Vertiefungen erhaltenen Wert für jeden Ansatz subtrahiert wurde und es wurde die mittlere Differenz für jeden Ansatz berechnet. In dem hier an anderer Stelle beschriebenen ELISA mit ganzen Virionen wurden 42 Patientenserien (sowie 20 Kontrollserien) auf Veränderungen des Capsid-Antikörnerniveaus während des Verlaufs der Behandlung untersucht (siehe den Artikel von Bonnez et al. in 1993, J. Med. Virol., Band 39, 340–344, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Alle in der vorliegenden ELISA-Studie getesteten Seren wurden zu Beginn der vorangegangenen Studie gesammelt. Eines der in der vorangegangenen Studie analysierten Patientenserien wurde von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, aus Gründen, die mit dem Ergebnis der Behandlung, nicht aber mit dem Ergebnis der Immunobestimmung zu tun hatten. Da jedoch der Absorptionswert für dieses Serum zur Verfügung stand, wurde das Serum in die vorliegende Bestimmung miteinbezogen, was die Anzahl der untersuchten Patientenserien in der vorliegenden ELISA-Studie auf 43 erhöhte. Die Zahl der analysierten Kontrollserien wurde aufgrund logistischer Überlegungen, die die Bestimmung betreffen, von 20 auf 16 reduziert.

[0079] Die mittlere [Bereich]-Seroreaktivität der 16 Kontrollseren, als OD-Wert ausgedrückt, war 0,005 [-0,029, 0,025], in Vergleich zu 0,024 [-0,063, 0,512] bei den 43 Patientenserien, ein statistisch signifikanter Unterschied ($P = 0,01$; Mann-Whitney U test). Unter Verwendung des höchsten OD-Wertes in der Kontrollgruppe als Schwellenwert lag die Sensitivität der Bestimmung bei 49% ($P = 2 \times 10^{-4}$; Fisher's exact test). Folglich war der HPV-11 VLP ELISA geeignet, um zwischen Patienten mit Condyloma acuminatum und zwischen Kontrollen zu unterscheiden. Darüber hinaus gab es eine exzellente Korrelation (Pearson's product-moment $r = 0,87$; $P < 10^{-6}$) zwischen Proben-Seroreaktivitäten mit dem HPV-11 VLP ELISA und dem HPV-11 Virion ELISA, wenn alle Seren mit einbezogen wurden oder wenn nur die 21 im HPV-11 VLP ELISA positiven Seren in Betracht gezogen wurden ($r = 0,87$; $P < 10^{-6}$).

ERGEBNISSE

[0080] Die immunologischen Beobachtungen lassen vermuten, dass rekombinantes L1 eine native Konformation annimmt. Das gegen das denaturierte gemeinsame L1 Antigen erzeugte Kaninchen-Antiserum zeigte ausschließlich mit denaturiertem rekombinannten L1 Immunoreaktivität (d. h. im Westernblot), wohingegen das gegen nicht denaturierte ganze Viruspartikel erzeugte Kaninchenantiserum ausschließlich mit nicht denaturiertem rekombinantem L1 reagierte (d. h. im Immunodotblot). Darüber hinaus reagierten humane Seren von Condyloma acuminatum Patienten, die in einem ELISA laut Bonnez et al., "Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata," 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347, mit HPV-11 Virionen Reaktivität gezeigt hatten, ebenfalls mit nicht denaturiertem HPV-11 rekombinannten L1 ([Fig. 4](#), [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#)). Es scheint daher so zu sein, dass die konformativen Epitope der VLPs der Erfindung den in nativen HPV-11 Virionen vorhandenen ähnlich sind, die vom humanaen Immunsystem während einer natürlichen Infektion erkannt werden. Mehrere Studien über die Papillomavirus-Serologie zeigen, dass die Ausprägungen von Antikörpern gegen konformative Epitope gute Indikatoren für Papillomavirus-Infektionen sind (Bonnez et al., „Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata,” 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347; Bonnez et al., „Evolution of the antibody response to human papillomavirus type 11 (HPV-11) in patients with condyloma acuminatum according to treatment response,” 1991^a, J. Med. Virol., 1991, im Druck; Bonnez et al., „Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction,” 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380; Christensen et al., "Detection of human

serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions," 1992, J. Gen. Virol., Band 73, Seiten 1261–1267; Kienzler et al., "Humoral and cell-mediated immunity to human papillomavirus type 1 (HPV-1) in human warts," 1983, Br. J. Dermatol., Band 108, Seiten 665–672; und Steele et al., "Humoral assays of human sera to disrupted and nondisrupted epitopes of human papillomavirus type 1," 1990, Virology, Band 174, Seiten 388–398. Der Inhalt aller dieser Artikel wird durch Bezugnahme hier mit aufgenommen.). Diese Ausprägungen können auch bei der viralen Pathogenese eine signifikante Rolle spielen. Zum Beispiel neutralisiert ein gegen ganze HPV-11 Partikel gerichtetes Kaninchenantiserum die HPV-11 Ansteckungsfähigkeit (Bonnez et al., „Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction,” 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380; und Christensen et al., "Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomavirus," 1990, J. Virol., Band 64, Seiten 3151–3156). Des Weiteren berichteten Christensen et al., "Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions," 1992, J. Gen. Virol., Band 73, Seiten 1261–1267; unter Verwendung humaner Seren einen Zusammenhang zwischen Antigenen HPV-11 Virionen-Antikörpern und neutralisierender Serumsaktivität. Der Nachweis solcher Antikörper mit den rekombinannten L1 VLPs der vorliegenden Erfindung kann sowohl diagnostisch als auch funktionell von Bedeutung sein.

[0081] Wenn man den Aufbau des rekombinanten Baculovirus in Betracht zieht, so hatten manche der frühen von den Anmeldern konstruierten rekombinanten Baculoviren die richtige L1 kodierende Sequenz, produzierten aber keine nachweisbaren Peptidgel an L1 Proteinen. Dies veranlasste die Anmelder, die 3' untranslatierten Regionen von HPV-11 und mehrere andere HPV L1 kodierenden Sequenzen zu betrachten. Es wurde festgestellt, dass sich eine Pentanukleotid-mRNA-Degradationssignalsequenz, AUUUA, (Shaw G. und Kamen R., „A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation,” Cell, 1986, Band 46, Seiten 659–67; Cole MD und Mango SE., "cis-acting determinants of c-myc mRNA stability", 1990, Enzyme, Band 44, Seiten 167–80; Shyu AB et al., "Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay," Genes & Development, 1991, Band 5, Seiten 221–31; Savant-Bhonsale S. und Cleveland DW., "Evidence for instability of mRNAs containing AUUUA motifs mediated through translation-dependent assembly of a 20S degradation complex," Genes & Development, 1992, Band 6, Seiten 1927–37. Der Inhalt aller dieser Artikel wird durch Bezugnahme hier mit aufgenommen), in einem Abstand von 30 Nukleotiden vom Stopkodon der HPV-11 L1 kodieren-

den Sequenz befand und dass darüber hinaus die anderen in Betracht gezogenen HPV-Typen ebenfalls eine AUUUA Sequenz in der Nähe des L1 Stopkodons besaßen. Wenn diese Sequenz entfernt oder eine Mutation eingeführt werden könnte, würde dadurch das Expressionsniveau des L1 Proteins erhöht werden. Deswegen wurden PCR-Primer entworfen, zur Amplifikation der L1 kodierenden Sequenz aus HPV-11 genomicscher DNA, die nicht nur dazu in der Lage waren, Schnittstellen für Restriktionsenzyme zum Klonieren einzufügen, sondern auch gleichzeitig die AUUUA Pentanukleotidsequenz 30 Nukleotide stromab des L1 Stopkodons mutierten. Eine Vermehrung dieses Klons in großem Maßstab führte zur Produktion extrem großer Mengen des L1 Proteins. In Berichten über die Verwendung des BEVS-Systems wurden Angaben über das Produktionsniveau des rekombinanten Proteins in einem Bereich von 300–500 mg/Liter in der Zellkultur gemacht. In der vorliegenden Erfindung waren die Produktionsniveaus für das rekombinante L1 Protein wesentlich höher, etwa bei 600–800 mg/Liter, möglicherweise aufgrund der Entfernung der L1 Degradationssignalsequenz in der 3' untranslatierten Region.

[0082] Diese Ergebnisse zeigen, dass unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen Post-Immunsenser aus Kaninchen, die mit HPV-11 VLPs immunisiert wurden, eine HPV-11 Infektion von huminem Gewebe genauso effektiv abwenden können wie Seren, die aus mit ganzen HPV-11 Virionen geimpften Kaninchen gewonnen wurden. Diese Abwenden der Infektion, das mit den entsprechenden Prä-Immunsenser nicht zu beobachten gewesen war, wurde mit dem Nicht-Stattfinden der Expression früher viraler Gene in Verbindung gebracht. Somit entsprach der Effekt der klassischen viralen Neutralisierung, d. h. die Unterbindung der Viruspenetration oder Decapsidierung (Dimmock, 1993, Neutralization of Animal Viruses. Berlin: Springer-Verlag. Der Inhalt dieses Artikels wird durch Bezugnahme hier mit aufgenommen).

[0083] Um durch Analyse der viralen Genexpression eine Bestätigung für die HPV-11 Neutralisierung zu liefern, wurden alle Transplantate auf die Anwesenheit des E1^E4 gespliceten HPV-11 mRNA-Transkript untersucht (Daten nicht gezeigt), so wie zuvor von Bonnez et al. in einem Artikel in 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Die E1^E4 mRNA wurde in 10/12 (83%) und in 0/12 (0%) der Transplantate aus Gruppen, die mit prä- bzw. post-immunen VLP Seren vorbehandelt worden waren, nachgewiesen ($p < 10^{-4}$). Ähnlich dazu wurde in den mit prä- bzw. post-immunen Anti-ganze-Virionen-Seren vorbehandelten Kontrollgruppen E1^E4 mRNA in 8/11 (73%) und 0/11 (0%) der Transplantate nachgewiesen ($p = 10^{-3}$). Diese Ergebnisse zeigen an, dass eine Behandlung des viralen Inoculum mit

dem post-immunen VLP Serum in Zusammenhang mit einer merklichen Inhibition des Wachstums der Transplantate sowie der viralen Genexpression steht, Effekte, die im Einklang mit Immunneutralisierung stehen. Folglich können rekombinante VLPs eine neutralisierende Antwort auslösen, die in ihrer Größenordnung der Antwort entspricht, die man durch die Immunisierung mit einem infektiösen Virus erhalten hätte.

[0084] Die HPV 16 L1-L2 VLPs, von Zhou et al. in einem Artikel in 1991, Virology, Band 185, Seiten 251–257 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, variierten in ihrer Größe und waren kleiner (35–40 nm im Durchmesser), sowohl als die HPV Virionen (50–55) als auch als die von Baculoviren produzierten HPV 11 VLPs (50–55 nm; siehe einen Artikel von Rose et al., im Druck, 1993, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Diese morphologischen Eigenschaften unterscheiden sich deutlich von denen der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen VLPs.

[0085] Des Weiteren ist, unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung, das HPV L1 Protein allein ausreichend für die Bildung von Partikeln, deren biophysikalische Merkmale und antigene Eigenschaften genau die von nativen HPV Virionen widerspiegeln.

[0086] Unter Verwendung eines ähnlichen Ansatzes berichtete Kirnbauer et al. die BPV-1 vermittelte Inhibition der Transformation von Maus C127 Zellen in vitro durch anti-BPV-1 VLP Antikörper (Siehe einen Artikel von Kirnbauer et al. in 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 89, Seiten 12180–12184, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Die in diesem System erzielten Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse, von denen in der vorliegenden Erfindung berichtet wird, in der die Anmelder die Neutralisierung unter Verwendung eines genitalen HPV und seines normalen Zielgewebes gezeigt haben. Obwohl von Übereinstimmungen der Ergebnisse der BPV-1/C127 Zellbestimmung und des athymischen Maus-Rinder-Fetal-Haut-Fremdtransplantationssystems berichtet wurde, so wie zuvor von Ghim et al. in einem Artikel in 1993, Int. J. Cancer, Band 49, Seiten 285–289 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, so ist das BPV-1/C127 Maus-Fibroblastensystem nicht-produktiv und deshalb kann Neutralisierung nur von der Abwesenheit transformierter Foci in vitro abgeleitet werden. Darüber hinaus infiziert BPV-1 in der Natur Mäuse nicht und der Mechanismus, mit dem es sich Zugang zu C127 Zellen verschafft, unterscheidet sich möglicherweise von dem Mechanismus, der bei einem natürlichen Infektionsvorgang eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu beruht das in der vorliegenden Studie verwendete athymische Mausmodell darauf, dass ein genitaler HPV sein natürliches Zielgewebe

infiziert, so wie zuvor von Kreider et al. in einem Artikel in 1985, Nature, Band 317, Seiten 639–641 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, das infizierte Transplantat wird in vivo beibehalten und sowohl die morphologische als auch die histologische Transformation des infizierten Transplantats wird von der Produktion infektiöser Vironen begleitet. (Siehe einen Artikel von Kreider et al. in 1987, J. Virol., Band 61, Seiten 590–593, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Die durch Antikörper vermittelte Hemmung des Transplantatwachstums, wie sie zuvor in den Artikeln von Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380; Christensen et al., 1990, J. Virol., Band 64, Seiten 3151–3156; Christensen et al., 1991, Virus Research, Band 21, Seiten 169–179; Christensen et al., 1990, J. Virol., Band 64, Seiten 5678–5681; und Christensen et al., 1992, J. Gen. Virol., Band 73, Seiten 1261–1267, beschrieben wurde, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, und die immunocytochemischen und molekularbiologischen Nachweise der Hemmung viraler Genexpression wurden gut dokumentiert, wie zuvor in den Artikeln von Bonnez et al. in 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347; und von Bonnez et al. in 1992, J. Inf. Dis., Band 165, Seiten 376–380 beschrieben, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird. Deswegen können Beobachtungen, die im athymischen Maussystem gemacht wurden, in präziserer Art und Weise die Abläufe widerspiegeln, die bei einer natürlichen Infektion stattfinden.

[0087] Es wurden bereits neutralisierende Antikörper gegen HPV-11 in Menschen mit condyloma acuminatum identifiziert, so wie zuvor von Christensen et al. in einem Artikel in 1992, J. Gen. Virol., Band 73, Seiten 1261–1267 beschrieben, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird, doch ist deren biologische Signifikanz nicht bekannt. Wenn die Neutralisierung sich als schützender immunologischer Wirkmechanismus gegen Papillomavirus-Infektionen in vivo erweisen sollte, dann könnte die Immunisierung mit rekombinanten VLPs Individuen, die dem Risiko einer Infektion ausgesetzt sind, schützende Immunität verleihen. Die Ergebnisse der Ansteller lassen vermuten, dass das Ausmaß der neutralisierenden Aktivität der HPV-11 VLP-Antikörper ähnlich dem von Antikörpern ist, die spezifisch für infektiöse HPV-11 Vironen sind. Deshalb scheinen VLPs gut geeignete Kandidaten für Impfstoffe zu sein. Jedoch ist der Grad der Kreuzreaktivität von konformativen Capsiddeterminanten zwischen verschiedenen HPV-Typen bis jetzt noch nicht bekannt und möglicherweise gering, so wie zuvor beschrieben von Gissmann et al., 1977, Virology, Band 76, Seiten 569–580; Gross et al., 1983, Oncogenic Viruses, Pergamon Press, New York; Hagensee et al., 1993, J. Virol., Band 67, Seiten 315–322; Howley et al., „Papillomavirinae and their replication“, Kapitel. 58, p. 1625–1650, in B. N. Fields and D. M. Knipe (ed.), Vi-

rology, zweite Auflage, Band 2. Raven Press, New York (1990); Kirnbauer et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 89, Seiten 12180–12184; Kreider et al., 1987, J. Virol., Band 61, Seiten 590–593; Kreider et al., 1985, Nature, Band 317, Seiten 639–641; und Ort et al., 1977, J. Virol., Band 24, Seiten 108–120. Der Inhalt all dieser Veröffentlichungen wird durch Bezugnahme hier mit aufgenommen. Die vollständige Charakterisierung des Potentials rekombinanter VLPs zur Verwendung als Immunogene für die Vorbeugung genitaler HPV Erkrankungen wird weitere Untersuchungen erforderlich machen, die von anderen genitalen HPV-Typen abgeleitete VLPs mit einbinden. Es wird von entscheidender Bedeutung sein, festzustellen, ob Antikörper gegen heterologe Genitale (HPV VLPs) in der Lage sein werden, HPV-Infektionen zu neutralisieren.

[0088] In Bezug auf [Fig. 17](#) reagierten ganze HPV-11 Viruspartikel (B) und HPV-11 VLP Antiseren (C, D) stark mit HPV-11 VLPs, jedoch reagierte keines dieser Antiseren mit den HPV-16 oder HPV-18 VLP-Präparaten. In ähnlicher Weise reagierten die HPV-16 (E, F) und die HPV-18 (G, H) L1 VLP Kaninchen-Antiseren nur mit homotypischen VLPs. Die jeweilige Spezifität dieser Reaktionen wurde durch Prä-Absorptionsexperimente verifiziert, in denen die Immunoreaktivität jedes Kaninchen VLP Antiserums zwar durch Prä-Absorption mit homotypischen, jedoch nicht mit heterotypischen VLPs außer Kraft gesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Keines der Kaninchen-Prä-Immunsenser reagierte mit einem der VLP-Präparate (Daten nicht gezeigt). Das Antiserum mit dem gemeinsamen Anti-PVL1-Antigen, welches gut mit rekombinanten L1 Proteinen im Westernimmunoblot reagierte ([Fig. 15](#)), reagierte nur sehr wenig mit nativen VLP-Präparaten im ELISA ([Fig. 17A](#)). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die normalerweise von diesem Antiserum erkannten Epitope unter den Bedingungen der ELISA-Bestimmung maskiert werden und dass die getesteten L1 Proteine in dieser Bestimmung überwiegend nicht denaturiert sind.

[0089] Die vorliegende Erfindung hat gezeigt, dass die L1 VLP Epitope von HPV-11, -16 und -18 sich antigenisch unterscheiden. Obwohl L2 Capsid-Proteine in diesen VLP-Präparaten nicht vorkamen, ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete antigenische Differenz zwischen HPV-Typen sich auch auf Vironen bezieht. L2 stellt näherungsweise 10% des gesamten Proteingehalts von HPV Partikeln dar (siehe einen Artikel von Doorbar et al. in 1987, J. Virol., Band 61, 2793–2799, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) und, obwohl sein genauer Aufenthaltsort im Partikel bisher noch nicht bestimmt werden konnte (siehe einen Artikel von Baker et al. in 1991, Biophysical J., Band 60, Seiten 1445–1456, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), haben neueste Untersuchungen gezeigt, dass es für den Einbau der DNA in

das Capsid nötig sein könnte (siehe einen Artikel von Zhou et al. in 1993, J. Gen. Virol., Band 74, Seiten 763–768, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird) und dass eine im mehr oder weniger konservierten, aminoterminalen Teil der HPV-16 L2 Aminosäuresequenz vorhandene Domäne unspezifische DNA-Bindung ermöglicht (siehe einen Artikel von Zhou et al. in 1994, J. Virol., Band 68, Seiten 619–625, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Obwohl der Rest der L2 Aminosäuresequenz unter Papillomaviren sehr heterogen ist (siehe einen Artikel von Danos et al. in 1990, J. Invest. Dermatology, Band 83, Seiten 7–11, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird), ist nicht klar, ob L2 spezifische Antikörper mit intakten Virionen reagieren (siehe die Artikel von Komly et al. in 1986, J. Virol., Band 60, Seiten 813–816; und Hagansee et al. in 1993, J. Virol., voll 67, Seiten 315–322, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Somit wird nicht erwartet, dass das L2 Protein die Ergebnisse der vorliegenden Studie wesentlich beeinflusst.

[0090] Vorangegangene Studien haben angezeigt, dass verschiedene HPV-Typen voneinander durch Verwendung serologischer Verfahren unterschieden werden können. So wurden z. B. Antikörper, die mit Plantarwarzen-Virionen reagieren, wesentlich häufiger in Seren von Patienten mit Plantarwarzen gefunden, als in Seren von Patienten mit entweder gewöhnlichen, flachen, anogenitalen oder Kehlkopfwarzen (siehe die Artikel von Pfister & zur Hausen in 1978, Int. J. Cancer, Band 21, Seiten 161–165; von Kienzler et al. in 1983, Brit. J. Dermatology, Band 108, Seiten 665–672; und von Viac et al. in 1990, J. Med. Virol., Band 32, Seiten 18–21, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Anisimova et al., 1990, haben außerdem direkt mit Immuno-Elektronenmikroskopie gezeigt, dass sich HPV-1 und HPV-2 antigenisch voneinander unterscheiden. Trotzdem scheint es auch so zu sein, dass andere HPV-Typen antigenisch miteinander verwandt sind. So wurde z. B. der Nachweis von Antikörpern, die spezifisch HPV-11 Virionen erkennen, in Seren von Patienten, die nachweislich mit HPV-6 infiziert waren, zuvor berichtet (siehe die Artikel von Bonnez et al. in 1991, J. Gen. Virol., Band 72, Seiten 1343–1347; und von Bonnez et al. in 1992, Virol., Band 188, Seiten 384–387, deren Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Da von den meisten HPV-Typen TPV Virionen nicht verfügbar sind, sind VLPs zum gegenwärtigen Zeitpunkt das beste Werkzeug, um die antigenische Verwandtschaft unter HPVs zu untersuchen. Antigenische Unterschiede unter HPV-Typen spiegeln sehr wahrscheinlich die genetische Diversität innerhalb der L1 kodierenden Sequenz wieder. Chan et al. haben einen phylogenetischen Papillomavirus-Stammbaum konstruiert, der auf der genetischen Divergenz innerhalb einer definierten Region der Papillomavirus L1

Aminosäuresequenz basiert (siehe einen Artikel von Chan et al. in 1992, J. Virol., Band 66, Seiten 5714–5725, dessen Inhalt durch Bezugnahme hier mit aufgenommen wird). Ihre Arbeit zeigt das relativ nahe evolutionäre Verhältnis zwischen HPV-6 und HPV-11, das mit einer möglichen Kreuzreakтивität zwischen den HPV-6- und -11 Capsiden im Einklang steht. Auf der anderen Seite wird erwartet, dass HPV-16 und HPV-18, die sich in ihren L1 Sequenzen sehr stark auseinander entwickelt haben, nur wenig antigene Kreuzreakтивität untereinander oder mit HPV-11 zeigen werden. Diese Vorhersagen stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Erfindung überein.

[0091] Die biologische Relevanz der antigenischen Variabilität des HPV Capsids ist unbekannt, die Diversität des Capsid-Proteins könnte jedoch die Gewebsspezifität der Papillomaviren ausmachen. Die Verfügbarkeit rekombinanter VLPs von einer Vielzahl von Papillomaviren könnte sich als nützlich für die Identifikation von vermeintlichen Wirts- und gewebspezifischen zellulären Rezeptoren erweisen. Darüber hinaus sollten VLPs eine wichtige Rolle bei der Beschreibung antigenischer Eigenschaften von HPVs spielen, so wie bei der Durchführung von Studien über die Immunantwort auf diese Viren.

[0092] Die vorliegende Erfindung wurde anhand von Illustrationen und Beispielen sehr detailliert beschrieben zum Zwecke der Klarheit und Verständlichkeit. Es dürfte jedoch klar sein, dass bestimmte Änderungen und Modifikationen im Umfang der beigefügten Ansprüche durchgeführt werden könnten.

Patentansprüche

1. Gereinigtes, rekombinantes, humanes, Papilloma-Virus ähnliches Partikel oder Capsomer, das das Capsidprotein L1 des humanen Papilloma-Virus 16 (HPV-16) von einer das L1-Protein codierenden Sequenz ausgehend exprimiert, das ein Protein oder einen Proteinkomplex produziert, das bzw. der immunologische und morphologische charakteristische Eigenschaften besitzt, welche denen des nativen Papilloma-Virus ähnlich sind, wobei besagtes Partikel oder Capsomer in der Lage ist, Antikörper in humanen Seren von Personen, die nachweislich mit HPV-16 infiziert sind, zu erkennen.
2. Virus-ähnliches Partikel nach Anspruch 1, welches einen Durchmesser besitzt, der mit dem Durchmesser isolierter Papilloma-Virus-Virionen übereinstimmt.
3. Virus-ähnliches Partikel oder Capsomer nach den Ansprüchen 1 oder 2, wobei die besagte, das L1-Protein codierende Sequenz in einer Zelle unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems exprimiert wird.

4. Virus-ähnliches Partikel oder Capsomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, das aus einem L1-Capsidprotein besteht.

pression des besagten Proteins ermöglichen, wodurch Virus-ähnliche Partikel produziert werden.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

5. Virus-ähnliches Partikel oder Capsomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verwendung als Impfstoff.

6. Impfstoff, der ein Virus-ähnliches Partikel oder Capsomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche enthält.

7. Impfstoff nach Anspruch 6, wobei es sich um einen multivalenten Impfstoff handelt, der ein Virus-ähnliches Partikel von verschiedenen humanen Papilloma-Viren enthält.

8. Impfstoff nach Anspruch 7, der zusätzlich einen Hilfsstoff enthält.

9. Verwendung eines Virus-ähnlichen Partikels oder Capsomers nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung eines Impfstoffes zur Verleihung entweder einer protektiven Immunität gegen humane Papilloma-Viren oder, falls der Patient bereits infiziert ist, zur Unterstützung der dem Patienten eigenen Immunantwort.

10. Verfahren zur Herstellung eines dem humanen Papilloma-Virus ähnlichen Partikels oder Capsomers nach Anspruch 1, wobei das Verfahren die Transfektion einer Zelle mit einem rekombinanten Expressionsvektor beinhaltet, der die das HPV-16 L1-Capsidprotein codierende Sequenz enthält, unter Bedingungen, die die Expression des besagten Capsidproteins ermöglichen, wodurch besagte Virus-ähnliche Partikel produziert werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der rekombinante Expressionsvektor aus einem Baculovirus-Expressionssystem besteht.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Zelle eine Insektenzelle ist.

13. Verfahren nach Anspruch 10, wobei besagte Transfektion mittels einer Infektion durchgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei das Verfahren folgendes beinhaltet:
Klonierung der das HPV-16 L1-Capsidprotein codierenden Sequenz in einen Baculovirus-Transfervektor;
Co-Transfektion von Insektenzellen mit besagtem Baculovirus-Transfervektor und mit genomicscher DNA des *Autographa californica* Nuklear-Polyhedrose-Virus;
Rückgewinnung rekombinanter Baculoviren; und
Infektion von Insektenzellen mit besagtem rekombinantem Baculovirus unter Bedingungen, die die Ex-

Anhängende Zeichnungen

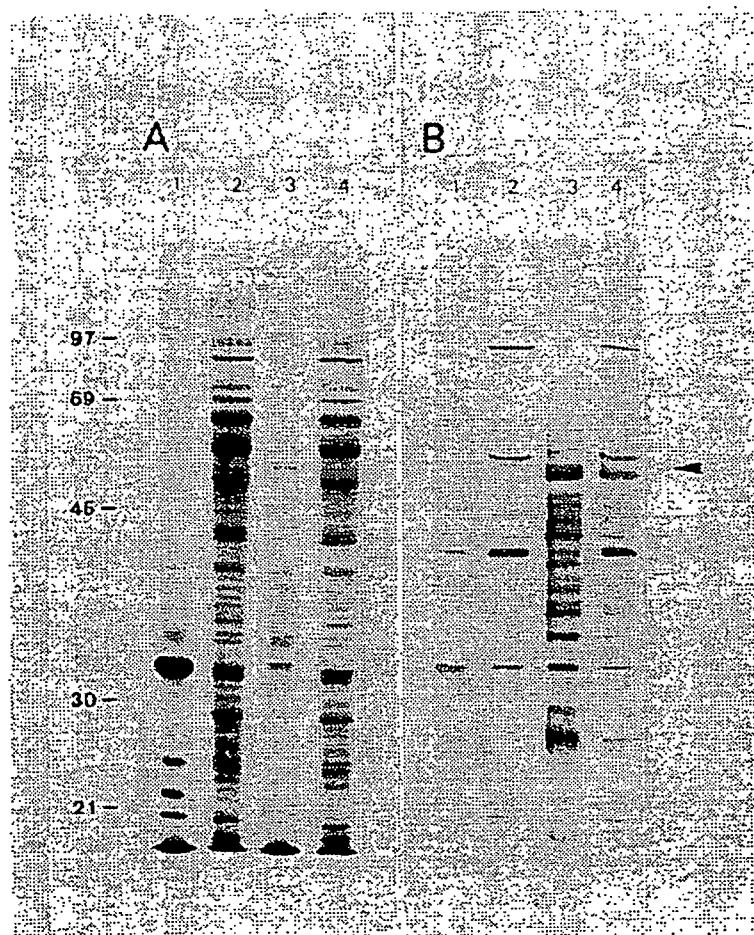


FIG. 1A

FIG. 1B



FIG. 2

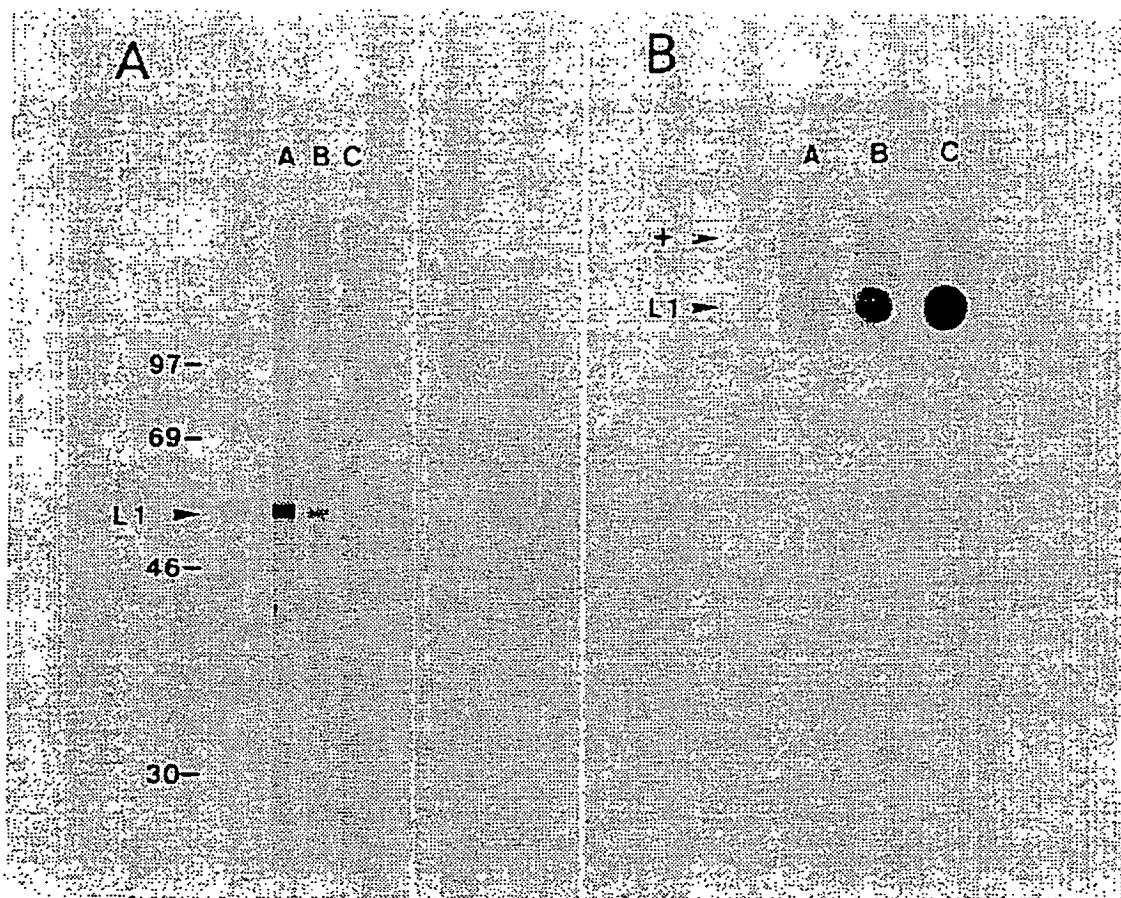


FIG. 3A

FIG. 3B

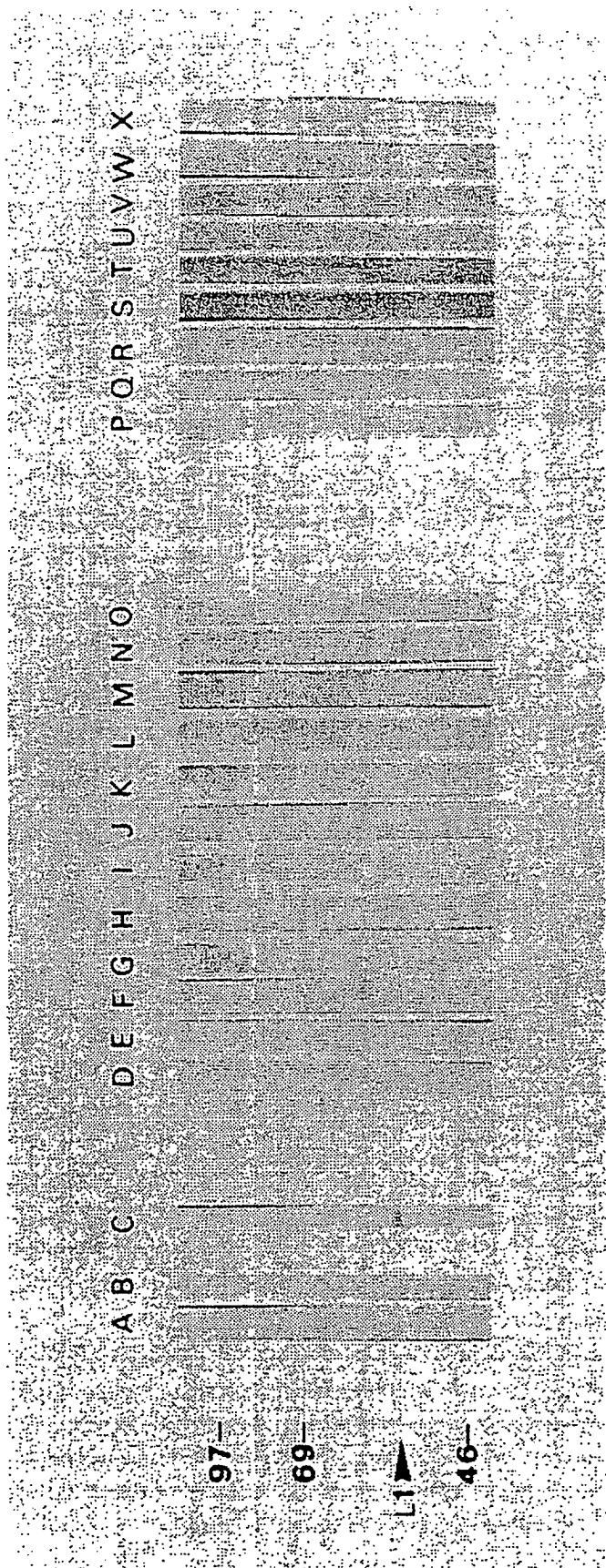


FIG. 4

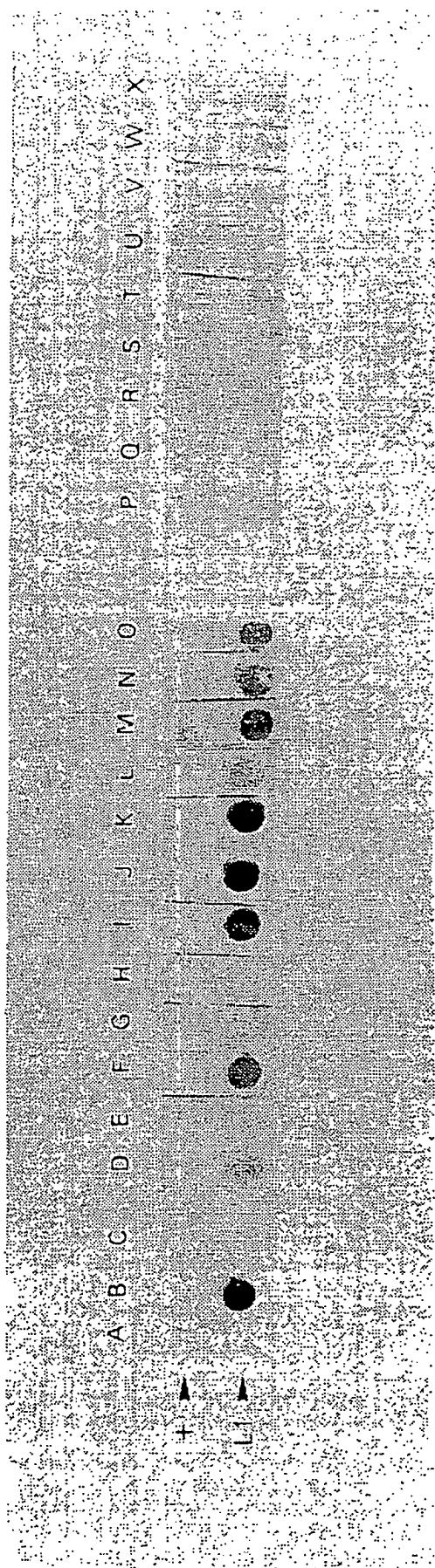


FIG. 5

DE 694 34 383 T2 2005.11.24



FIG. 6



FIG.7

SEROREAKTIVITÄT VON CONDYLOMA ACUMINATUM PATIENTEN
IN BEZUG AUF HPV-11 L1 VLPs

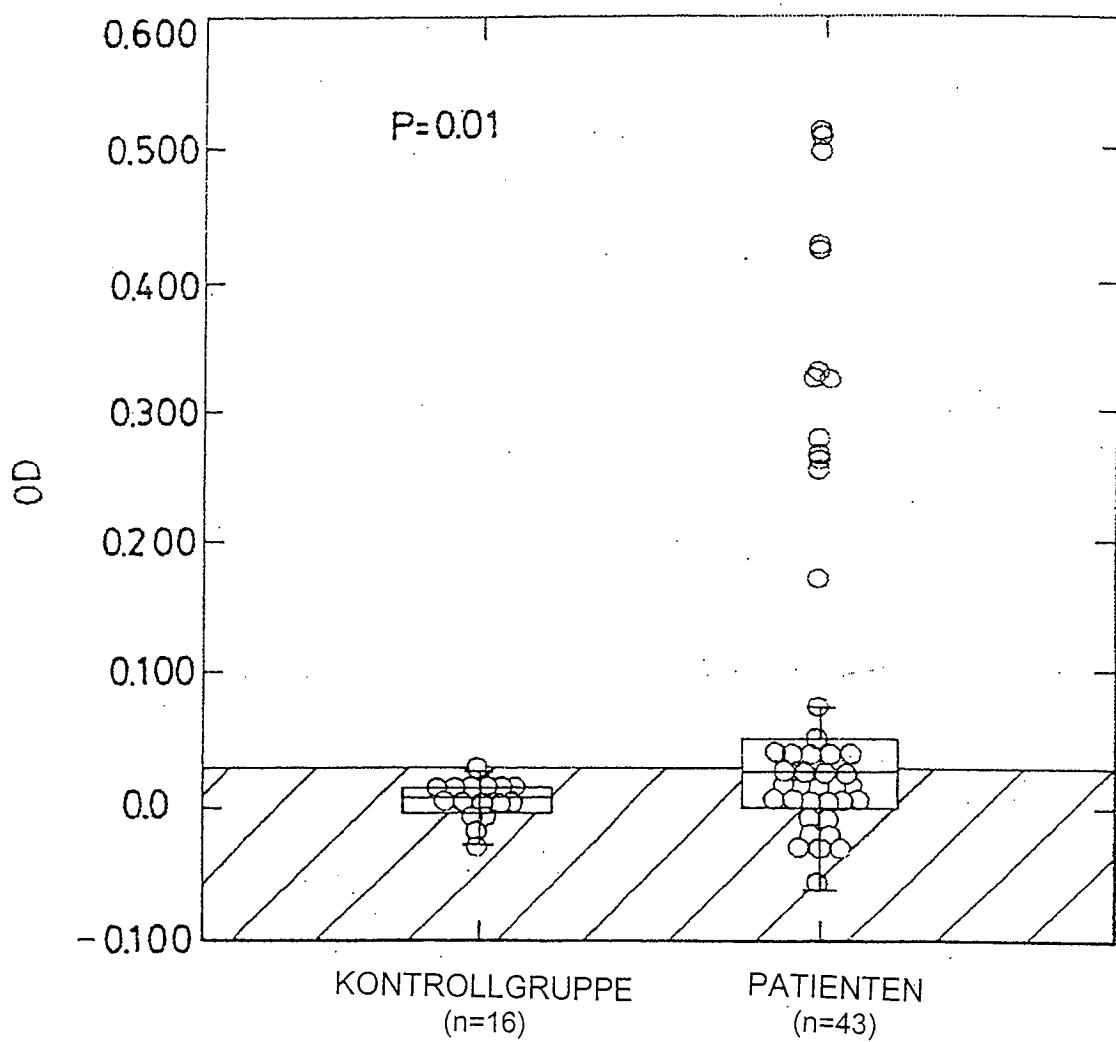


FIG.8

KORRELATION ZWISCHEN DEN SEROREAKTIVITÄTEN
IN BEZUG AUF HPV-11 VIRIONEN UND VLPs

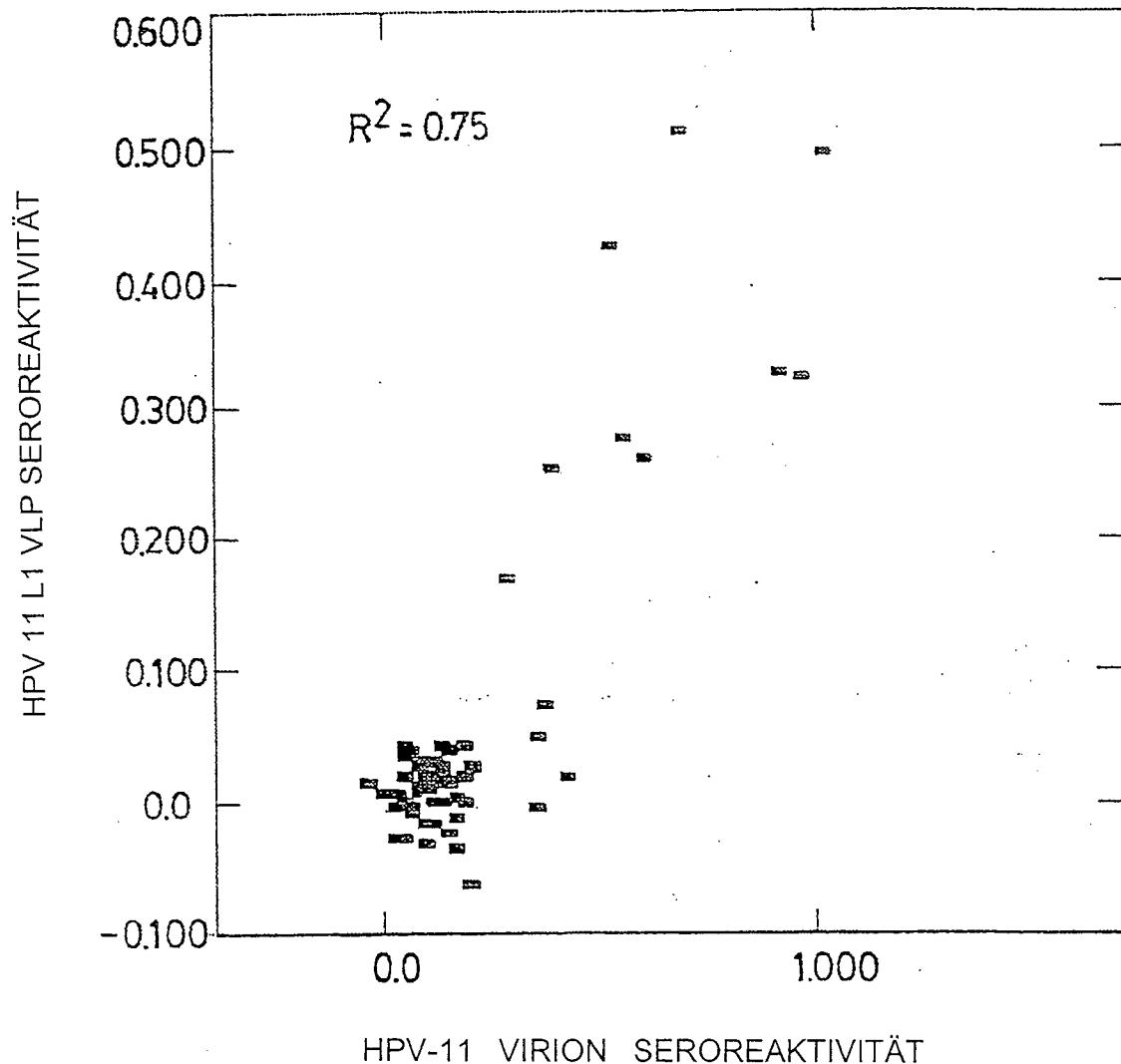


FIG. 9

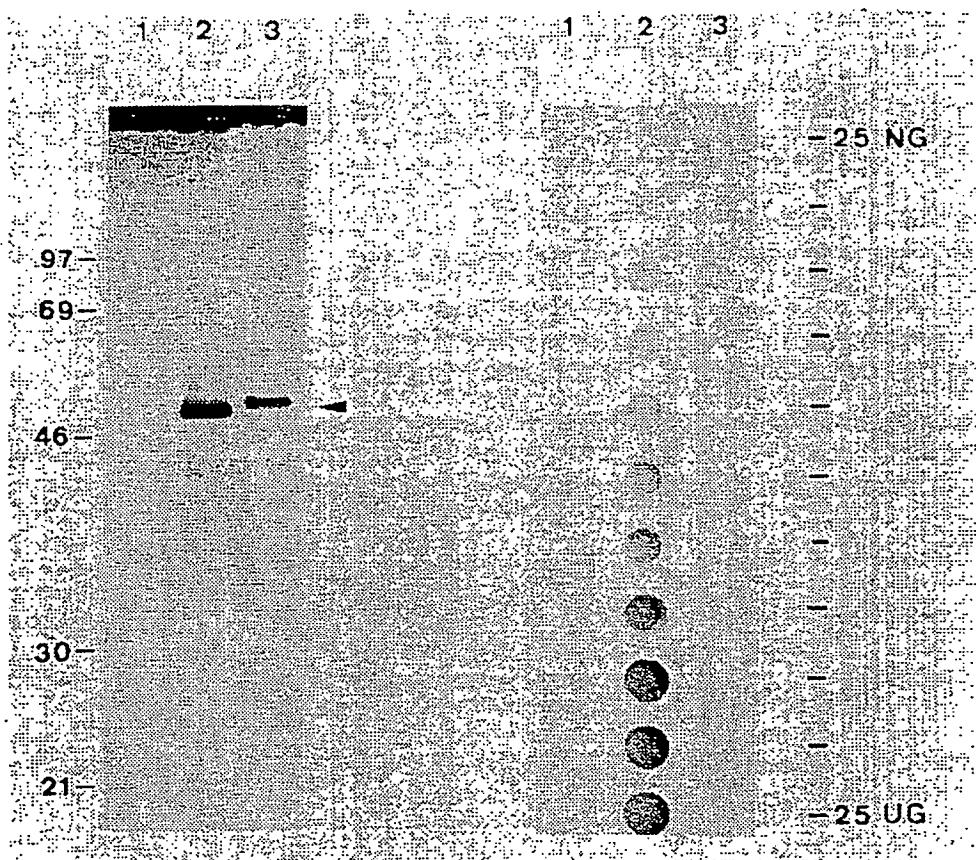


FIG.10

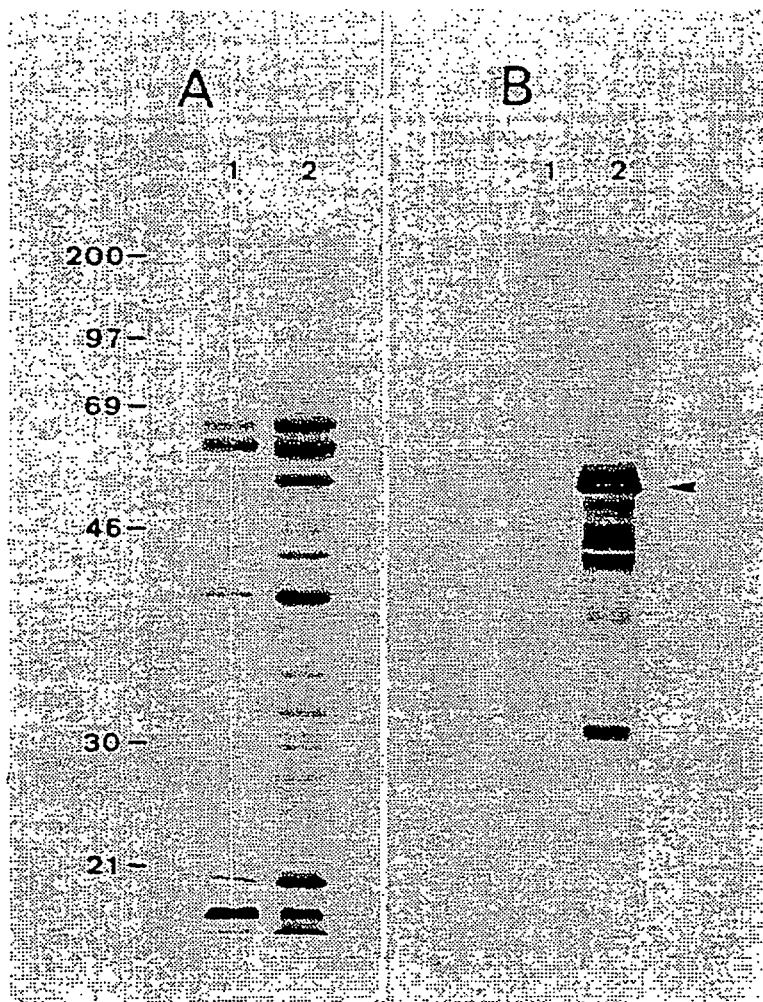


FIG.11A

FIG.11B

FIG.12A

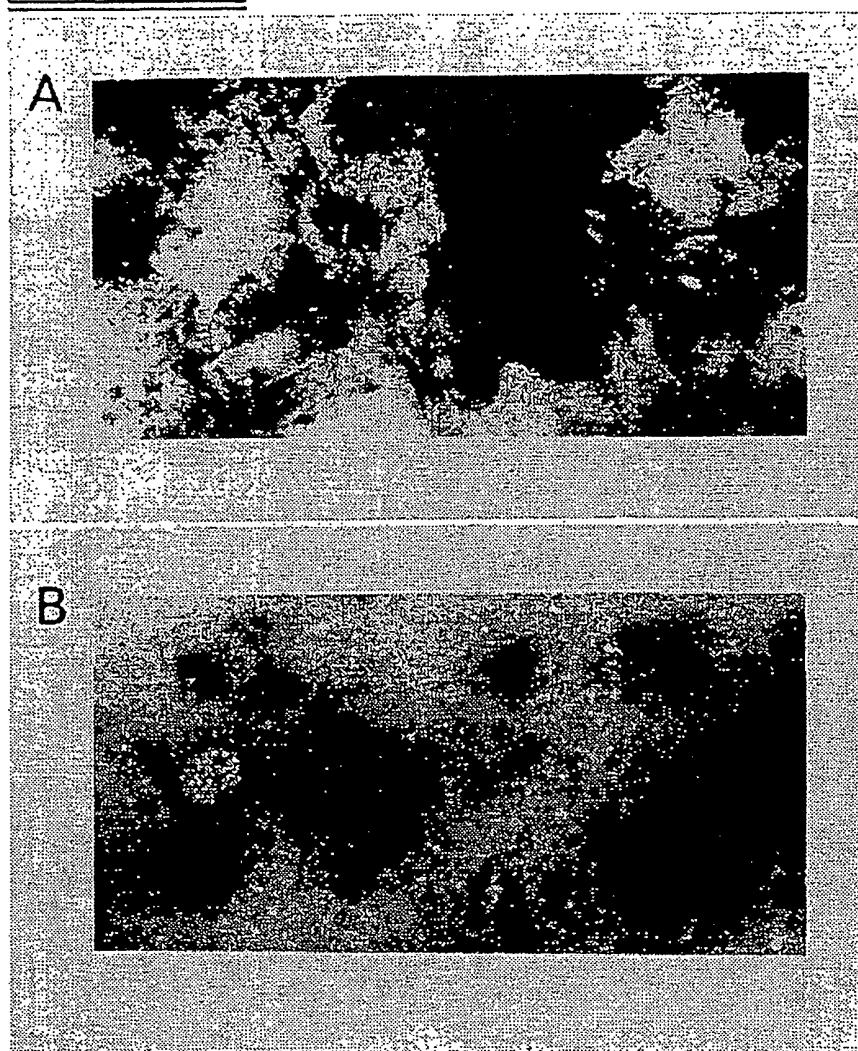


FIG.12B

FIG.13A

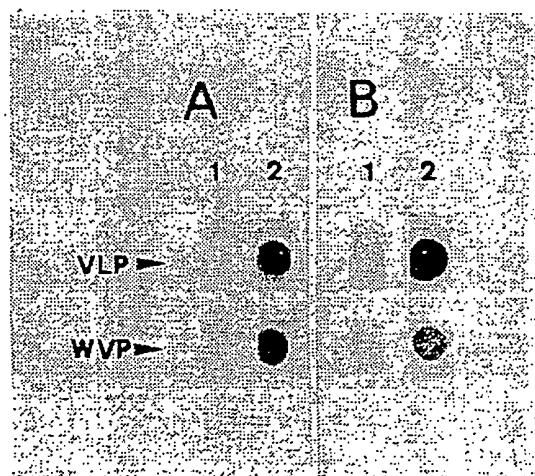


FIG.13B

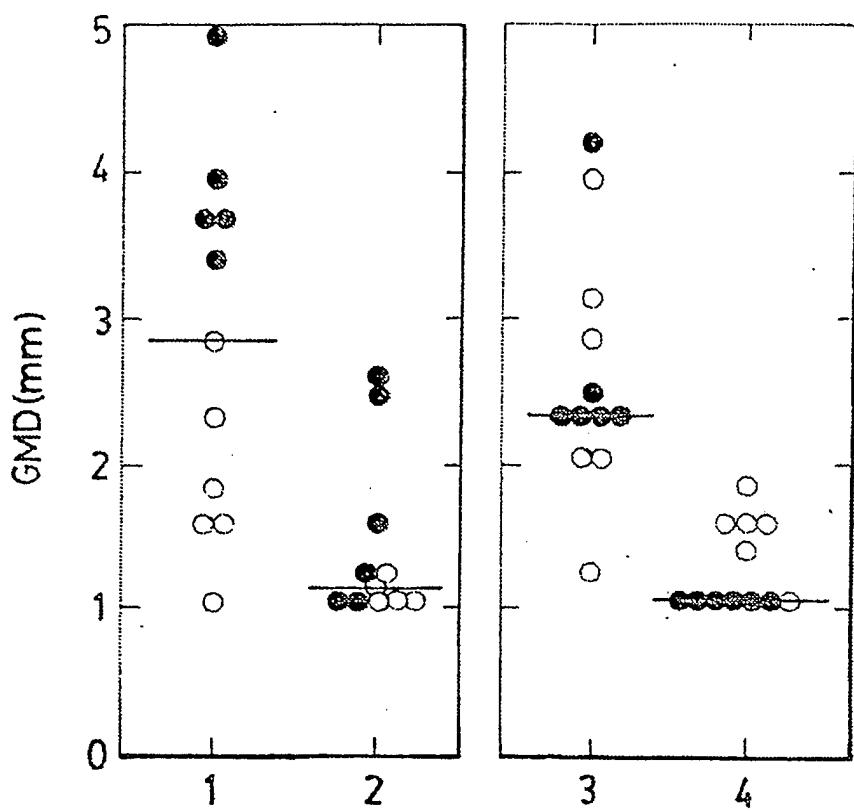


FIG 14

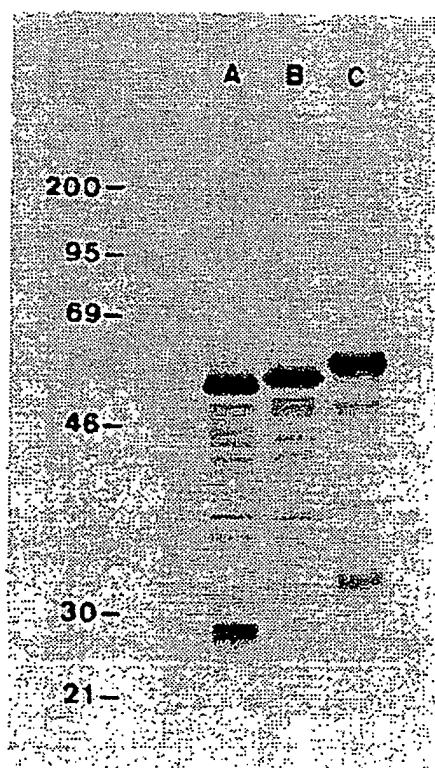


FIG.15

A



FIG. 16A

B

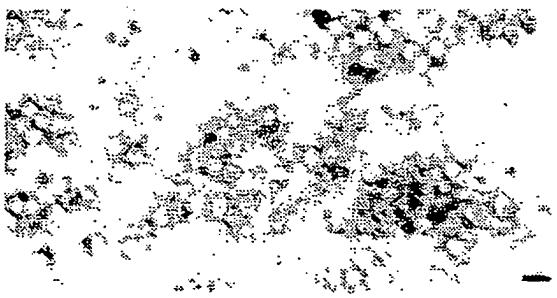


FIG. 16B

C

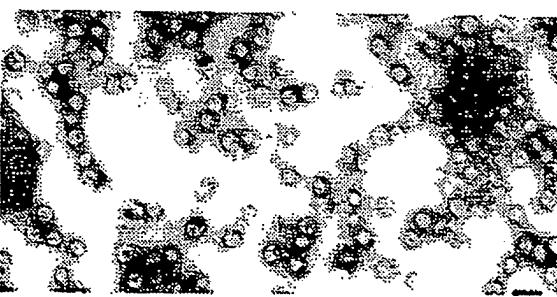
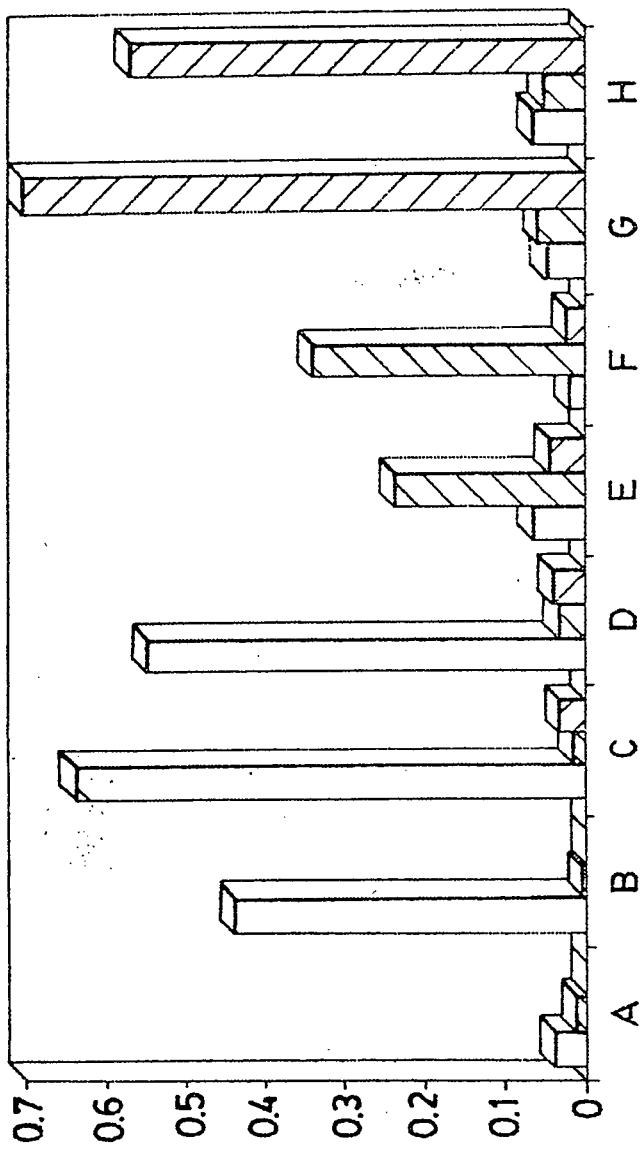


FIG. 16C



A₄₀₅

FIG.17