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

(10) **DE 695 35 018 T2** 2007.02.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 757 717 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 018.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/06006**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 919 820.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/031532**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.05.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.02.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.02.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 7/00*** (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/17 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
242794 **16.05.1994** **US**

(73) Patentinhaber:
Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., US

(74) Vertreter:
Abitz & Partner, 81679 München

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

(72) Erfinder:
JANSEN, Kathrin U., Rahway, NJ 07065, US;
COOK, III, James C., Rahway, NJ 07065, US;
GEORGE, Hugh A., Rahway, NJ 07065, US;
HOFMANN, Kathryn J., Rahway, NJ 07065, US;
JOYCE, Joseph G., Rahway, NJ 07065, US;
LEHMAN, Ernest Dale, Rahway, NJ 07065, US;
MARKUS, Henry Z., Rahway, NJ 07065, US;
ROSOLOWSKY, Mark, Rahway, NJ 07065, US;
SCHULTZ, Loren D., Rahway, NJ 07065, US

(54) Bezeichnung: **PAPILLOMAVIRUS VAKZINE**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Reinigung von virusähnlichen Partikeln (VLPs) des Human-Papillomavirus (HPV).

Hintergrund der Erfindung

[0002] Papillomavirus-Infektionen treten bei einer Vielzahl von Lebewesen, einschließlich von Menschen, Schafen, Hunden, Katzen, Kaninchen, Affen, Schlangen und Rindern, auf. Papillomaviren infizieren Epithelzellen, wobei sie im allgemeinen gutartige epitheliale oder fibroepitheliale Tumore an der Infektionsstelle induzieren. Papillomaviren sind spezies-spezifische infektiöse Agenzien; ein Human-Papillomavirus kann kein nicht-menschliches Lebewesen infizieren.

[0003] Papillomaviren können auf Grundlage des Wirts, den sie infizieren, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Human-Papillomaviren (HPV) werden weiterhin auf der Grundlage von DNA-Sequenzhomologie in mehr als 60 Typen eingeteilt (hinsichtlich eines Überblicks siehe Papillomaviruses and Human Cancer, H. Pfister (Hrsg.), CRC Press, Inc., 1990). Papillomavirus-Typen scheinen insofern typspezifische Immunogene darzustellen, als eine neutralisierende Immunität gegen Infektion durch einen Typ von Papillomavirus keine Immunität gegen einen anderen Typ von Papillomavirus verleiht.

[0004] Bei Menschen verursachen verschiedene HPV-Typen unterschiedliche Erkrankungen. Die HPV-Typen 1, 2, 3, 4, 7, 10 und 26-29 verursachen gutartige Warzen bei sowohl normalen als auch immungeschwächten Individuen. Die HPV-Typen 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36 und 46-50 verursachen flache Läsionen bei immungeschwächten Individuen. Die HPV-Typen 6, 11, 34, 39, 41-44 und 51-55 verursachen nicht-maligne Condylome der Schleimhäute der Genitalien oder Atemwege. Die HPV-Typen 16 und 18 verursachen eine Epithel-Dysplasie der Genitalschleimhaut und sind mit der Mehrheit von in situ- und invasiven Karzinomen des Gebärmutterhalses, der Vagina, Vulva und des Analkanals assoziiert. HPV6 und HPV11 sind die Ursachen für mehr als 90 % aller Condylome (Genitalwarzen) und laryngealer Papillome.

[0005] Der häufigste Subtyp von HPV Typ 6 ist HPV6a.

[0006] Immunologische Studien bei Tieren haben gezeigt, dass die Produktion neutralisierender Antikörper gegen Papillomavirus-Antigene eine Infektion mit dem homologen Virus verhindert. Die Entwicklung wirksamer Papillomavirus-Vakzine wurde durch Schwierigkeiten, die mit der Kultivierung von Papillomaviren in vitro verbunden sind, verlangsamt. Die Entwicklung eines effektiven HPV-Vakzins wurde insbesondere durch das Fehlen eines geeigneten Tiermodells verlangsamt.

[0007] Die Neutralisation von Papillomavirus durch Antikörper scheint typspezifisch zu sein und abhängig von Konformationsepitopen auf der Oberfläche des Virus.

[0008] Papillomaviren sind kleine (50-60 nm), nicht von einer Hülle umgebene, ikosaedrische DNA-Viren, welche für bis zu acht frühe und zwei späte Gene codieren. Die offenen Leserahmen (ORF) der Virusgenome werden als E1 bis E7 und L1 und L2 bezeichnet, wobei "E" früh bedeutet und "L" spät bedeutet. L1 und L2 codieren für Virus-Kapsidproteine. Die frühen (E) Gene sind mit Funktionen wie viraler Replikation und zellulärer Transformation assoziiert.

[0009] Das L1-Protein ist das Haupt-Kapsidprotein und besitzt ein Molekulargewicht von 55-60 kD. Das L2-Protein ist ein weniger häufiges Kapsidprotein, welches ein vorausgesagtes Molekulargewicht von 55-60 kD und ein scheinbares Molekulargewicht von 75-100 kD, wie mittels Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt, aufweist. Immunologische Daten legen nahe, dass sich der größte Teil des L2-Proteins innerhalb des L1-Proteins befindet. Die L2-Proteine sind bei verschiedenen Papillomaviren hoch konserviert, insbesondere die 10 basischen Aminosäuren am C-Terminus. Der L1-ORF ist bei verschiedenen Papillomaviren hoch konserviert.

[0010] Die L1- und L2-Gene wurden zur Herstellung von Vakzinen für die Prophylaxe und Behandlung von Papillomavirus-Infektionen bei Lebewesen eingesetzt. Zhou et al. (Virology, 185(1), 1991, 251-257; Virology, 189, 1992, 592-599) klonierten HPV-Typ 16-L1- und -L2-Gene in einen Vacciniavirus-Vektor und infizierten CV-1-Säugerzellen mit dem rekombinanten Vektor, um virusähnliche Partikel (VLP) zu produzieren.

[0011] Es wurden aus Bakterien stammende rekombinante Rinder-Papillomavirus-L1 und -L2 erzeugt. Neutralisierende Seren gegen die rekombinanten bakteriellen Proteine reagierten in einer Kreuzreaktion mit nativem Virus auf niedrigen Niveaus, mutmaßlich aufgrund von Unterschieden in den Konformationen der nativen und aus Bakterien stammenden Proteine.

[0012] Rekombinante Baculoviren, die HPV6-L1-, HPV11-L1-, HPV16-L1-, HPV18-L1-, HPV31-L1- oder HPV16-L2-ORFs exprimieren, wurden zur Infektion von Sf9-Insektenzellen und zur Produktion von L1- und L2-Proteinen eingesetzt. Westernblot-Analysen zeigten, dass die von Baculovirus er-

haltenen L1- und L2-Proteine mit Antikörper gegen HPV16 reagierten. Das von Baculovirus erhaltene L1 bildet VLPs.

[0013] Carter et al. (Virology, 182 (2), 1991, 513-521) demonstrierten die Produktion von HPV16-L1- und HPV16-L2-Proteinen durch rekombinante Stämme von Saccharomyces cerevisiae. Carter et al. demonstrierten auch die Produktion von HPV6b-L1- und -L2-Proteinen. Das HPV6b-L1-Protein war kein Volllängen-L1-Protein. Die rekombinanten Proteine wurden als intrazelluläre und als sekretierte Produkte produziert. Die rekombinanten L1- und L2-Proteine hatten ähnliche Molekulargewichte wie die nativen Proteine. Wurden die Proteine intrazellulär exprimiert, wurde die Hauptmenge des Proteins als unlöslich befunden, wenn die Zellen in Abwesenheit denaturierender Reagenzien lysiert wurden. Obwohl diese Unlöslichkeit die Reinigung des Proteins erleichtern kann, kann sie eine Analyse der nativen Epitope des Proteins behindern.

[0014] Von rekombinanten Proteinen, die von Hefe sekretiert wurden, wurde gezeigt, dass sie von Hefe stammende Kohlenhydrate enthalten. Die Anwesenheit dieser N-verknüpften Oligosaccharide kann native Epitope maskieren. Darüber hinaus können die sekretierten rekombinanten Proteine andere Modifizierungen enthalten, wie z.B. die Retention der sekretorischen Leadersequenz.

[0015] WO 87/01375 (Institut Pasteur und Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale) offenbart die Herstellung von HPV-L2-, -E6- und -E7-Proteinen.

[0016] EP-A-0256321 (Behringwerke Aktiengesellschaft) offenbart die DNA- und Aminosäuresequenzen von HPV18.

[0017] Kirnbauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 89, 1992, 12180-12184, offenbaren die Wirkung der Expression des L1-Proteins von HPV und Rinder-PV in Insektenzellen mittels eines Baculovirus-Vektors und dass das L1-Protein sich selbst unter Bildung eines VLP assembliert.

[0018] Hagensee et al., Journal of Virology, 67(1), 1993, 315-322, offenbaren die Selbstassemblierung von HPV1-Kapsiden durch die Expression von L1- oder L1- und L2-Protein. Rose et al., Journal of Virology, 67(4), 1993, 1936-1944, offenbaren die Expression des L1-Proteins von HPV11 in Sf-9-Insektenzellen mit dem rekombinanten Baculovirus-Vektor Ac11 L1 und die Identifizierung von VLPs in den infizierten Sf-9-Zellen.

[0019] Zhou et al., Virology, 185(1), 1991, 251-257, offenbaren, dass die Expression von rekombinanten Vaccinia-HPV16-L1- und -L2-ORF-Proteinen in Epithelzellen für die Assemblierung von HPV-VLPs ausreichend ist.

[0020] Kirnbauer et al., Journal of Virology, 67(12), 1993, 6929-6936, offenbaren die Selbstassemblierung von HPV16 und L1 und L1-L2 in VLPs.

[0021] WO 94/00152 (Georgetown University) offenbart rekombinant hergestelltes L1-Protein, welches neutralisierende Konformationsepitope auf humanen und tierischen Virionen nachbildet.

[0022] WO-A-9405792 (Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika, repräsentiert durch The Secretary, Department of Health and Human Services) offenbart die Selbstassemblierung rekombinanter Papillomavirus-Kapsidproteine durch Verwendung von Insekten- oder Hefezellen als Wirtszellen.

[0023] WO-A-9302184 (The University of Queensland und CLS-Limited (sic)) offenbart ein Verfahren zur Bereitstellung von Papillomavirus-VLPs aus L1- oder L1- und L2-Proteinen zur Verwendung für diagnostische Zwecke oder zur Inkorporation in einem Vakzin, zur Verwendung bezüglich von Infektionen, die durch einen Papillomavirus verursacht werden.

[0024] Es wäre von Nutzen, Verfahren zur Herstellung von großen Mengen an Papillomavirus-Proteinen beliebiger Spezies und beliebigen Typs durch Kultivierung rekombinanter Hefen zu entwickeln. Es wäre auch von Nutzen, große Mengen von Papillomavirus-Proteinen mit den Immunität verleihenden Eigenschaften der nativen Proteine, wie z.B. der Konformation des nativen Proteins, herzustellen.

[0025] Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung rekombinanter Papillomavirus-Proteine mit den Immunität verleihenden Eigenschaften der nativen Papillomavirus-Proteine sowie Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung. Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung eines prophylaktischen und möglicherweise therapeutischen Vakzins für eine Papillomavirus-Infektion. Die rekombinanten Proteine der vorliegenden Erfindung sind zur Bildung virusähnlicher Partikel in der Lage. Diese VLPs sind immunogen und verhindern die Bildung von Warzen in einem Tiermodell. Die vorliegende Erfindung verwendet das Baumwollschwanzkaninchen-Papillomavirus (CRPV) und HPV Typ 6 (Subtyp 6a) als Modellsysteme.

Zusammenfassung der Erfindung

[0026] Es werden rekombinante Expressionsvektoren, welche für die L1- und L2-Proteine von Papillomavirus codieren, Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Proteine und Verfahren zur Verwendung der rekombinanten Proteine bereitgestellt.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0027] Fig. 1 zeigt einen bidirektionalen Hefe-Expressionsvektor, der zur Expression von Papillomavirus-L1- und/oder -L2-Kapsidproteinen verwendet wurde.

[0028] **Fig.** 2 zeigt die Expression von HPV6a-L1 in Hefe (Immunoblot).

[0029] Fig. 3 zeigt die Expression von HPV6a-L2 in Hefe.

[0030] Immunoblot von HPV6a-L2, exprimiert in Hefe; Spur 1, Molekulargewichtmarker; Spur 2, trpE-L2-Fusionsprotein, exprimiert in E. coli als positive Kontrolle; Spur 4, HPV6a-L1, exprimiert in Hefe als negative Kontrolle; Spur 5, HPV6a-L2, exprimiert in Hefe (hinsichtlich experimenteller Details siehe Text).

[0031] Fig. 4 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV6a-L1-VLPs, exprimiert in Hefe.

[0032] Fig. 5 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV6a-L1/L2-VLPs, exprimiert in Hefe.

[0033] Fig. 6: Immunoblots von CRPV-L1, -L2-, und -L1 + L2-Proteinen, exprimiert in Hefe. Feld (A): Expression von CRPV-L1, wie gemessen durch Reaktivität mit Anti-CRPV-L1-Antiserum; Feld (B): Expression von CRPV-L2, wie gemessen durch Reaktivität mit Anti-CRPV-L2-Antiserum; Spur 1, Molekulargewichtsmarker in kD (Amersham Rainbow™ Marker, 14.300-200.000 Dalton); Spur 2, BJ5462, enthaltend den CRPV-L1-Expressionsvektor; Spur 3, Stamm 1569, enthaltend den CRPV-L2-Expressionsvektor, Spuren 4 und 5, zwei Isolate des Stammes 1569, cotransformiert mit zwei Plasmiden für die Expression von CRPV-L1 und CRPV-L2; Spuren 6-8, drei Isolate des Stammes 1569, enthaltend einen einzigen Vektor für die Coexpression von CRPV-L1- und -L2-Proteinen, Spuren 9 und 10, zwei Isolate von BJ5462, enthaltend einen einzigen Vektor für die Coexpression von CRPV-L1- und -L2-Proteinen. Die Wanderungsposition von L1 und L2 ist auf der rechten Achse des entsprechenden Feldes markiert.

[0034] Fig. 7 ist ein schematischer Überblick über die Konstruktion des S. cerevisiae-Stammes 1558.

[0035] Fig. 8 ist ein schematischer Überblick über die Konstruktion des S. cerevisiae-Stammes 1569.

[0036] Fig. 9 stellt die Hauptschritte in einem Reinigungsverfahren dar.

[0037] Fig. 10 ist eine Liste von Stämmen.

[0038] Fig. 11 zeigt einen Satz von SDS-PAGE-Analysen von HPV16-L1 + L2, gereinigt aus Hefe. Neben dem endgültig gereinigten VLP sind Proben aus Zwischenschritten im Reinigungsverfahren eingeschlossen. Die Tabelle ermöglicht die Identifizierung der Probe in jeder Spur. Ein Gel, das mit kolloidalem Coomassie angefärbt wurde, sowie Westernblots, die mit Antiseren gegen L1- und L2-Proteine sondiert wurden, sind eingeschlossen.

[0039] Fig. 12 ist eine schematische Darstellung von alternativen Reinigungsverfahren für Baumwollschwanzkaninchen-Papillomavirus-L1.

[0040] Fig. 13 und Fig. 14 sind SDS/PAGE-Analysen gereinigter VLP.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt bereit ein Verfahren zur Herstellung eines gereinigten Human-Papillomavirus (HPV)-Proteins, das HPV-Virus-ähnliche Partikel (VLPs) umfasst, umfassend:

(a) Transformieren einer Hefe mit einem rekombinanten DNA-Molekül, wobei das rekombinante DNA-Molekül für HPV-L1- oder HPV-L2-Protein codiert;

(b) Kultivieren der transformierten Hefe unter Bedingungen, welche die Expression des rekombinanten DNA-Moleküls zur Bildung von rohem HPV-Protein gestatten; und

(c) Reinigen des rohen rekombinanten HPV-Proteins mittels Anionenaustauschchromatographie, gefolgt von Größenausschlusschromatographie.

[0042] Methoden, Zusammensetzungen und Verfahren zur Verhinderung, Charakterisierung, zum Nachweis und zur Behandlung einer Papillomavirus (PV)-Infektion werden beschrieben. Die Verfahren basieren auf der Herstellung von rekombinanten L1- oder rekombinanten L2- oder rekombinanten L1- und L2-Proteinen in Hefe. Die rekombinanten Proteine sind in der Lage, die neutralisierenden Konformationsepitope von nativem PV nachzubilden. Die rekombinanten L1- oder L1- und L2-Proteine könnten auch in der Lage sein, virusähnliche Partikel (VLP) zu bilden. Die Verfahren, die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegen, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, das Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, umfassend die Transformation einer geeigneten Hefe-Wirtszelle mit einem rekombinanten DNA-Molekül, Kultivierung der transformierten Hefe unter Bedingungen, welche die Expression der DNA, welche das rekombinante Protein codiert, erlauben, vor der Reinigung des rekombinanten Proteins. Geeignete Wirtszellen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Hefestämme der Gattungen Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces und Hansenula.

[0043] Papillomavirus-Infektionen treten bei einer Vielzahl von Lebewesen, einschließlich von Menschen, Schafen, Hunden, Katzen, Kaninchen, Affen, Schlangen und Rindern, auf. Papillomaviren infizieren Epithelzellen, wobei sie im allgemeinen gutartige epitheliale oder fibroepitheliale Tumore an der Infektionsstelle induzieren.

[0044] Papillomaviren können auf Grundlage des Wirts, den sie infizieren, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Human-Papillomaviren (HPV) werden weiterhin auf der Grundlage von DNA-Sequenzhomologie in mehr als 60 Typen eingeteilt (hinsichtlich eines Überblicks siehe Papillomaviruses and Human Cancer, H. Pfister (Hrsg.), CRC Press, Inc., 1990). Papillomavirus-Typen scheinen insofern typspezifische Immunogene darzustellen, als eine neutralisierende Immunität gegen Infektion durch einen Typ von Papillomavirus keine Immunität gegen einen anderen Typ von Papillomavirus verleiht.

[0045] Bei Menschen verursachen verschiedene HPV-Typen unterschiedliche Erkrankungen. Die HPV-Typen 1, 2, 3, 4, 7, 10 und 26-29 verursachen gutartige Warzen bei sowohl normalen als auch immungeschwächten Individuen. Die HPV-Typen 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36 und 46-50 verursachen flache Läsionen bei immungeschwächten Individuen. Die HPV-Typen 6, 11, 34, 39, 41-44 und 51-55 verursachen nicht-maligne Condylome der Schleimhäute der Genitalien oder Atemwege. Die HPV-Typen 16 und 18 verursachen eine Epithel-Dysplasie des Genitaltrakts und sind mit der Mehrheit von in situ- und invasiven Karzinomen des Gebärmutterhalses, der Vagina, Vulva und des Analkanals assoziiert. HPV6 und HPV11 verursachen die Mehrzahl der Genitalwarzen und laryngealen Papillome.

[0046] Immunologische Studien bei Tieren haben gezeigt, dass die Produktion neutralisierender Antikörper gegen Papillomavirus-Kapsidproteine eine Infektion mit dem homologen Virus verhindert. Die Entwicklung wirksamer Papillomavires-Vakzine wurde durch Schwierigkeiten, die mit der Kultivierung von Papillomaviren in vitro verbunden sind, verlangsamt. Die Entwicklung eines effektiven HPV-Vakzins wurde insbesondere durch das Fehlen eines geeigneten Tiermodells verlangsamt.

[0047] Die Neutralisation von Papillomavirus durch Antikörper scheint typspezifisch zu sein und abhängig von Konformationsepitopen auf der Oberfläche des Virus.

[0048] Papillomaviren sind kleine (50-60 nm), nicht von einer Hülle umgebene, ikosaedrische DNA-Viren, welche für bis zu acht frühe und zwei späte Gene codieren. Die offenen Leserahmen (ORF) der Virusgenome werden als E1 bis E7 und L1 und L2 bezeichnet, wobei "E" früh bedeutet und "L" spät bedeutet. L1 und L2 codieren für Virus-Kapsidproteine. Die frühen (E) Gene sind mit Funktionen wie viraler Replikation und zellulärer Transformation assoziiert.

[0049] Das L1-Protein ist das Haupt-Kapsidprotein und besitzt ein Molekulargewicht von 55-60 kD. Das L2-Protein ist ein weniger häufiges Kapsidprotein, welches ein vorausgesagtes Molekulargewicht von 55-60 kD und ein scheinbares Molekulargewicht von 75-100 kD, wie mittels Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt, aufweist.

[0050] Die Bildung von HPV16-L1-, HPV16-L2- und HPV-Typ 6-L1-Proteinen durch rekombinante Stämme von Saccharomyces cerevisiae wurde berichtet. Es wäre von Nutzen, Verfahren zur Herstellung großer Mengen von Papillomavirus-Proteinen beliebiger Spezies und beliebigen Typs durch Kultivierung rekombinanter Hefen zu entwickeln. Es wäre auch von Nutzen, große Mengen an Papillomavirus-Proteinen mit den Immunität verleihenden Eigenschaften der nativen Proteine, wie z.B. der Konformation des nativen Proteins, herzustellen.

[0051] Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von gereinigten rekombinanten Papillomavirus-Proteinen mit den Immunität verleihenden Eigenschaften der nativen Papillomavirus-Proteine sowie Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung. Die vorliegende Erfindung kann zur Herstellung eines prophylaktischen Vakzins für eine Papillomavirus-Infektion führen. Die vorliegende Erfindung wird durch Baumwollschwanzkaninchen-Papillomavirus (CRPV) und Human-Papillomavirus Typ 6 (HPV Typ 6 oder HPV6) als Modellsysteme exemplarisch dargestellt. Die exemplarische Darstellung beschränkt nicht den Umfang der Erfindung, welche andere Typen und Subtypen von Papillomavirus (PV) einschließt, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, HPV Typ 11, HPV Typ 16 und HPV Typ 18 sowie HPV Subtyp 6a und HPV Subtyp 6b.

[0052] Pharmazeutisch geeignete Zusammensetzungen, welche die Proteine oder VLP umfassen, können nach bekannten Verfahren formuliert werden, wie z.B. durch die Zumischung eines pharmazeutisch annehmbaren Trägers. Beispiele solcher Träger und Formulierungsverfahren sind in Remington's Pharmaceutical Sciences zu finden. Zur Bildung einer pharmazeutisch annehmbaren Zusammensetzung, die für eine wirksame Verabreichung geeignet ist, werden solche Zusammensetzungen eine wirksame Menge des Proteins oder VLP enthalten. Solche Zusammensetzungen können Proteine oder VLP enthalten, die von mehr als einem HPV-Typ stammen.

[0053] Therapeutische oder diagnostische Zusammensetzungen werden einem Individuum in ausreichenden Mengen verabreicht, um PV-Infektionen zu behandeln oder zu diagnostizieren. Die wirksame

Menge kann entsprechend einer Vielfalt von Faktoren, wie z.B. dem Zustand, Gewicht, Geschlecht und Alter des Individuums, variieren. Andere Faktoren umfassen den Verabreichungsmodus. Im allgemeinen werden die Zusammensetzungen in Dosen verabreicht werden, die von etwa 1 µg bis etwa 250 µg reichen.

[0054] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können dem Individuum auf einer Vielfalt von Routen, wie z.B. subkutan, topisch, oral, mukosal und intramuskulär, verabreicht werden.

[0055] Die Vakzine der Erfindung umfassen rekombinante Proteine oder VLP, welche die antigenen Determinanten enthalten, die zur Induktion der Bildung neutralisierender Antikörper in dem Wirt erforderlich sind. Solche Vakzine sind auch sicher genug, um ohne Gefahr einer klinischen Infektion verabreicht zu werden, besitzen keine toxischen Nebenwirkungen, können auf einem effektiven Weg verabreicht werden, sind stabil und kompatibel mit Vakzin-Trägern.

[0056] Die Vakzine können auf einer Vielfalt von Routen verabreicht werden, z.B. oral, parenteral, subkutan, mukosal oder intramuskulär. Die verabreichte Dosis kann mit dem Zustand, Geschlecht, Gewicht und Alter des Individuums, dem Verabreichungsweg und dem PV-Typ des Vakzins variieren. Das Vakzin kann in Dosierungsformen wie Kapseln, Suspensionen, Elixieren oder flüssigen Lösungen eingesetzt werden. Das Vakzin kann mit einem immunologisch annehmbaren Träger formuliert werden.

[0057] Die Vakzine werden in therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht, d.h. in ausreichenden Mengen, um eine immunologisch schützende Reaktion hervorzurufen. Die therapeutisch wirksame Menge kann entsprechend dem PV-Typ variieren. Das Vakzin kann in Einzeldosen oder mehreren Dosen verabreicht werden.

[0058] Diese Verfahren ermöglichen die Formulierung subviraler Vakzine zur Verhütung einer PV-Infektion. Bei Anwendung dieser Verfahren können monovalente oder multivalente PV-Vakzine hergestellt werden. Beispielsweise kann ein monovalentes HPV Typ 16-Vakzin durch Formulierung von rekombinantem/n HPV16-L1-Protein oder -L2-Protein oder -L1- und -L2-Proteinen hergestellt werden. Alternativ kann ein multivalentes HPV-Vakzin durch Mischen von L1- oder L2- oder L1- und L2-Proteinen oder VLP von verschiedenen HPV-Typen formuliert werden.

[0059] Die rekombinanten Proteine und VPL können bei der Formulierung immunogener Zusammensetzungen eingesetzt werden. Solche Zusammensetzungen sind bei Einführung in einen geeigneten Wirt zur Induktion einer Immunreaktion in dem Wirt in der Lage.

[0060] Die rekombinanten Proteine und VLP können zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden. Der Begriff "Antikörper", wie hier verwendet, umfaßt sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper sowie Fragmente davon, wie z.B. Fv-, Fab- und $F(ab)_2$-Fragmente, die zur Bindung von Antigen oder Hapten in der Lage sind.

[0061] Die rekombinanten Proteine, VLP und Antikörper können zur Serotypenbestimmung einer HPV-Infektion und zum HPV-Screening eingesetzt werden. Die rekombinanten Proteine, VLP und Antikörper sind geeignet zur Formulierung von Kits, die sich für den Nachweis und die Serotypenbestimmung von HPV eignen. Ein solcher Kit würde einen aufgeteilten Träger umfassen, der dazu geeignet ist, in festem Einschluss mindestens einen Behälter zu umfassen. Der Träger würde ferner Reagenzien wie rekombinantes HPV-Protein oder -VLP oder Anti-HPV-Antikörper, die sich zum Nachweis einer Vielfalt von HPV-Typen eignen, umfassen. Der Träger kann auch Mittel zum Nachweis, wie z.B. markiertes Antigen oder Enzymsubstrate oder dgl., enthalten.

[0062] Die rekombinanten Proteine und VLP eignen sich auch als Molekulargewichtsmarker und molekulare Größenmarker.

[0063] Die folgenden Beispiele werden zur näheren Erläuterung der Erfindung bereitgestellt.

REFERENZBEISPIEL 1

Herstellung des Hefestamms U9

[0064] Der Saccharomyces cerevisiae-Stamm 2150-2-3 (MATa, leu2-04, ade1, cir°) wurde von Dr. Leland Hartwell (University of Washington, Seattle, WA) erhalten. Zellen des Stamms 2150-2-3 wurden über Nacht bei 30° C in 5 ml YEHD-Medium (Carty et al., J. Ind. Micro. 2 (1987), 117-121) vermehrt. Die Zellen wurden dreimal in sterilem destillierten Wasser gewaschen, in 2 ml sterilem destillierten Wasser resuspendiert und 0,1 ml Zellsuspension wurde auf jede von sechs 5-Fluorotsäure (FOA)-Platten ausplattiert, um hinsichtlich ura3-Mutanten zu selektionieren (Cold Spring Harbor Laboratory Manual for Yeast Genetics). Die Platten wurden bei 30° C inkubiert. Das Medium enthielt auf 250 ml destilliertes Wasser: 3,5 g Difco-Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 0,5 g 5-Fluorotsäure, 25 mg Uracil und 10,0 g Dextrose.

[0065] Das Medium wurde mittels Filtration durch 0,2-µm-Membranen sterilisiert und dann mit 250 ml 4%igem Bacto-Agar (Difco), gehalten bei 50° C, 10 ml einer 1,2-mg/ml-Lösung von Adenin und 5 ml L-Leucin-Lösung (180 mg/50 ml) gemischt. Das resultierende Medium wurde mit 20 ml pro Petrischale aufgeteilt.

[0066] Nach 5 Tagen Inkubation waren zahlreiche Kolonien erschienen. Einzelkolonien wurden isoliert durch erneutes Ausstreichen von Kolonien von den ursprünglichen FOA-Platten auf frische FOA-Platten, welche dann bei 30° C inkubiert wurden. Eine Anzahl Kolonien von dem zweiten Satz von FOA-Platten wurde durch Replika-Plattierung auf sowohl YEHD-Platten als auch Uracil-Minus-Platten hinsichtlich der Anwesenheit der ura3-Mutation getestet. Das gewünschte Ergebnis war gutes Wachstum auf YEHD- und kein Wachstum auf Uracil-Minus-Medium. Ein Isolat (U9) wurde erhalten, welches diese Eigenschaften zeigte. Es wurde als eingefrorene Glycerinstammlösung (Stamm # 325) bei –70° C für die spätere Verwendung gelagert.

REFERENZBEISPIEL 2

Herstellung eines Vektors für die Unterbrechung des Hefe-MNN9-Gens

[0067] Zur Herstellung eines Vektors für die Unterbrechung des MNN9-Gens war es erforderlich, zuerst das MNN9-Gen aus genomischer S. cerevisiae-DNA zu klonieren. Dies wurde erreicht durch eine Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)-Technik. Ein 5'-Sense-Primer und ein 3'-Antisense-Primer für die PCR der für MNN9 codierenden Volllängen-Sequenz wurden auf Grundlage der veröffentlichten Sequenz für das Hefe-MNN9-Gen konstruiert (Zymogenetics: EP-Patentanmeldung Nr. 88 117 834.7, Veröffentlichungsnummer 0-314-096-A2). Es wurden die folgenden Oligodesoxynukleotid-Primer eingesetzt, welche flankierende HindIII-Stellen (unterstrichen) enthielten:
Sense-Primer: 5'-CTT AAA GCT TAT GTC ACT TTC TCT TGT ATC G-3' (SEQ-ID-Nr. 1)
Antisense-Primer: 5'-TGA TAA GCT TGC TCA ATG GTT CTC TTC CTC-3' (SEQ-ID-Nr. 2).

[0068] Das initiierende Methionincodon für das MNN9-Gen ist in Fettdruck hervorgehoben. Die PCR erfolgte unter Verwendung von genomischer DNA aus dem S. cerevisiae-Stamm JRY188 als Matrize, Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) und 25 Amplifizierungszyklen (94° C, 1 Min., 37° C, 2 Min., 72° C, 3 Min.). Das resultierende 1,2-kbp-PCR-Fragment wurde mit HindIII verdaut, gelgereinigt und mit HindIII-verdautem, mit alkalischer Phosphatase behandeltem pUC13 (Pharmacia) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als p1183 bezeichnet.

[0069] Zur Unterbrechung des MNN9-Gens mit dem Hefe-URA3-Gen wurde das Plasmid pBR322-URA3 (welches das 1,1-kbp-HindIII-Fragment, codierend für das S. cerevisiae-URA3-Gen, subkloniert in die HindIII-Stelle von pBR322 enthält) mit HindIII verdaut und das 1,1-kbp-DNA-Fragment, welches das funktionelle URA3-Gen trug, wurde gelgereinigt, mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und dann mit dem PmlI-verdauten Plasmid p1183 (PmlI spaltet innerhalb der für MNN9 codierenden Sequenz) ligiert. Das resultierende Plasmid p1199 enthält eine Unterbrechung des MNN9-Gens durch das funktionelle URA3-Gen.

REFERENZBEISPIEL 3

Konstruktion des U9-Derivat-Stammes 1372, welcher eine Unterbrechung des MNN9-Gens enthält

[0070] Zur Unterbrechung des MNN9-Gens in dem Stamm U9 (# 325) wurden 30 µg des Plasmids p1199 mit HindIII verdaut, um eine lineare mnn9::URA3-Unterbrechungskassette zu schaffen. Zellen des Stamms 325 wurden mit der HindIII-verdauten p1199-DNA nach dem Sphäroplasten-Verfahren (Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929-1933) transformiert und Transformanten wurden auf einem synthetischen Agarmedium, dem Uracil fehlte und das 1,0 M Sorbit enthielt, selektioniert. Das synthetische Medium enthielt pro Liter destilliertes Wasser: Agar, 20 g, Hefe-Stickstoffbase w/o Aminosäuren, 6,7 g, Adenin, 0,04 g, L-Tyrosin, 0,05 g, Sorbit, 182 g, Glucose, 20 g, und Leucin-Minus-Lösung #2, 10 ml. Leucin-Minus-Lösung #2 enthält pro Liter destilliertes Wasser: L-Arginin, 2 g, L-Histidin, 1 g, L-Leucin, 6 g, L-Isoleucin, 6 g, L-Lysin, 4 g, L-Methionin, 1 g, L-Phenylalanin, 6 g, L-Threonin, 6 g, L-Tryptophan, 4 g.

[0071] Die Platten wurden bei 30° C fünf Tage lang inkubiert, zu welchem Zeitpunkt zahlreiche Kolonien erschienen waren. Chromosomale DNA-Präparationen wurden von 10 Kolonien hergestellt und dann mit EcoRI plus HindIII verdaut. Die DNA-Verdauungen wurden dann mittels Southernblots (J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) unter Verwendung des 1,2-kbp-HindIII-Fragments, welches das MNN9-Gen (isoliert aus dem Plasmid p1199) trägt, als Sonde beurteilt. Ein Isolat wurde identifiziert (Stamm # 1372), welches die erwarteten DNA-Banden-Verschiebungen auf dem Southernblot sowie die extreme Klumpigkeit zeigte, die typischerweise von mnn9-Mutanten gezeigt wird.

REFERENZBEISPIEL 4

Konstruktion eines Vektors für die Unterbrechung des Hefe-HIS3-Gens

[0072] Zur Konstruktion einer Unterbrechungskassette, bei der das S. cerevisiae-HIS3-Gen durch das URA3-Gen unterbrochen wird, wurde das Plasmid YEp6 (K. Struhl et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76:1035) mit BamHI verdaut. Das 1,7-kbp-BamHI-Fragment, welches das HIS3-Gen trägt, wurde gelgereinigt, mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und mit pUC18 ligiert, welches zuvor mit Bam-

HI verdaut und mit T4-DNA-Polymerase behandelt worden war. Das resultierende Plasmid (als p1501 oder pUC18-HIS3 bezeichnet) wurde mit NheI verdaut (welches innerhalb der für HIS3 codierenden Sequenz spaltet) und das Vektorfragment wurde gelgereinigt, mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und dann mit alkalischer Kalbsdarm-Phosphatase behandelt. Das URA3-Gen wurde aus dem Plasmid pBR322-URA3 durch Verdauung mit HindIII isoliert und das 1,1-kbp-Fragment, welches das URA3-Gen trug, wurde gelgereinigt, mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und mit dem obigen pUC18-HIS3-NheI-Fragment ligiert. Das resultierende Plasmid (als pUC18-his3::URA3 oder p1505 bezeichnet) enthält eine Unterbrechungskassette, bei der das Hefe-HIS3-Gen durch das funktionelle URA3-Gen unterbrochen ist.

REFERENZBEISPIEL 5

Konstruktion eines Vektors für die Unterbrechung des Hefe-PRB1-Gens durch das HIS3-Gen

[0073] Das Plasmid FP8ΔH, welches das S. cerevisiae-PRB1-Gen trägt, wurde von Dr. E. Jones von der Carnegie-Mellon University (C. M. Moehle et al., 1987, Genetics 115:255-263) zur Verfügung gestellt. Es wurde mit HindIII plus XhoI verdaut und das 3,2-kbp-DNA-Fragment, welches das PRB1-Gen trug, wurde gelgereinigt und durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht. Das Plasmid pUC18 wurde mit BamHI verdaut, gelgereinigt und durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht. Das resultierende Vektorfragment wurde mit dem obigen PRB1-Gen-Fragment ligiert, um das Plasmid pUC18-PRB1 zu ergeben. Das Plasmid YEp6, welches das HIS3-Gen enthält, wurde mit BamHI verdaut. Das resultierende 1,7-kbp-BamHI-Fragment, welches das funktionelle HIS3-Gen trägt, wurde gelgereinigt und dann durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht. Das pUC18-PRB1 wurde mit EcoRV plus NcoI verdaut, welches innerhalb der für PRB1 codierenden Sequenz spaltet und die aktive Stelle der Protease B und flankierende Sequenz entfernt. Das 5,7-kbp-EcoRV-NcoI-Fragment, welches die restlichen 5'- und 3'-Abschnitte der für PRB1 codierenden Sequenz in pUC18 trägt, wurde gelgereinigt, durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht, mit alkalischer Kalbsdarm-Phosphatase dephosphoryliert und mit dem oben beschriebenen glattendigen HIS3-Fragment ligiert. Das resultierende Plasmid (als pUC18-prbI::HIS3 bezeichnet, Stamm # 1245) enthält das funktionelle HIS3-Gen anstelle des PRB1-Gen-Abschnitts, welcher oben deletiert worden war.

REFERENZBEISPIEL 6

Konstruktion eines U9-verwandten Hefestammes, der Unterbrechungen sowohl des MNN9- als auch des PRB1-Gens enthält

[0074] Der U9-verwandte Stamm 1372, welcher eine MNN9-Gen-Unterbrechung enthält, wurde in Beispiel 3 beschrieben. Klonale Isolate des Stammes 1372 wurden einer Passage auf FOA-Platten unterworfen, um ura3-Mutanten zu selektionieren. Eine Anzahl von ura3-Isolaten des Stammes 1372 wurde erhalten und ein Isolat (Stamm 12930-190-S1-1) wurde für die nachfolgende Unterbrechung des HIS3-Gens ausgewählt. Der pUC18-his3::URA3-Genunterbrechungsvektor (p1505) wurde mit XbaI plus EcoRI verdaut, um eine lineare his3::URA3-Unterbrechungskassette zu schaffen, und zur Transformation des Stammes 12930-190-S1-1 nach dem Lithiumacetat-Verfahren (Methods in Enzymology, 194:290 (1991)) verwendet. Ura^+-Transformanten wurden auf synthetischem Agarmedium ohne Uracil selektioniert, für klonale Isolate auf demselben Medium erneut ausgestrichen und dann auf Medium, dem entweder Uracil oder Histidin fehlte, replika-plattiert, um hinsichtlich derjenigen Isolate zu screenen, welche sowohl Ura^+ als auch His^- waren. Ein Isolat (Stamm 12930-230-1) wurde für die anschließende Unterbrechung des PRB1-Gens ausgewählt. Der PRB1-Genunterbrechungsvektor (pUC18-prb1::HIS3, Stamm # 1245) wurde mit SacI plus XbaI verdaut, um eine lineare prb1::HIS3-Unterbrechungskassette zu schaffen, und zur Transformation des Stammes 12930-230-1 nach dem Lithiumacetat-Verfahren eingesetzt. His^+-Transformanten wurden auf Agarmedium ohne Histidin selektioniert und auf demselben Medium für klonale Isolate erneut ausgestrichen. Genomische DNA wurde aus einer Reihe der resultierenden His^+-Isolate präpariert, mit EcoRI verdaut und dann auf 0,8%igen Agarosegelen elektrophoresiert. Southernblot-Analysen erfolgten dann mit Hilfe einer radioaktiv markierten 617-bp-Sonde für das PRB1-Gen, welche mittels PCR mit Hilfe der folgenden Oligodesoxynukleotid-Primer hergestellt worden war:

5' TGG TCA TCC CAA ATC TTG AAA 3' (SEQ.ID-Nr. 3)

5' CAC CGT AGT GTT TGG AAG CGA 3' (SEQ-ID-Nr. 4).

[0075] Es wurden 11 Isolate erhalten, welche die erwartete Hybridisierung der Sonde mit einem prb1::HIS3-DNA-Fragment von 2,44 kbp zeigten. Dies stand im Gegensatz zur Hybridisierung der Sonde mit dem 1,59-kbp-Fragment für das Wildtyp-PRB1-Gen. Eines der Isolate, enthaltend die gewünschte prbI::HIS3-Unterbrechung, wurde für die weitere Verwendung ausgewählt und als Stamm # 1558 bezeichnet.

REFERENZBEISPIEL 7

Konstruktion eines Vektors für die Unterbrechung des Hefe-PEP4-Gens

[0076] Das S. cerevisiae-PEP4-Gen wurde aus einer genomischen Hefe-Bank auf folgende Weise kloniert. E. coli-Zellen, welche die genomische Hefebank pLS101 enthielten (Schultz und Friesen, 1983, J. Bacteriol. 155:8-14), wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium, enthaltend 100 µg/ml Ampicillin, vermehrt. Aus dieser Kultur wurden 10^{-4}- und 10^{-5}-Verdünnungen auf LB+Ampicillin-Platten ausplattiert. Kolonie-Plattenübertragungen wurden mit Hilfe von Nitrocellulosefiltern durchgeführt. Eine 600-pb-Sonde für das Hefe-PEP4-Gen wurde mittels PCR unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase, Gesamt-Plasmid-DNA aus der pLS101-Hefebank und den folgenden Oligodesoxynukleotid-Primern präpariert, die auf Grundlage der veröffentlichten DNA-Sequenz für PEP4 (C. A. Woolford et al., Mol. Cell. Biol. 6:2500 (1986)) konstruiert worden waren.
Sense-Primer: 5'-GAG GCT ACC AGC GAG CCG GGC-3' (SEQ-ID-Nr. 5)
Antisense-Primer: 5'-GGC CAG TGG GCC AAC AGG TTC-3' (SEQ-ID-Nr. 6).

[0077] Die PCR wurde mit 25 Amplifizierungszyklen (94° C, 1 Min., 37° C, 2 Min., 72° C, 3 Min.) durchgeführt. Die PCR-Sonde wurde gelgereinigt, radioaktiv markiert und mit den obigen Koloniefiltern hybridisiert. Mehrere Kolonien waren positiv hinsichtlich einer Hybridisierung mit der PEP4-Sonde und wurden erneut auf LB+Ampicillin-Platten für Einzelkolonien ausgestrichen. Plasmid-DNA wurde durch die alkalische SDS-Lyse (Sambrook et al., oben) aus mehreren der Isolate präpariert und mit BamHI verdaut. Die erwartete 14-kbp-Vektorbande und 6,9-kbp-PEP4-Insertbande wurden beobachtet. Nach Doppelverdauung mit EcoRI plus XhoI wurde die erwartete 1,5-kbp-Bande für PEP4 beobachtet. Ein Isolat (Stamm # 860), welches die erwarteten Ergebnisse zeigte, wurde für die weitere Verwendung ausgewählt. Plasmid-DNA aus dem Stamm # 860 wurde mit BamHI verdaut und das 6,9-kbp-BamHI-DNA-Fragment, welches das chromosomale PEP4-Gen trägt, wurde in die BamHI-Stelle von pUC13 subkloniert, um das Plasmid p890 zu ergeben. Das Plasmid p890 wurde dann mit NcoI (welches innerhalb der für PEP4 codierenden Sequenz spaltet) verdaut, gelgereinigt, durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und mit dem glattendigen 1,1-kbp-Fragment, welches das funktionelle URA3-Gen trägt (hergestellt wie in Beispiel 2), ligiert. Das resultierende Plasmid, welches das PEP4-Gen unterbrochen von dem URA3-Gen enthält, wurde als pUC13-pep4::URA3 (Stamm # 906) bezeichnet.

RFERENZBEISPIEL 8

Konstruktion des Hefestammes # 1569, welcher ein Derivat des Stammes U9 ist, das sowohl prb1- als auch pep4-Mutationen enthält

[0078] Zur Unterbrechung des HIS3-Gens in dem Stamm U9 wurde der Unterbrechungsvektor pUC18-his3::URA3 mit EcoRI plus XbaI verdaut und dann zur Transformation des Stammes U9 nach dem Lithiumacetat-Verfahren verwendet. Ura^+-Transformanten wurden auf Agarmedium ohne Uracil selektioniert und auf demselben Medium für klonale Isolate erneut ausgestrichen. Eine Reihe der resultierenden Ura^+-Isolate wurde dann auf Agarmedium, dem entweder Uracil oder Histidin fehlte, replika-plattiert und hinsichtlich derjenigen gescreent, welche sowohl Ura^+ als auch His^- waren. Ein Isolat (Stamm # 1524) wurde für die anschliessende Unterbrechung des PRB1-Gens ausgewählt. Der PRB1-Genunterbrechungsvektor pUC18-prb1::HIS3 wurde mit SacI plus XbaI verdaut und dann zur Transformation des Stammes # 1524 nach dem Lithiumacetat-Verfahren verwendet. His^+-Transformanten wurden auf Agarmedium ohne Histidin selektioniert und für klonale Isolate auf demselben Medium erneut ausgestrichen. Genomische DNA wurde aus einer Reihe der His^+-Isolate präpariert und mittels Southernblot-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten PRB1-Sonde beurteilt. Eines der Isolate (Stamm # 1537), welches die gewünschte Unterbrechung des PRB1-Gens durch HIS3 zeigte (d.h., prbI::HIS3), wurde für die anschließende Unterbrechung des PEP4-Gens ausgewählt. Der Stamm # 1537 wurde einer Passage auf FOA-Platten unterworfen, um ura3-Isolate zu erhalten, und ein Isolat (Stamm # 1541) wurde für die weitere Verwendung ausgewählt.

[0079] Zur Unterbrechung des PEP4-Gens in dem Stamm # 1541 wurde der PEP4-Genunterbrechungsvektor pUC13-pep4::URA3 mit XhoI verdaut, um eine lineare pep4::URA3-Unterbrechungskassette zu schaffen, und für die Transformation des Stammes # 1541 nach dem Lithiumacetat-Verfahren eingesetzt. Ura^+-Transformanten wurden auf Uracil-Minus-Agarmedium selektioniert und für klonale Isolate auf demselben Medium ausgestrichen. Genomische DNA wurde aus einer Anzahl der Ura^+-Transformanten präpariert und mittels Southernblots unter Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde für das PEP4-Gen beurteilt. Ein Isolat (Stamm # 1569), welches die gewünschte Unterbrechung des PEP4-Gens durch das URA3-Gen zeigte, wurde für die weitere Verwendung ausgewählt.

REFERENZBEISPIEL 9

Konstruktion des CRPV-L1-Expressionsvektors

[0080] Das CRPV-L1-Gen wurde mittels PCR aus

dem Plasmid pLAII, welches das vollständige CRPV-Virusgenom enthält (Dr. Peter Howley, NCI), unter Verwendung von Vent-Polymerase (New England Biolabs, Inc.), amplifiziert; es wurden 35 Amplifizierungszyklen (94° C, 1 Min.; 50° C, 1 Min.; 72° C, 2 Min.) und die folgenden Oligonukleotid-Primer, welche flankierende Bgl II-Stellen (unterstrichen) enthalten, eingesetzt:
Sense-Primer: 5'-GAA GAT CTT CAA AAC AAA ATG GCA GTG TGG CTG TCT AC-3' (SEQ-ID-Nr. 7)
Antisense-Primer: 5'-GAA GAT CTT TAT TAA GTA CGT CTC TTG CGT TTAG-3' (SEQ-ID-Nr. 8)

[0081] Der Sense-Primer führt eine nicht-translatierte Hefe-Leadersequenz unmittelbar stromaufwärts des CRPV-L1-Initiations-Methionincodons (in Fettdruck hervorgehoben) ein. Das 1,6-kb-L1-PCR-Produkt wurde mit Bgl II verdaut, gelgereinigt und in die Bgl II-Stelle des Vektors pSP72 (Promega) subkloniert, um das Plasmid pSP72-CRPV-L1 (p12930-314-4-1) zu ergeben.

[0082] Ein Subklon wurde vollständig sequenziert und befunden, sich in vier Nukleotiden von der veröffentlichten CRPV-L1-Sequenz zu unterscheiden. Die Veränderungen führen nicht zu Aminosäureänderungen. Das L1-Gen wurde aus pSP72-CRPV-L1 als Bgl II-Fragment ausgeschnitten und in die nur einmal vorkommende BamHI-Stelle, die sich zwischen dem Hefe-GAL10-Promotor und dem ADH1-Transkriptionsterminator in dem Hefe-Expressionsvektor pC1/1-GAL10p-ADH1t, welcher den GAL10-Promotor aus YEp52 (Broach et al., Exp. Manipulation of Gene Expression, 1983, 83: 81-116) und den ADH1-Transkriptionsterminator in einem pC1/1-Vektorgerüst enthält, subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde als p12930-323-6-1 bezeichnet.

REFERENZBEISPIEL 10

Konstruktion des CRPV-L2-Expressionsvektors

[0083] Das CRPV-L2-Gen wurde mittels PCR unter Verwendung von Vent-Polymerase (New England Biolabs, Inc.) aus dem Plasmid pLAII nach Verdauung des Plasmids mit SalI, Gelreinigung des 7,9-kb-Fragments und Selbstligierung amplifiziert. 35 Amplifizierungszyklen (90° C, 1 Min.; 50° C, 1 Min.; 72° C, 2 Min.) und Oligonukleotid-Primer, welche flankierende EcoR I-Stellen (unterstrichen) enthalten, wurden verwendet:
Sense-Primer: 5'-GGA ATT CAC AAA ACA AAA TGG TTG CAC GGT CAC GAA AAC-3' (SEQ-ID-Nr. 9)
Antisense-Primer: 5'-GGA ATT CTT ATT CTG CGT AGA CAG CCA CAC TG-3' (SEQ-ID-Nr. 10)

[0084] Der Sense-Primer führt eine nicht-translatierte Hefe-Leadersequenz unmittelbar stromaufwärts des CRPV-L1-Initations-Methionincodons (in Fettdruck hervorgehoben) ein. Das 1,5-kb-PCR-Produkt wurde mit EcoR I verdaut, gelgereinigt und in die EcoR I-Stelle des bidirektionalen Promotor-Vektors pUC18-GAL1p-Gal10p, enthaltend den divergenten Hefe-Gal1/Gal10-Promotor, subkloniert. Dieser Vektor enthält eine nur einmal vorkommende BamHI-Stelle zwischen dem GAL1-Promotor und einer ersten Kopie des ADH1-Transkriptionsterminators, nur einmal vorkommende EcoR I- und Sma I-Stellen, lokalisiert zwischen dem GAL10-Promotor und einer zweiten Kopie des ADH1-Transkriptionsterminators. Die resultierende Expressionskassette wird von einem 1,4-kb-SphI-Fragment getragen. Ein Klon (p12930-295-2-2), enthaltend das gewünschte L2-Insert neben dem GAL10-Promotor, wurde vollständig sequenziert und von ihm gezeigt, dass es 6 Nukleotidaustausche gegenüber der veröffentlichten Sequenz enthält, von denen vier zu Aminosäureänderungen führen. Eine Sequenzanalyse der ursprünglichen Matrizen-DNA bestätigte, dass die Veränderungen auch in pLAII vorhanden waren und nicht durch die PCR eingeführt waren. Der pUC18-GAL1p-GAL10p-Vektor, enthaltend das L2-Gen, wurde mit SphI geschnitten und das 2,9-kb-Fragment, welches die ADH1t-GAL1p-GAL10p-L2-ADH1t-Expressionskassette beherbergte, wurde mit dem großen Sph1-Fragment des Hefe-Shuttlevektors pC1/1 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als p12930-323-2-3 (pC1/1-GAL1p-GAL10p-CRPV-L2) bezeichnet.

REFERENZBEISPIEL 11

Expression von CRPV-L1- und CRPV-L2-Kapsidprotein in Hefe

[0085] Die Plasmide p12930-323-6-1 und p12930-323-2-3 (pC1/1-GAL10p-CRPV/L1 und pC1/1-GAL1p-GAL10p-CRPV/L2) wurden zur Transformation der S. cerevisiae-Stämme # 1569, BJ5462 [E. W. Jones, Methods in Enzymology 194 (1991), 428-453] und BJ1995 [Jones, ebenda] verwendet. Klonale Isolate wurden bei 30° C in YEHD-Medium, enthaltend 2 % Galactose, für 48-72 h gezüchtet. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Zellpellets mit Glasperlen aufgebrochen, Triton X-100 wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben und die resultierenden Zell-Lysate wurden hinsichtlich der Expression von CRPV-L1 und -L2 durch Immunoblot-Analysen beurteilt. Proben, die 40 µg zelluläres Gesamtprotein enthielten, wurden auf 12%igen Tris-Glycin-Gelen (Novex) unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen elektrophoresiert und auf PVDF-Membranen (Novex) elektrogeblottet. CRPV-L1- und -L2-Proteine wurden mit Hilfe von polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen L1 oder L2 (Gabe von Dr. John Kreider, Hershey Medical Center) als primäre Antikörper und an Meerrettichperoxidase gekoppeltes Protein A (Amersham Inc.) als sekundä-

rem Antikörper nachgewiesen. Die Membranen wurden mit dem chemolumineszierenden ECL™-Detection Kit (Amersham, Inc.) aufgearbeitet. Eine L1-Protein-Bande von 55-61 kD wurde in allen Proben nachgewiesen, welche das L1-Expressionsplasmid beherbergten, und eine L2-Protein-Bande von ungefähr 90 kD wurde in allen Proben aus Hefeklonen nachgewiesen, welche das L2-Expressionsplasmid beherbergten.

[0086] Kein Signal wurde in Proben, die von Hefeklonen stammten, welche das L1-Expressionsplasmid beherbergten, mit Anti-L2-Antiseren nachgewiesen oder umgekehrt.

REFERENZBEISPIEL 12

A. Reinigung von rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein

[0087] Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben. Zellen, bei –70° C gelagert, wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen an "L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM der Aufschlämmung zugegeben. Die Zellen wurden mittels 10 Durchgängen in einem Microfluidizer aufgebrochen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45 % Sucrose (Gew./Vol.) in L1-Puffer geschichtet und L1 wurde durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 h pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10-Volumen L1-Puffer resuspendiert und durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Tween-80 wurde dem Überstand bis zu einer Endkonzentration von 0,01 % (Vol./Vol.) zugegeben und der Überstand wurde bei Raumtemperatur durch Größenausschlusschromatographie auf einer 1700-ml-Säule (5 cm ID) von Sephacryl S-1000-Harz (Pharmacia) fraktioniert. Der Laufpuffer für diese Säule war 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,01 % (Vol./Vol.) Tween-80. Fraktionen, die gemäß einem Immunodotblot immunreaktives Material enthielten, wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer Amicon-Rührzelle mit einer YM-100-Flachfolienmembran (Molekulargewichtsausschluss 100.000) von 76 mm Durchmesser auf 1/6-Volumen konzentriert. Das Produkt wurde durch eine Millex-GV-Membran von 0,22 µm (Millipore) filtriert. Gereinigtes CRPV-L1-Kapsidprotein wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml an Aluminiumhydroxid adsorbiert.

B. Charakterisierung von rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein

[0088] Die Identität des Endprodukts wurde mittels Westernblots und durch N-terminale Sequenzanalyse bestätigt. Die Reinheit wurde mittels SDS/PAGE mit Coomassie und Silberfärbung und mittels "Solution Sieving Capillary Electrophoresis" (SSCE) mit einem optischen Nachweis bei 215 nm ermittelt. Die Präparation war gemäß SSCE zu 75 % reines L1.

REFERENZBEISPIEL 13

Reinigung von rekombinantem CRPV-L2-Kapsidprotein

[0089] Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben. Zellen, bei –70° C gelagert, wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen an "L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM der Aufschlämmung zugegeben. Die Zellen wurden mittels 10 Durchgängen in einem Microfluidizer aufgebrochen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45 % Sucrose (Gew./Vol.) in L1-Puffer geschichtet und L1 wurde durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 h pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10-Volumen L1-Puffer resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Tween-80 wurde dem Überstand bis zu einer Endkonzentration von 0,01 % (Vol./Vol.) zugegeben und der Überstand wurde bei Raumtemperatur durch Größenausschlusschromatographie auf einer 1700-ml-Säule (5 cm ID) von Sephacryl S-1000-Harz (Pharmacia) fraktioniert. Der Laufpuffer für diese Säule war 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,01 % (Vol./Vol.) Tween-80. Fraktionen, die immunreaktives Material gemäß Immunodotblot enthielten, wurden vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Silber) und durch Westernblots analysiert.

REFERENZBEISPIEL 14

A. Reinigung von rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein – Schema 1

[0090] Zellen, die bei –70° C gelagert worden waren, wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen Aufbruchpuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden der Aufschlämmung bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellen wurden mittels 10 Passagen in einem Microfluidizer lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45%iger Sucrose (Gew./Vol.) in L1-Puffer geschichtet und L1 wurde durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 h pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen L1-Puffer resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde durch Zentrifugation mit 5000

x g für 10 Minuten geklärt. Tween-80 wurde dem Überstand bis zu einer Endkonzentration von 0,01 % zugegeben und der Überstand wurde bei Raumtemperatur durch Größenausschlusschromatographie auf einer 1700-ml-Säule (5 cm ID) von Sephacryl S-1000-Harz (Pharmacia) fraktioniert. Der Laufpuffer für diese Säule war 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,01 % Tween-80. Fraktionen, die gemäß Immunodotblot-Assay immunreaktives Material enthielten, wurden gepoolt und durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Amicon-Rührzelle mit einer YM-100-Flachfolienmembran (Molekulargewichtsausschluss 100.000) von 76 mm Durchmesser auf 1/6 Volumen konzentriert. Das Produkt wurde durch eine Millex-GV-Membran von 0,22 µm (Millipore) steril filtriert.

B. Charakterisierung von rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein

[0091] Die Identität des Endprodukts wurde mittels Westernblots und durch N-terminale Sequenzanalyse bestätigt. Die Reinheit wurde mittels SDS/PAGE mit Coomassie und Silberfärbung und mittels "Solution Sieving Capillary Electrophoresis" (SSCE) mit einem optischen Nachweis bei 215 nm festgestellt. L1 war gemäß SSCE zu 75 % rein. Die Elektronenmikroskopie zeigte, dass VLP im Größenbereich von 50-55 nm Durchmesser vorhanden waren.

C. Analytische Größenausschluss-HPLC

[0092] Zur Untersuchung hinsichtlich VLP wurden Proben durch Größenausschlusschromatographie nach der Größe fraktioniert. Die Chromatographie wurde mit einer Perkin-Eimer Series 410 Biopump-HPLC-Vorrichtung mit einem ISS 100-Autoinjektor, der mit einer 200-Mikroliter-Einspritzschleife ausgerüstet war, durchgeführt. Die Säule war ein TSK-Gel G5000PW, 7,5 × 600 mm (TOSOHAAS, Montgomeryville, PA). Zur Überwachung der Proteinelution von der Säule wurde ein optischer Nachweis bei 280 nm mit einem Perkin-Elmer LC-235-Diodenanordnungsdetektor durchgeführt. Die mobile Phase war 0,5 M NaCl in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2. Die Durchflussrate betrug 0,5 ml/Min. und es wurden 1-Milliliter-Fraktionen gesammelt. Die Säulenkalibrierung erfolgte mit Proteinstandards von Sigma sowie rekombinantem Hepatitis B-Oberflächenantigen (Recombivax™, Merck & Co,. West Point, PA). Der Antigennachweis in Fraktionen, die während der Elution gesammelt wurden, erfolgt durch Immunodotblot-Assay.

D. Immunodotblot-Assay

[0093] Eine 10-Mikroliter-Probe einer jeden Fraktion wurde auf einen Streifen von PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) aufgebracht, welcher vorgetränkt und auf angefeuchtes Fließpapier plaziert worden war. Der Probe wurde gestattet, in die Membran einzusickern, und die Membran wurde in eine Blockierungslösung (5 % (Gew./Vol.) von fettfreier Trockenmilch, gelöst in 0,15 M NaCl, 0,02 % (Gew./Vol.) Natriumazid und 0,01 M Natriumphosphat, pH 7,2) gebracht und bei Raumtemperatur unter sanfter mechanischer Bewegung für ein Minimum von drei Stunden inkubiert. Die Blockierungslösung wurde dekantiert und durch eine Lösung des primären Antikörpers ersetzt.

[0094] Der verwendete primäre Antikörper variierte in Abhängigkeit von dem nachzuweisenden Antigen: CRPV-L1 wurde mit dem Anti-CRPV-Kaninchenserum "late response" (Biodesign International, Kennebunk, ME) sondiert. CRPV-L2 wurde mit Anti-CRPV-L2-Kaninchenserum sondiert. HPV6a-L1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper MAB 837 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) sondiert. HPV6a-L2 wurde mit Anti-HPV6a-L2-trpE-Fusions-Mausserum sondiert.

[0095] Die Sichtbarmachung der Immunkomplexe erfolgte nach Standardverfahren unter Verwendung eines sekundären Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, und des chromogenen Substrats NBT/BCIP.

E. Lösungssiebkapillarelektrophorese (SSCE)

[0096] Proben von CRPV-VLP (ungefähr 0,2 mg/ml) wurden 15 Min. lang bei 100° C in 1 % 2-Mercaptoethanol und 1 % (Gew./Vol.) SDS erwärmt. Die Probe wurde elektrokinetisch zusammen mit einem Referenzmarker, Mellitsäure, auf eine silica-gesinterte Kapillare, 42 cm (22 cm bis zum Detektor) x 0,05 mm Innendurchmesser, voräquilibriert mit 10 Hohlraumvolumina an 0,1 N NaOH, Wasser, und ProSort-Siebreagens (Applied Biosystems, Foster City, CA) aufgebracht. Eine Trennungsspannung von 300 Volt/cm wurde unter Verwendung eines Applied Biosystems Modell 270 A-HT CE-Instruments angewandt. Die Elution der Probe wurde durch Extinktion bei 215 nm überwacht und die Daten unter Verwendung einer Nelson Turbochrom 3-Software gewonnen.

F. Herstellung von Vakzin aus rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein

[0097] Gereinigtes CRPV-L1-Kapsidprotein wurde an $Al(OH)_3$ in einer Konzentration von 100 µg/ml adsorbiert.

REFERENZBEISPIEL 15

Schutz gegen eine von CRPV verursachte Papilloma-Entwicklung durch Impfung mit CRPV-L1-VLPs aus Hefe

[0098] Fünf weiße Neuseelandkaninchen wurden

intramuskulär mit entweder 135 mg L1-VLPs (75 % rein, siehe Beispiel 17), adsorbiert an Alaun, oder 100 mg rekombinantes Hepatitis B-Oberflächenantigen (99 % rein), adsorbiert an Aluminiumhydroxid, als negative Kontrolle immunisiert. Die Tiere erhielten zwei weitere Auffrischungsimpfungen im Verlauf von 8 Wochen, bevor sie mit CRPV 10 Tage nach der letzten Auffrischung herausgefordert wurden. Die Seren, die vor der Immunisierung, bei jeder Auffrischung und vor der Herausforderung entnommen worden waren, wurden mit einem L1-VLP-spezifischen ELISA analysiert. Ein indirekter ELISA-Assay wurde zur Bestimmung von Serumantikörper-Reaktionen auf in Hefe exprimierte CRPV-L1-VLPs verwendet. Die bei dem ELISA verwendeten Antigene waren CRPV-L1-VLPs, exprimiert in Insektenzellen mit rekombinantem Baculovirus im wesentlichen wie von Christensen et al. (J. Virol. 64: 3151-3156, 1990; J. Gen. Virol. 75: 2271-2276 (1994)) beschrieben. Antikaninchen-Ziegen-IgG-alkalische Phosphatase wurde als sekundärer Antikörper verwendet und p-Nitrophenylphosphat als Substrat (Kirkegaard und Perry Labs., Inc.). Die Extinktion wurde bei 405 nm gemessen. Der Titer wurde durch Endpunkt-Verdünnung bestimmt (dreifache Verdünnungen von Seren, beginnend bei 1:100) und als positiv angesehen, falls die L1-spezifische Extinktion die mittleren Extinktionsablesungen plus zwei Standardabweichungen von Kaninchen-Vorimmunseren überstieg. Exakte Titer wurden anhand dieser Daten unter Verwendung des SOFTmax-Programms, Version 2.3 (Molecular Devices Inc., Menlo Park, CA), berechnet.

[0099] Anti-L1-VLP-Antikörpertiter waren vier Wochen nach der ersten Immunisierung vorhanden und sie nahmen mit jeder zusätzlichen Auffrischungsimpfung zu. Die Kontrolltiere waren negativ. 6 Wochen nach der CRPV-Herausforderung waren die geimpften Tiere an 15 von 15 Stellen warzenfrei (1:2 verdünnte oder 1:12 verdünnte Virus-Stammlösung), während die Kontrolltiere eine Warzenbildung an 12 von 15 Stellen (1:2 verdünntes Virus) oder 9 von 15 (1:12 verdünntes Virus) zeigten. Nach 15 Wochen waren die geimpften Tiere immer noch warzenfrei.

[0100] Virus-Neutralisations-Assays wurden (im wesentlichen nach dem Verfahren von Christensen et al., 1991, Virology 181: 572-579) durch Mischen von Kaninchenseren mit CRPV und anschließende Herausforderung von Kaninchen mit dem behandelten CRPV durchgeführt. Der Standard für die Bestimmung eines neutralisierenden Antikörpers war vollständige Virus-Neutralisation (3/3 Stellen negativ für Warzenbildung). Seren von den fünf geimpften Tieren und fünf Kontrolltieren wurden analysiert. Die nach einer Dosis von CRPV-L1-VLPs gewonnenen Seren enthielten Antikörper, welche unverdünntes Virus in 80 % der Kaninchen (4/5) vollständig neutralisierten. Nach zwei oder drei Dosen von CRPV-L1-VLPs besaßen 100 % der Kaninchen (5/5) virus-neutralisierende Antikörper. Kontrollseren zeigten keinerlei virus-neutralisierende Aktivität. In Abhängigkeit von den endgültigen Titern konnten die Seren ausgewählter geimpfter Tiere zwischen 10-1000fach verdünnt werden und waren immer noch zu 100 % neutralisierend.

[0101] Um zu testen, ob die neutralisierende Antikörperreaktion für native CRPV-L1-VLPs spezifisch war, wurde ein Immunserum ausgewählt und mit Nitrocellulosequadraten inkubiert, welche mit entweder nativen oder denaturierten CRPV-L1-VLPs aus Hefe beschichtet worden waren. Nitrocellulosequadrate (1 cm^2) wurden mit entweder nativen oder denaturierten (reduziert und alkyliert mit Iodessigsäure in 8 M Harnstoff) in Hefe exprimierten CRPV-L1-VLPs beschichtet. Native oder denaturierte Hefeextrakte wurden als Kontrollen verwendet. Kaninchen-Immunserum wurde in Reihe viermal mit den Nitrocellulosequadraten für 8-14 h bei 40° C inkubiert, bevor es in dem Virus-Neutralisations-Assay wie oben beschrieben getestet wurde. Nur native CRPV-L1-VLPs waren in der Lage, die für die Neutralisierung von CRPV verantwortlichen Antikörper zu absorbieren, während denaturierte oder Kontroll-Hefeproteine diese Antikörper nicht absorbierten. Darüber hinaus entfernten native CRPV-L1-VLPs auch die ELISA-Reaktivität gegenüber CRPV-L12-VLPs, die in Insektenzellen exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt).

REFERENZBEISPIEL 16

Konstruktion eines Vektors für die Coexpression von CRPV-L1/L2 von einem einzigen Plasmid

[0102] Das Plasmid pSP72-CRPV-L1 (p12930-314-4-1) wurde mit BglII verdaut und das 1,5-kbp-BglII-Fragment, welches den CRPV-L1-ORF mit einer 5'-untranslatierten Hefe-Leadersequenz trug, wurde gelgereinigt. Das Plasmid p12930-323-2-3 (pC1/1-GAL1p-GAL10p-CRPV-L2) wurde mit BamHI verdaut, welches zwischen dem GAL1-Promotor und dem ADH1-Transkriptionsterminator spaltet. Das lineare Vektorfragment wurde gelgereinigt und dann mit dem vorgenannten CRPV-L1-BglII-Fragment ligiert, um das Plasmid p12930-366-1-2 (pC1/1-GAL1/10p-CRPV/L1 + L2) zu ergeben. Dieses resultierende Plasmid enthält den CRPV-L1-ORF unter der Kontrolle des GAL1-Promotors und den CRPV-L2-ORF unter der Kontrolle des GAL10-Promotors.

REFERENZBEISPIEL 17

Konstruktion eines Vektors für die Coexpression von CRPV-L1/L2 von zwei Plasmiden

[0103] Der Vektor pUC18-GAL1p-GAL10p, enthaltend das L2-Gen, wurde mit SphI gespalten und das 2,9-kb-Fragment, welche die

ADH1t-GAL1p-GAL10p-L2-ADH1t-Expressionskassette beherbergte, wurde gelgereinigt und durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht. Der Hefe-Shuttlevektor YEp24 [Botstein et al., Gene 8:17 (1979)] wurde mit BamHI verdaut, durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht, mit alkalischer Kalbsdarmphosphatase dephosphoryliert und dann mit der obigen glattendigen L2-Expressionskassette ligiert, um das Plasmid p1594 zu ergeben.

REFERENZBEISPIEL 18

Coexpression von CRPV-L1 und -L2 in Hefe

[0104] Das Plasmid p12930-366-1-2 (pC1/1-GAL1/10p-CRPV/L1 + L2) wurde zur Transformation der S. cerevisiae-Stämme # 1569 und BJ5462 eingesetzt (1-Plasmid-System) und die resultierenden Transformanten wurden auf synthetischem Leucin-Minus-Agarmedium selektioniert. In einem parallelen Experiment wurde der Stamm 1569 mit dem pC1/1-GAL10p-CRPV-L1-Expressionsvektor p12930-323-6-1 plus dem YEp24-GAL10p-L2-Expressionsvektor p1594 cotransformiert (2-Plasmid-System) und die resultierende Transformanten, die beide Vektoren enthielten, wurden auf synthetischem Agarmedium selektioniert, dem sowohl Leucin als auch Uracil fehlte. Klonale Isolate für sowohl das 1-Plasmid-System als auch das 2-Plasmid-System wurden bei 30°C in YEHD-Komplexmedium, das 2% Galactose enthielt, 48-72 Stunden lang gezüchtet. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Zellpellets mit Glasperlen aufgebrochen. Triton X-100 wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben und Zelllysate wurden hinsichtlich der Expression von CRPV-L1 und -L2 durch Immunoblot-Analyse analysiert. Proben, die 50 µg zelluläres Gesamtprotein enthielten, wurden einer Elektrophorese auf 8-16%igen Tris-Glycin-Gradientengelen (Novex) unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen unterworfen und auf PVDF-Membranen (Novex) elektrogeblottet. CRPV-L1- und L2-Proteine wurden mit Hilfe polyklonaler Anti-L1- oder Anti-L2-Kaninchenantiseren (Gabe von Dr. John Kreider, Hershey Medical Center) als primäre Antikörper und Protein A in Kopplung mit Meerettichperoxidase (Amersham, Inc.) als sekundärer Antikörper nachgewiesen. Die Membranen wurde mit Hilfe des chemolumineszierenden ECL™ Detection Kit (Amersham, Inc.) aufgearbeitet. Eine L1-Proteinbande von 55-61 kD und eine L2-Proteinbande von ~ 90 kD wurde in allen Proben von Hefenklonen nachgewiesen, welche das L1 + L2-Expressionsplasmid beherbergten. Kein Signal für L2 wurde in Proben nachgewiesen, die von Hefeklonen stammten, welche das Expressionsplasmid für L1 beherbergten. Kein Signal für L1 wurde in Proben aus Zellen nachgewiesen, die nur den L2-Expressionsvektor enthielten.

RFERENZBEISPIEL 19

Reinigung von CRPV-L1- und CRPV-L1 + L2-VLPs für EM-Studien

[0105] Die in Hefe exprimierten CRPV-L1- und CRPV-L1- und -L2-Proteine wurden für elektronenmikroskopische (EM)-Studien partiell gereinigt und konzentriert. 1 bis 1,5 Liter YEHD-Medium, enthaltend 2 % Galactose, wurden mit dem S. cerevisiae-Stamm # 1569 oder BJ5462, transformiert mit dem L1 + L2-Coexpressionsvektor p12930-366-1-2 (pC1/1-GAL1/10p-CRPV/L1 + L2), angeimpft und 48-72 Stunden lang bei 30° C gezüchtet. In einem parallelen Experiment wurden Zellen des Stammes # 1569, cotransformiert mit dem GAL10p-CRPV-L1-Expressionsvektor p12930-323-6-1 plus dem YEp24-GAL10p-L2-Plasmid p1594, auf ähnliche Weise gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet und Zellpellets bei –70°C eingefroren. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellpellets wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen an „L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteininhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden der Aufschlämmung in einer Endkonzentration von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellen wurden durch 3-5 Passagen in einem Microfluidizer lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45%iger (Vol./Vol.) Sucrose in L1-Puffer geschichtet und die L1-, L2- oder L1- und L2-Proteine wurden durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 Stunden pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10 des Volumens an L1-Puffer resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Min. geklärt.

[0106] Für die EM-Analyse (Structure Probe, Westchester, PA) wurde ein Aliquot einer jeden Probe auf kohlenstoffbeschichtete 200-Mesh-Kupfergitter plaziert. Ein Tropfen von 2%iger Phosphorwolframsäure (PTA), pH 7,0, wurde 20 Sekunden lang auf das Gitter plaziert. Die Gitter wurden vor der TEM-Untersuchung lufttrocknen gelassen. Die gesamte Mikroskopie erfolgte mit Hilfe eines JEOL 1000X-Transmissionselektronenmikroskops (JEOL USA, Inc.) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV. Die gemachten mikroskopischen Aufnahmen besaßen eine 100.000fache Endvergrößerung.

[0107] In allen Hefeproben, welche entweder das CRPV-L1-Expressionsplasmid oder Plasmide für die Coexpression von CRPV-L1 und -L2 beherbergten, wurden VLPs in dem Größenbereich von 50-55 nm Durchmesser beobachtet. Keine VLP wurde in Hefekontrollproben oder in Hefeproben, welche das L2-Expressionsplasmid allein beherbergten, beobachtet (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9).

BEISPIEL 1

Reinigung von rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein – Schema 2

[0108] Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0109] Zellen, die bei –70° C gelagert worden waren, wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen an Aufbruchpuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden der Aufschlämmung bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines BioNeb Cell Disruptor-Systems (Glas-Col Apparatus Co., Terra Haute, IN) lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt.

[0110] Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45%iger Sucrose (Gew./Vol.) in L1-Puffer geschichtet und L1 wurde durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 h pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen L1-Puffer resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt.

[0111] Der Überstand wurde 1:5 mit PBS verdünnt, erneut durch Zentrifugation in einem Sorvall SA-600-Rotor mit 6500 UpM für 10 Minuten bei 4° C geklärt. Der Überstand wurde durch ein 0,22-Mikron-Spritzenfilter filtriert und mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert.

[0112] Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer Perkin-Eimer Series 410 Biopump-HPLC-Vorrichtung mit einer 5-Milliliter-Einspritzschleife durchgeführt. Das Chromatographiemedium war ein Fractogel-EMF-TMAE-650 (S)-25-40-Mikron-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ) in einer Glassäule von 150 mm × 10 mm Innendurchmesser. Zur Überwachung der Proteinelution von der Säule wurde ein optischer Nachweis bei 280 nm mit einem Perkin-Eimer LC-235-Diodenanordnungsdetektor durchgeführt. Die Säule wurde mit 0,15 M NaCl in 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 (Puffer A), voräquilibriert. Die Säule wurde mit einer Durchflussrate von 0,75 ml/Min. betrieben. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule mit Puffer A gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Gebundenes Material wurde mit einem linearen Konzentrationsgradienten von Natriumchlorid, 0,15 M bis 0,65 M, für 5 Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten von 0,65 M bis 1,15 M für 30 Minuten, eluiert. Der Antigennachweis in Fraktionen, die während der Elution gesammelt worden waren, erfolgte durch Immunodotblot-Assay. Fraktionen, die immunreaktives Material enthielten, (d.h. Fraktionen, die zwischen 0,81 M und 1,05 M NaCl eluierten) wurden gepoolt.

[0113] Die gepoolten Fraktionen wurden in Macrosep-Zentrifugationskonzentrationsvorrichtungen (Filtron Technology Corp., Northborough, MA) auf 1/5 Volumen konzentriert.

[0114] Das Konzentrat wurde durch Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von Sephacryl S-1000 SF-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) in einer Säule von 87 cm × 27 mm Innendurchmesser fraktioniert. Die Säule wurde bei einer Durchflussrate von 2,5 ml/Min. betrieben. Die Proteinelution wurde mittels Extinktion bei 280 nm überwacht. Antigen wurde durch Immunoblot nachgewiesen.

[0115] Fraktionen, die immunreaktives Material enthielten, wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer Rührzelle (Amicon, Inc., Beverly, MA) mit einer YM-100-Flach-folienmembran von 43 mm Durchmesser (Amicon, Inc., Beverly, MA) unter Stickstoff bei 10 psi Druck konzentriert.

[0116] Das Endprodukt wurde durch SDS/PAGE mit Coomassiefärbung und durch Lösungssiebkapillarelektrophorese (SSCE) charakterisiert. Das Endprodukt von Schema 2 war gemäß SSCE zu 88 % rein.

BEISPIEL 2

A. Reinigung von rekombinantem CRPV-L1-Kapsidprotein – Schema 3

[0117] Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0118] Zellen, die bei –70° C gelagert worden waren, wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen an Aufbruchpufter (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden der Aufschlämmung bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines BioNeb Cell Disruptor-Systems (Glas-Col Apparatus Co., Terra Haute, IN) lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt.

[0119] Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45%iger Sucrose (Gew./Vol.) in L1-Puffer geschichtet und L1 wurde durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 h pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen L1-Puffer resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt.

[0120] Der Überstand wurde mit 1/2 Volumen Chloroform extrahiert. Die wässerige Schicht wurde entfernt und durch Zentrifugation mit 12.000 UpM in einer Beckman-Mikrozentrifuge für 5 Minuten bei

Raumtemperatur geklärt.

[0121] Der Überstand wurde 1:5 mit PBS verdünnt, erneut durch Zentrifugation in einem Sorvall SA-600-Rotor mit 6500 UpM für 10 Minuten bei 4° C geklärt. Der Überstand wurde durch ein 0,22-Mikron-Spritzenfilter filtriert und durch Anionenaustauschchromatographie fraktioniert.

[0122] Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer Perkin-Eimer Series 410 Biopump-HPLC-Vorrichtung mit einer 5-Milliliter-Einspritzschleife durchgeführt. Das Chromatographiemedium war ein Fractogel-EMF-TMAE-650 (S)-25-40-Mikron-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ) in einer Glassäule von 150 mm × 10 mm Innendurchmesser. Zur Überwachung der Proteinelution von der Säule wurde ein optischer Nachweis bei 280 nm mit einem Perkin-Eimer LC-235-Diodenanordnungsdetektor durchgeführt. Die Säule wurde mit 0,15 M NaCl in 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 (Puffer A), voräquilibriert. Die Säule wurde mit einer Durchflussrate von 0,75 ml/Min. betrieben. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule mit Puffer A gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Gebundenes Material wurde mit einem linearen Konzentrationsgradienten von Natriumchlorid, 0,15 M bis 0,65 M, für 5 Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten von 0,65 M bis 1,15 M für 30 Minuten, eluiert. Der Antigennachweis in Fraktionen, die während der Elution gesammelt worden waren, erfolgte durch Immunodotblot-Assay. Fraktionen, die immunreaktives Material enthielten, (d.h. Fraktionen, die zwischen 0,81 M und 1,05 M NaCl eluierten) wurden gepoolt.

[0123] Die gepoolten Fraktionen wurden in Macrosep-Zentrifugationskonzentrationsvorrichtungen (Filtron Technology Corp., Northborough, MA) auf 1/5 Volumen konzentriert.

[0124] Das Konzentrat wurde durch Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von Sephacryl S-1000 SF-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) in einer Säule von 87 cm × 27 mm Innendurchmesser fraktioniert. Die Säule wurde bei einer Durchflussrate von 2,5 ml/Min. betrieben. Die Proteinelution wurde mittels A_{280} nm überwacht. Antigen wurde durch Immunoblot nachgewiesen.

[0125] Fraktionen, die immunreaktives Material enthielten, wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer Rührzelle (Amicon, Inc., Beverly, MA) mit einer YM-100-Flachfolienmembran von 43 mm Durchmesser (Amicon, Inc., Beverly, MA) unter Stickstoff bei 10 psi Druck konzentriert.

[0126] Das Endprodukt wurde durch SDS/PAGE mit Coomassiefärbung und durch Lösungssiebkapillarelektrophorese (SSCE) charakterisiert. Das Endprodukt von Schema 3 war gemäß SSCE zu 95 % rein.

REFERENZBEISPIEL 20

Expression von CRPV-L1 und HPV Typ 6a-L1 (Stamm 1644) in angereicherten komplexen und chemisch definierten Medien

[0127] Die Impfgüter für diese Stämme wurden in leucin-freiem synthetischen Medium wie oben für den Transfer zu Schüttelkolbenkulturen beschrieben entwickelt. Die verwendeten Schüttelkolben wurden für eine hohe Belüftungskapazität (70 ml Flüssigkeit pro 300-ml-Kolben, Tunair Labware) mit einer Schikane versehen und die Medien wurden mit etwa 0,5 ml/l eines Antischaummittels (UCON LB-625, Union Carbide) ergänzt. Angereichertes komplexes Medium enthielt (pro l): 40 g Difco-Hefeextrakt, 20 g Sheffield-HySoy-Pepton, 30 g Glucose, 50 g Galactose; das Medium wurde vor der Sterilisation auf pH 5,3 eingestellt. Das verwendete chemisch definierte Medium war ähnlich dem von Oura (Biotechnol. Bioengineer. 16: 1197-1212, 1974) beschriebenen, jedoch ergänzt mit (pro l): 0,1 g Cholin-Cl, 0,4 g Adenin, 30 g Mononatriumglutamat als Stickstoffquelle, 0,2 g Uracil, 20 g Glucose, 40 g Galactose. Die Kolben wurden mit 3 ml Impfgut angeimpft und 66 Stunden lang bei 28°C, 250 UpM, auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Den Kolben wurden in Intervallen Proben entnommen für die Bestätigung der Expression durch Immunoblot unter Verwendung von Anti-CRPV-L1- und Anti-HPV 6a-L1-Antiseren.

REFERENZBEISPIEL 21

Klonierung des HPV6a-Genoms

[0128] Gewebe aus einem Patienten, bei dem schwere Condylomata acuminata diagnostiziert worden waren (zur Verfügung gestellt von Dr. Darron Brown, Indiana University School of Medicine) wurde durch Restriktionsenzymverdauung und Polymerasekettenreaktion (PCR) typisiert und befunden, HPV Typ 6a zu enthalten. DNA wurde aus der Gewebeprobe extrahiert und mit dem Enzym Hind III verdaut. Nach einer Größenfraktionierung durch ein präparatives 0,8%iges Agarosegel mit niedriger Schmelztemperatur wurde die 8-kb-Region aus dem Gel ausgeschnitten und die Agarose mit Gelase™-Enzym verdaut (Epicentre Technologies, Inc.). Die Probe wurde mit pUC18, welches mit Hind III verdaut und dephosphoryliert worden war (Pharmacia, Inc.), ligiert. Nach der Transformation kompetenter E. coli-DH5-Zellen (BRL) wurde die Plasmid-Bank hinsichtlich HPV6a-positiver Klone unter Verwendung eines ^{32}P-markierten Oligodesoxynukleotids, welches komplementär zu dem HPV6a-L1-Gen war, gescreent. Ein pUC18-Plasmid, welches das 8-kb-HPV6a-Genom enthielt, wurde isoliert und durch Restriktionsenzym- und Southernblot-Analy-

sen charakterisiert. Dieses Plasmid wurde als pUC18-HPV-6a bezeichnet. Das vollständige 8-kb-HPV6a-Genom wurde mit Hilfe des automatischen Sequenators von ABI (# 373A) nach den Anweisungen des Herstellers sequenziert.

[0129] Eine große vulvare Condyloma acuminatum-Läsion wurde von einer 25 Jahre alten Patientin nach einer Geburt erhalten. Ein Fragment der Läsion wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, dann mit einem Braun-Mikrodismembrator II (B. Braun Instruments, Melsungen, Deutschland) verarbeitet. Das resultierende Material wurde mit 0,6 % (Gew./Vol.) Natriumdodecylsulfat (SDS) solubilisiert, mit Proteinase K (50 µg/ml) behandelt und mit Phenol/-Chloroform/Isoamylalkohol behandelt. DNA wurde ethanolgefällt und mittels UV-Spektrophotometrie quantitativ bestimmt. Die Anwesenheit von DNA mit hohem Molekulargewicht wurde mittels Agarosegelelektrophorese, gefolgt von Anfärbung mit Ethidiumbromid, etabliert.

[0130] Der HPV-DNA-Typ wurde mit dem Hybrid-Einfang-Assay, der als ViraType Plus vermarktet wird (Digene Diagnostics, Beltsville, MD), bestimmt. Die verwendeten HPV-Sonden wurden in zwei Pools aufgeteilt, deren Zusammensetzung auf der Assoziation eines jeden Typs mit Tumoren des Genitaltrakts basiert. Sondengruppe A enthielt die Typen HPV6, 11, 42, 43 und 44 mit "niedrigem Risiko", während die Sonde B die "Hochrisiko"-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 und 56 enthielt. Gesamt-DNA wurde mit Pst I, BamH I und Hind III verdaut und Southernblots wurden unter Bedingungen hoher Stringenz (T_m - 15° C) durchgeführt, um den HPV-Subtyp zu bestimmen.

[0131] Zur Bestimmung der vollständigen HPV6a-Sequenz wurden Sequenzierungsprimer auf Grundlage der veröffentlichten HPV6b-Sequenz synthetisiert. Beide Stränge des vollständigen 8,1-kbp-HPV6a-Genoms wurden mit dem Didesoxykettenabbruchverfahren unter Verwendung des PRISM™-Kits und eines automatischen Sequenzierers (# 373A) von Applied Biosystems (ABI) nach den Anweisungen des Herstellers (ABI, Inc., Foster City, CA) sequenziert. In Fällen, in denen die Sense- und Antisense-Sequenz nicht übereinstimmten, wurden zusätzliche HPV6a-spezifische Primer synthetisiert, um in beiden Richtungen erneut über das fragliche Gebiet zu sequenzieren, um einen Konsensus zu erhalten.

[0132] Die DNA-Sequenzen von HPV6a und HPV6b zeigten über 97 % Identität mit insgesamt 229 bp Abweichungen, die unter 8010 bp identifiziert wurden. Die signifikantesten Unterschiede im Vergleich zu der HPV6b-Sequenz wurden in der langen Kontrollregion (LCR; nt 7205 – nt 106) gefunden. Abgesehen von mehreren Einzelnukleotid (nt)-Änderungen in der HPV6a-LCR wurde eine 94-bp-Insertion bei nt 7350 und eine weitere 19-bp-Insertion bei nt 7804 gefunden. Bei nt 7615 waren 6 Basenpaare aus dem HPV6a-Genom deletiert.

REFERENZBEISPIEL 22

Konstruktion eines HPV6a-L1-Hefe-Expressionsvektors

[0133] HPV-Typ 6a-DNA wurde als Matrize für eine PCR eingesetzt. Das HPV6a-L1-Gen wurde durch PCR unter Verwendung von Vent-Polymerase (New England Biolabs, Inc.), 35 Amplifizierungszyklen (94° C, 1 Min., 48° C, 1 Min., 72° C, 1 Min. 45 Sek.) und den folgenden Oligodesoxynukleotid-Primern, welche flankierende BglII-Stellen (unterstrichen) enthalten, amplifiziert:
Sense-Primer: 5'-CTC AGA TCT CAC AAA ACA AAA TGT GGC GGC CTA GCG ACA GCA CAG-3' (SEQ-ID-Nr. 11)
Antisense-Primer: 5'-GAG AGA TCT TAC CTT TTA GTT TTG GCG CGC TTA C-3' (SEQ-ID-Nr. 12)

[0134] Der Sense-Primer führt eine untranslatierte Hefe-Leadersequenz unmittelbar stromaufwärts des HPV6a-L1-Initiations-Methionincodons (in Fettdruck hervorgehoben) ein. Das 1,5-kbp-L1-PCR-Produkt wurde mit BglII verdaut und gelgereinigt. Der pC1/1-GAL-Expressionsvektor wurde konstruiert durch Isolierung des 1,4-kbp-SphI-Fragments aus dem bidirektionalen Promotor-Vektor pUC18-GAL1p-GAL10p, welcher den divergenten GAL1/GAL10-Promotor aus dem Plasmid pBM272 enthält (zur Verfügung gestellt von Dr. Mark Johnston, Washington University, St. Louis), flankiert auf jeder Seite von einer Kopie des Hefe-ADH1-Transkriptionsterminators [Bennetzen, J.L., und Hall, B.D. (1982), J. Biol. Chem. 257:3018-3025]. In der resultierenden Expressionskassette befindet sich eine BamHI-Stelle zwischen dem GAL1-Promotor und der ersten Kopie des ADH1-Transkriptionsterminators und eine SmaI-Klonierungsstelle zwischen dem divergenten GAL10-Promoter und der zweiten Kopie des ADH1-Transkriptionsterminators. Der Hefe-Shuttle-Vektor pC1/1 (Rosenberg et al., Nature 312 (1984), 77-80) wurde mit SphI gespalten und mit dem 1,4-kbp-SphI-GAL-Promotor-Fragment ligiert. Der resultierende Vektor, pC1/1-GAL, wurde mit BamHI linearisiert, welches zwischen dem GAL1-Promotor und dem ADH1-Transkriptionsterminator spaltet. Der BamHI-verdaute pC1/1-GAL-Vektor und das BglII-verdaute HPV6a-L1-PCR-Fragment wurden ligiert und zur Transformation von E. coli-DH5-Zellen (BRL) eingesetzt. Es wurde ein pC1/1-GAL-Plasmid isoliert, welches das HPV6a-L1-Gen enthält und als p13173-357-6 bezeichnet wurde. Das L1-Gen in p13173-357-6 wurde sequenziert (AB1-Sequenzierer # 373A) und befunden, mit dem L1-Gen in dem pUC18-HPV6a-Klon identisch zu sein.

REFERENZBEISPIEL 23

Konstruktion des HPV6a-L1- und -L2-Hefe-Expressionsvektors

[0135] Das Plasmid p13173-357-6 (pC1/1-GAL + HPV6a-L1) wurde mit SmaI verdaut, welches zwischen dem GAL10-Promotor und dem ADH1-Transkriptionsterminator spaltet. Das 1,4-kbp-HPV6a-L2-Gen wurde amplifiziert mittels PCR unter Verwendung der pUC18-HPV6a-DNA als Matrize, Vent-Polymerase (New England Biolabs, Inc.), 10 Zyklen PCR-Amplifizierung (94° C, 1 Min., 48° C, 1 Min., 72° C, 1 Min. 45 Sek.) und den folgenden Oligodesoxynukleotid-Primern, welche flankierende SmaI-Stellen (unterstrichen) enthalten:
Sense-Primer: 5'-TCC CCC GGG CAC AAA ACA AAA TGG CAC ATA GTA GGG CCC GAC GAC-3' (SEQ-ID-Nr. 13)
Antisense-Primer: 5'-TCC CCC GGG CTA GGC CGC CAC ATC TGA AAA AAA TAA GG-3' (SEQ-ID-Nr. 14)

[0136] Der Sense-Primer führt eine untranslatierte Hefe-Leadersequenz unmittelbar stromaufwärts des HPV6a-L2-Initiations-Methionincodons (in Fettdruck hervorgehoben) ein. Das PCR-Fragment wurde mit SmaI verdaut, gelgereinigt und mit dem SmaI-verdauten Plasmid p13173-357-6 ligiert. Ein pC1/1-GAL-Plasmid, enthaltend sowohl das HPV6a-L1- als auch das -L2-Gen, wurde isoliert und als p14049-7-2 bezeichnet. Das L2-Gen wurde sequenziert (ABI-Sequenzierer # 373A) und befunden, mit dem L2-Gen in dem pUC18-HPV6a-Klon identisch zu sein.

REFERENZBEISPIEL 24

Expression von HPV6a-L1 und Coexpression von HPV6a-L1 und -L2 in Hefe

[0137] Die Plasmide p13173-357-6 (pC1/1-GAL + HPV6a-L1) und p14049-7-2 (pC1/1-GAL + HPV6a-L1 und -L2) wurden zur Transformation der S. cerevisiae-Stämme # 1569 (MATα, leu2-04, prb1, ade1, pep4, cir°) und # 1558 (MATα, leu2-04, prb1, mnn9, ade1, cir°) verwendet. Die unter Verwendung des Wirtsstammes # 1558 erhaltenen resultierenden rekombinanten Stämme waren die Stämme # 1644 (HPV6a-L1) und # 1670 (HPV6a-L1 + L2) wie in der Tabelle gezeigt. Klonale Isolate wurden bei 30° C in YEHD-Medium, enthaltend 2 % Galactose, für 68-78 Stunden gezüchtet. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Zellpellets mit Glasperlen aufgebrochen und die Zelllysate hinsichtlich Expression von HPV6a-L1- oder HPV6a-L2-Protein durch Immunoblot-Analyse analysiert. Proben, die 40 µg zelluläres Gesamtprotein enthielten, wurden auf 10%igen Tris-Glycin-Gelen unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen elektrophoresiert und auf Nitrocellulosefilter elektrogeblottet. Das L1-Protein wurde mit Hilfe von Kaninchen-Antiseren, die gegen ein trpE-HPV11-Fusionsprotein induziert worden waren (Brown, D. R., et al., Virology 201:46-54), als primärer Antikörper und an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten ganzen Antikaninchen-Esel-IgG-Antikörper (Amersham, Inc.) als sekundärer Antikörper immunologisch nachgewiesen. Die Filter wurden mit dem chemolumineszierenden ECL™-Detection Kit (Amersham, Inc.) aufgearbeitet. Eine L1-Protein-Bande von 50-55 kD wurde in allen Proben nachgewiesen mit Ausnahme der negativen Kontrolle (pC1/1 ohne L1- oder L2-Gen).

[0138] Das L2-Protein wurde als 70-kD-Proteinbande durch Westernanalyse unter Verwendung von 1:250 verdünnten Seren aus Mäusen, welche dreimal mit einem trpE-HPV6a-L2-Fusionsprotein, hergestellt im wesentlichen nach dem Verfahren von Carter et al., immunisiert worden waren, als primärer Antikörper und HRP-gekoppeltem Anti-maus-Schaf-IgG (Amersham, Inc.) als sekundärer Antikörper (1:1000-Verdünnung) nachgewiesen.

[0139] Für die EM-Analyse (Structure Probe, West Chester, PA) wurde ein Aliquot einer jeden Probe auf kohlenstoffbeschichtete 200-Mesh-Kupfergitter plaziert. Ein Tropfen von 2%iger Phosphorwolframsäure (PTA), pH 7,0, wurde 20 Sekunden lang auf das Gitter plaziert. Die Gitter wurden vor der TEM-Untersuchung lufttrocknen gelassen. Die gesamte Mikroskopie wurde mit Hilfe eines JEOL 1000X-Transmissionselektronenmikroskops (JEOL USA, Inc.) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV durchgeführt. Die gemachten mikroskopischen Aufnahmen besaßen eine 100.000fache Endvergrößerung.

[0140] VLP wurden im Größenbereich von 50-55 nm Durchmesser bei allen Hefeproben beobachtet, welche entweder die HPV6a-L1- oder HPV6a-L1- und -L2-Coexpressionsplasmide beherbergten. Keine VLP wurden bei Hefe-Kontrollproben beobachtet.

REFERENZBEISPIEL 25

Fermentierung von HPV6a-L1 + L2 (Stamm # 1670)

[0141] Das Oberflächenwachstum einer Plattenkultur des Stammes 1670 wurde steril auf ein leucin-freies flüssiges Medium überführt, das (pro Liter) enthielt: 8,5 g Difco-Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 0,2 g Adenin, 0,2 g Uracil, 10 g Bernsteinsäure, 5 g Ammoniumsulfat und 0,25 g L-Tyrosin; dieses Medium wurde vor der Sterilisation mit NaOH auf pH 5,0-5,3 eingestellt. Nach Wachstum für 25 h bei 28° C, 250 UpM, auf einem Rotationsschüttler wurden eingefrorene Kulturgefäße vorbereitet durch Zugabe von sterilem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 17 % (Gew./Vol.) vor der Lagerung bei –70° C (1 ml pro Kryogefäß). Das Impfgut für die Fermentation des Stammes 1670 wurde

im gleichen Medium (500 ml pro 2-l-Kolben) entwickelt und gestartet durch Überführung der aufgetauten Inhalte von zwei eingefrorenen Kulturgefäßen in die 2-l-Kolben und Inkubation für 25 h bei 28° C, 250 UpM, auf einem Rotationsschüttler. Bei der Fermentation des Stammes 1670 wurde ein New Brunswick SF-116-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 10 l nach der Animpfung verwendet. Das verwendete Produktionsmedium enthielt (pro l): 20 g Difco-Hefeextrakt, 10 g Sheffield-HySoy-Pepton, 20 g Glucose, 20 g Galactose; das Medium wurde vor der Sterilisation auf pH 5,3 eingestellt. Der gesamte Inhalt (500 ml) des 2-l-Impfkolbens wurde in den Fermenter überführt, welcher bei 28° C, 5 l Luft pro Minute, 400 UpM, 3,5 psi Druck inkubiert wurde. Die mechanische Bewegung wurde erforderlichenfalls erhöht, um Niveaus an gelöstem Sauerstoff von mehr als 40 % Sättigung aufrechtzuerhalten. Der Fortschritt der Fermentation wurde durch Offline-Glucose-Messungen (Beckman Glucose 2 Analysator) und Online-Massenspektrometrie (Perkin-Eimer 1200) überwacht. Nach 69 h Inkubation wurde eine Zelldichte von 9,9 g Trockenzellgewicht pro Liter erreicht. Die Kultur wurde durch Hohlfaserfiltration (Amicon H5MP01-43-Kartusche in einem Amicon DC-10-Filtrationssystem) auf etwa 2 l konzentriert, mit 2 l phosphatgepufferter Salzlösung diafiltriert und vor dem Abfüllen in 500-ml-Zentrifugenflaschen weiter konzentriert (auf etwa 1 l). Zellpellets wurden durch Zentrifugation bei 8000 UpM (Sorvall GS3-Rotor) für 20 Minuten bei 4° C gewonnen. Nach Dekantierung des Überstands wurden die Pellets (insgesamt 225 g nasse Zellen) bis zur Verwendung bei –70° C gelagert.

BEISPIEL 3

Reinigung von rekombinanten HPV6a-L1- + -L2-Kapsidproteinen

[0142] Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0143] Die Zellen des Stammes # 1670 wurden bei –70° C eingefroren gelagert. Eingefrorene Zellen (Nassgewicht = 38,0 g) wurden bei 20-23° C aufgetaut und in 50 ml "L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellaufschlämmung wurde bei einem Druck von etwa 8000 psi durch drei Passagen in einem M110 Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA) aufgebrochen. Die aufgebrochene Zellaufschlämmung wurde mit 5000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstandsflüssigkeit, L1- + L2-Antigen enthaltend, wurde gewonnen.

[0144] Die Überstandsflüssigkeit wurde 1:5 durch Zugabe von Puffer A (20 mM MOPS, pH 7,0) verdünnt und auf eine Anionenaustausch-Einfangsäule (5,0 cm ID × 4,0 cm) von Fractogel®-EMD-TMAE-650 (S)-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ), äquilibriert in Puffer A, aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit Puffer A wurde das Antigen mit einem Gradienten von 0-1,0 M NaCl in Puffer A eluiert. Es wurde ein Immunodotblotting durchgeführt, um zu feststellen, welche Fraktionen von der Säule L1-Protein enthielten.

[0145] L1-Protein-enthaltende Fraktionen, wie durch Immunodotblot bestimmt, wurden einem Assay hinsichtlich Gesamtprotein nach dem Bradford-Verfahren, gefolgt von SDS-PAGE unter Einsatz von Silberfärbung und Westernblotting, unterworfen.

[0146] TMAE-Fraktionen, die eine vergleichbare Reinheit und Anreicherung von L1-Protein zeigten, wurden gepoolt. Das Antigen wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Die Lösung wurde auf 63 % gesättigtes Ammoniumsulfat eingestellt, indem festes Reagenz unter sanftem Rühren im Verlauf von 30 Minuten zugegeben wurde. Die Probe wurde auf Eis gestellt und die Präzipitation 30 Min. lang fortschreiten gelassen. Die Probe wurde mit 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20,0 ml PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl) resuspendiert.

[0147] Das resuspendierte Pellet wurde auf einer Größenausschlusssäule (2,6 cm ID × 89 cm) von Sephacryl 500 HR-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) chromatographiert. Der Laufpuffer war PBS. Die Chromatographie wurde bei 20-23° C durchgeführt. Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE unter Einsatz von Silberfärbung und Westernblot-Nachweis analysiert. Die reinsten Fraktionen wurden gepoolt. Der resultierende Pool wurde konzentriert.

[0148] Das Endprodukt wurde durch SDS-PAGE unter Einsatz von kolloidaler Coomassiefärbung analysiert. Die L1- und L2-Proteine wurden als 85 % homogen abgeschätzt. Die Identität der L1- und L2-Proteine wurde durch Westernblots unter Verwendung der geeigneten Antiseren bestätigt. Das Endprodukt wurde in Aliquots aufgeteilt und bei –70° C gelagert. Diese Prozedur führte zu insgesamt 3,0 mg Protein.

[0149] Eine elektronenmikroskopische Analyse wurde mittels Structure Probe (West Chester, PA) durchgeführt. Ein Aliquot der Probe wurde auf ein kohlenstoffbeschichtetes 200-Mesh-Kupfergitter plaziert. Ein Tropfen 2%iger Phosphorwolframsäure, pH 7,0, wurde 20 Sekunden lang auf das Gitter plaziert. Das Gitter wurde vor der TEM-Untersuchung lufttrocknen gelassen. Die gesamte Mikroskopie wurde mit Hilfe eines JEOL 100 CX-Transmissionselektronenmikroskops (JEOL USA, Inc.) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV durchgeführt. Die gemachten mikroskopischen Aufnahmen hatten

eine 100.000fache Endvergrößerung. Die Anwesenheit virusähnlicher Partikel im Größenbereich von 50-55 nm wurde bestätigt.

REFERENZBEISPIEL 26

Reinigung von HPV6a-L1- und -L1 + L2-VLPs für EM-Studien

[0150] Die in Hefe exprimierten HPV6a-L1- und HPV-L1- + -L2-Proteine wurden für elektronenmikroskopische (EM)-Studien partiell gereinigt und konzentriert. 1 bis 1,5 Liter YEHD-Medium, enthaltend 2 % Galactose und 0,1 M Sorbit, wurden mit dem S. cerevisiae-Stamm # 1558, beherbergend entweder Plasmid p13173-357-6 (L1-Expresssionsvektor) oder Plasmid p14049-7-2 (L1 + L2-Coexpressionsvektor), angeimpft und 68-72 Stunden lang bei 30° C gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 4000 g für 10 Min geerntet und die Zellpellets bei –70°C eingefroren. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellpellets wurden aufgetaut und in einem gleichen Volumen an „L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) suspendiert. Die Proteininhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden der Aufschlämmung bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellen wurden durch 3-5 Passagen in einem Microfluidizer lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Minuten geklärt. Der Überstand wurde auf ein 5-cm-Kissen von 45%iger (Vol./Vol.) Sucrose in L1-Puffer geschichtet und die L1- oder L1- + L2-Proteine wurden durch Zentrifugation mit 100.000 x g für 4 Stunden pelletiert. Das Pellet wurde in 1/10 des Volumens an L1-Puffer resuspendiert und durch Zentrifugation mit 5000 x g für 10 Min. geklärt. Die Proben wurden mittels EM untersucht und befunden, virusähnliche Partikel zu enthalten.

REFERENZBEISPIEL 27

Klonierung von HPV16-L1- und -L2-Genen

[0151] Genomische Gesamt-DNA wurde aus Caski-Zellen (ATCC # CRL1550) nach Standardtechniken (Sambrook et al., oben) extrahiert. Die DNA wurde mit den Endonukleasen Bst1107I und SphI verdaut und einer Elektrophorese durch ein 0,8%iges präparatives Agarosegel mit niedriger Schmelztemperatur unterworfen. Ein Bereich, der DNA von ~ 3,5 kbp entsprach, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die Agarose mit Gelase™-Enzym (Epicentre Technologies, Inc.) verdaut. Die gelgereinigte DNA wurde mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und mit glattendigen phosphorylierten Oligodesoxynukleotid-Linkern ligiert, welche eine verborgene HindIII-Stelle enthielten. Die Ligierungsmischung wurde mit HindIII bis zur Vervollständigkeit verdaut und die ~ 3,5-kbp-DNA wurde durch ein Agarosegel wie oben beschrieben größenfraktioniert. Die gelgereinigte DNA wurde mit pUC18-Plasmid-DNA, welche mit HindIII verdaut und dephosphoryliert worden war, ligiert. Nach der Transformation kompetenter E. coli-DH5-Zellen (BRL) wurde die Plasmid-Bank hinsichtlich HPV16-positiver Klone gescreent durch Koloniehybridisierung unter Verwendung eines ^{32}P-markierten Antisense-Oligodesoxynukleotids, welches komplementär zu dem 3'-Ende des HPV16-L1-Gens ist (5'-GAG AGA TCT TAC AGC TTA CGT TTT TTG CGT TTA GC-3'). Ein pUC18-Plasmid, enthaltend ein genomisches 3,3-kbp-HPV16-Fragment, wurde isoliert und charakterisiert durch Restriktionsenzym- und Southernblot-Analysen. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pUC18-HPV16L1/L2 und enthält alle für L1 und L2 codierenden DNA-Sequenzen. Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des Qiagen™ Plasmid Maxi-Kits (Qiagen, Inc.) präpariert.

REFERENZBEISPIEL 28

Konstruktion des HPV16-L1-Hefe-Expressionsvektors

[0152] Der Klon pUC18-HPV16L1/L2 wurde als Matrize für PCR eingesetzt. Das HPV16-L1-Gen wurde mittels PCR unter Einsatz von Vent-Polymerase (New England Biolabs, Inc.), 10 Amplifizierungszyklen (94°C, 1 Min.; 48°C, 1 Min.; 72°C, 1 Min. 45 s) und den folgenden Oligodesoxynukleotid-Primern, welche flankierende BglII-Stellen (unterstrichen) enthalten, amplifiziert.
Sense-Primer: 5'-CTC AGA TCT CAC AAA ACA AAA TGT CTC TTT GGC TGC CTA TGT AGG CC-3' (SEQ-ID-Nr. 15)
Antisense-Primer: 5'-GAG AGA TCT TAC AGC TTA CGT TTT TTG CGT TTA GC-3' (SEQ-ID-Nr. 16)

[0153] Der Sense-Primer führt eine untranslatierte Hefe-Leadersequenz unmittelbar stromaufwärts des HPV16-L1-Initiations-Methionincodons (in Fettdruck hervorgehoben) ein. Das 1,5-kbp-L1-PCR-Produkt wurde mit BglII verdaut, gelgereinigt und mit dem BamHI-verdauten pC1/1-GAL-Vektor ligiert. Ein pC1/1-GAL-Plasmid wurde isoliert, welches das HPV16-L1-Gen enthält, und als p14049-37-1 bezeichnet. Das L1-Gen in p14049-37-1 wurde mit Hilfe des PRISM™-Kits (ABI, Inc.) und eines ABI-Sequenzierers Modell # 373 A nach den Anweisungen des Herstellers sequenziert. Es wurde gezeigt, daß das L1-Gen in diesem Isolat drei Nukleotidabweichungen von der korrigierten veröffentlichten Prototyp-Sequenz (Kirnbauer, R., et al. (1993), J. Virol. 67:6929-6936) enthält, was zu zwei Aminosäurenaustauschen führt: His-202 zu Asp; Thr-266 zu Ala. Eine Sequenzanalyse der ursprünglichen Matrizen-DNA bestätigte, daß diese Abweichungen auch im genomischen Klon pUC18-HPV16L1/L2 vorlagen und nicht durch die PCR eingeführt wurden.

REFERENZBEISPIEL 29

Konstruktion des HPV16-L1- und -L2-Hefe-Expressionsvektors

[0154] Das Plasmid p14049-37-1 (pC1/1-GAL + HPV16-L1) wurde mit SmaI verdaut, welches zwischen dem GAL10-Promoter und dem ADH1-Transkriptionsterminator spaltet. Das 1,4-kbp-HPV16-L2-Gen wurde mittels PCR unter Einsatz der pUC18-HPV16L1/L2-DNA als Matrize, Vent-Polymerase (New England Biolabs, Inc.), 10 Zyklen PCR-Amplifizierung (94°C, 1 Min.; 48°C, 1 Min.; 72°C, 1 Min. 45 s) und den folgenden Oligodesoxynukleotid-Primern, welche flankierende SmaI-Stellen (unterstrichen) enthalten, amplifiziert:
Sense-Primer: 5'-TCC CCC GGG CAC AAA ACA AAA TGC GAC ACA AAC GTT CTG CAA AAC-3' (SEQ-ID-Nr. 17)
Antisense-Primer: 5'-TCC CCC GGG CTA GGC AGC CAA AGA GAC ATC TGA-3' (SEQ-ID-Nr. 18)

[0155] Der Sense-Primer führt eine untranslatierte Hefe-Leadersequenz unmittelbar stromaufwärts des HPV16-L2-Initiations-Methionincodons (in Fettdruck hervorgehoben) ein. Das 1,4-kbp-L2-PCR-Produkt wurde mit SmaI verdaut, gelgereinigt und mit dem SmaI-verdauten Vektor p14049-37-1 ligiert. Ein pC1/1-GAI-Plasmid, welches die HPV16-L1- und L2-Gene beide enthält, wurde isoliert und als p14049-42-2 bezeichnet. Das L2-Gen in p14049-42-2 wurde mit Hilfe des PRISM™-Kits (ABI, Inc.) und eines ABI-Sequenzierers (Modell #373A) nach den Anweisungen des Herstellers sequenziert. Es wurde gezeigt, daß das L2-Gen in diesem Isolat fünf Nukleotidabweichungen von der korrigierten veröffentlichten Prototyp-Sequenz (Kirnbauer, R., et al., (1993), oben) enthält, was zu einem Aminosäureaustausch führt: Ser-269 zu Pro. Eine Sequenzanalyse des genomischen Klons pUC18-HPV16L1/L2 bestätigte, daß diese Abweichung auch in der ursprünglichen Matrizen-DNA vorlag und nicht durch die PCR eingeführt wurde.

BEISPIEL 4

A. Expression von HPV16-L1 und Coexpression von HPV16-L1 und -L2 in Hefe

[0156] Die Plasmide p14049-37-1 (pC1/1-GAL + HPV16-L1) und p14049-42-2 (pC1/1-GAL + HPV16-L1- + -L2) wurden zur Transformation des S. cerevisiae-Stammes # 1558 eingesetzt. Die resultierenden rekombinanten Stämme waren # 1678 (HPV16-L1) und # 1679 (HPV16-L1 + L2) wie in der Tabelle gezeigt. Klonale Isolate wurden bei 30°C in YEHD-Medium, das 2% Galactose enthielt, für 68-78 Stunden gezüchtet. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Zellpellets mit Glasperlen aufgebrochen und die Zelllysate hinsichtlich der Expression von HPV16-L1- oder HPV16-L2-Protein durch Immunoblot-Analyse analysiert. Proben, die 40 µg zelluläres Gesamtprotein enthielten, wurden auf 10%igen Tris-Glycin-Gelen unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen elektrophoresiert und auf Nitrocellulosefilter elektrogeblottet. Das HPV16-L1-Protein wurde mit Hilfe polyklonaler Kaninchen-Antiseren, die gegen ein trpE-HPV11-L1-Fusionsprotein induziert worden waren, (D. Brown et al., Virology 201:46-54) als primärer Antikörper und HRP-gekoppeltem Antikaninchen-Esel-IgG-Antikörper (Amersham, Inc.) als sekundärer Antikörper nachgewiesen. Die Filter wurden mit Hilfe des chemolumineszierenden ECL™-Detection Kit (Amersham, Inc.) aufgearbeitet. Eine L1-Proteinbande von 50-55 kD wurde in allen Proben mit Ausnahme der negativen Kontrolle (pC1/1 ohne L1- oder L2-Gen) nachgewiesen. Das L2-Protein wurde als eine 70-kD-Proteinbande durch einen Immunoblot unter Verwendung von Anti-HPV16-L2-Mausseren, die gegen in E. coli exprimierte trpE-L2-Fusionsproteine induziert worden waren, als primärer Antikörper nachgewiesen. Antimaus-Ziegen-IgG, an HRP gekoppelt, (Amersham, Inc.) wurde als sekundärer Antikörper verwendet und die Filter wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet.

B. Reinigung von rekombinanten HPV Typ 16-L1 + L2-Kapsidproteinen

[0157] Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0158] Zellen wurden bei –70°C eingefroren gelagert. Eingefrorene Zellen (Nassgewicht = 27,6 g) wurden bei 20-23°C aufgetaut und in 40 ml „L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellaufschlämmung wurde bei einem Druck von etwa 8000 psi durch 3 Passagen in einem M110 Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA) aufgebrochen. Die aufgebrochene Zellaufschlämmung wurde mit 5000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstandsflüssigkeit, enthaltend L1- + L2-Antigen, wurde gewonnen.

[0159] Die Überstandsflüssigkeit wurde 1:5 durch Zugabe von Puffer A (20 mM MOPS, pH 7,0) verdünnt und auf eine Anionenaustausch-Einfangsäule (5,0 cm ID × 4,8 cm) von Fractogel®-EMD-TMAE-650 (S)-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ), äquilibriert in Puffer A, aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit Puffer A wurde das Antigen mit einem Gradienten von 0-1,0 M NaCl in Puffer A eluiert. Ein Immunodotblot wurde durchgeführt, um festzustellen, welche Fraktionen von der Säule L1-Protein enthielten.

[0160] Fraktionen, welche L1-Protein enthielten, wie durch Immunodotblot bestimmt, wurden einem Assay hinsichtlich Gesamtprotein nach dem Bradford-Verfahren, gefolgt von SDS-PAGE unter Anwendung von Silberfärbung und Westernblotting, unterworfen.

[0161] TMAE-Fraktionen, die eine vergleichbare Reinheit und Anreicherung von L1-Protein zeigten, wurden gepoolt. Das Antigen wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Proben wurden auf 48 % gesättigtes Ammoniumsulfat eingestellt, indem festes Reagenz unter sanftem Rühren im Verlauf von 30 Minuten zugegeben wurde. Die Proben wurden auf Eis gestellt und die Präzipitation über Nacht stattfinden gelassen. Die Proben wurden mit 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20,0 ml PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl) resuspendiert.

[0162] Die resuspendierten Pellets wurden separat auf einer Größenausschlusssäule (2,6 cm ID × 89 cm) von Sephacryl 500 HR-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) bei 20-23°C chromatographiert. Der Laufpuffer war PBS. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE unter Anwendung von Silberfärbung und Westernblot-Nachweis analysiert. Die reinsten Fraktionen wurden gepoolt. Die resultierenden Pools wurden in einer 50-ml-Rührzelle unter Einsatz von YM-100-Flachfolienmembranen (Amicon, Beverly, MA) von 43 mm bei einem N_2-Druck von 4-6 psi konzentriert.

[0163] Das Endprodukt wurde mittels SDS-PAGE unter Anwendung von kolloidaler Coomassiefärbung analysiert. Die L1- und L2-Proteine wurden als zu 70 % homogen abgeschätzt. Die Identität der L1- und L2-Proteine wurde durch Westernblots mit Hilfe der geeigneten Antiseren bestätigt. Das Endprodukt wurde in Aliquots aufgeteilt und bei –70°C gelagert. Diese Prozedur führte zu insgesamt 0,53 mg Protein.

[0164] Eine elektronenmikroskopische Analyse wurde mittels Structure Probe (West Chester, PA) durchgeführt. Ein Aliquot einer Probe wurde auf ein kohlenstoffbeschichtetes 200-Mesh-Kupfergitter plaziert. Einen Tropfen von 2%iger Phosphorwolframsäure, pH 7,0, wurde 20 Sekunden lang auf das Gitter plaziert. Das Gitter wurde vor der TEM-Untersuchung lufttrocknen gelassen. Die gesamte Mikroskopie wurde unter Verwendung eines JEOL 100 CX-Transmissionselektronenmikroskops (JEOL USA, Inc.) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV durchgeführt. Die gemachten mikroskopischen Aufnahmen hatten eine 100.000fache Endvergrößerung. Die Anwesenheit virusähnlicher Partikel im Größenbereich von 50-55 nm wurde bestätigt.

C. Reinigung von rekombinanten HPV Typ 16-L1 + L2-Kapsidproteinen

[0165] Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0166] Zellen wurden bei –70°C eingefroren gelagert. Eingefrorene Zellen (Nassgewicht = 92,8 g) wurden bei 20-23°C aufgetaut und in 105 ml „L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl, 1,7 mM EDTA) resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellaufschlämmung wurde bei einem Druck von etwa 16000 psi durch 3 Passagen in einem M110-Y Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA) aufgebrochen. Die aufgebrochene Zellaufschlämmung wurde mit 6100 x g 15 Minuten lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstandsflüssigkeit, enthaltend L1- + L2-Antigen, wurde gewonnen.

[0167] Die Überstandsflüssigkeit wurde 1:5 durch Zugabe von Puffer A (20 mM MOPS, pH 7,0) verdünnt und auf eine Anionenaustausch-Einfangsäule (5,0 cm ID × 4,2 cm) von Fractogel®-EMD-TMAE-650 (S)-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ), äquilibriert in Puffer A, aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit Puffer A wurde das Antigen mit einem Gradienten von 0-1,0 M NaCl in Puffer A eluiert. Ein Immunodotblot wurde durchgeführt, um festzustellen, welche Fraktionen von der Säule L1-Protein enthielten.

[0168] Fraktionen, welche L1-Protein enthielten, wie durch Immunodotblot bestimmt, wurden einem Assay hinsichtlich Gesamtprotein nach dem Bradford-Verfahren, gefolgt von SDS-PAGE unter Anwendung von Silberfärbung und Westernblotting, unterworfen.

[0169] TMAE-Fraktionen, die eine vergleichbare Reinheit und Anreicherung von L1-Protein zeigten, wurden gepoolt. Das Antigen wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Proben wurden auf 35 % gesättigtes Ammoniumsulfat eingestellt, indem festes Reagenz unter sanftem Rühren im Verlauf von 10 Minuten zugegeben wurde. Die Proben wurden auf Eis gestellt und die Präzipitation 4 h lang stattfinden gelassen. Die Proben wurden mit 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20,0 ml PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl), enthaltend 1 mM EDTA, resuspendiert.

[0170] Die resuspendierten Pellets wurden separat auf einer Größenausschlusssäule (2,6 cm ID × 89 cm) von Sephacryl 500 HR-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) chromatographiert. Der Laufpuffer war PBS mit 1 mM EDTA. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE unter Anwendung von Silberfärbung und Westernblot-Nachweis analysiert. Die reinsten Frak-

tionen wurden gepoolt. Die resultierenden Pools wurden in einer 50-ml-Rührzelle unter Einsatz von YM-100-Flachfolienmembranen (Amicon, Beverly, MA) von 43 mm bei einem N_2-Druck von 4-6 psi konzentriert.

[0171] Das Endprodukt wurde mittels SDS-PAGE unter Anwendung von kolloidaler Coomassiefärbung analysiert. Die L1- und L2-Proteine wurden als zu 70 % homogen abgeschätzt. Die Identität der L1- und L2-Proteine wurde durch Westernblots mit Hilfe der geeigneten Antiseren bestätigt. Das Endprodukt wurde in Aliquots aufgeteilt und bei –70°C gelagert. Diese Prozedur führte zu insgesamt 3,8 mg Protein.

BEISPIEL 5

A. Fermentation des Stammes 1679 (HPV Typ 16-L1 + L2)

[0172] Die für die Herstellung eingefrorener Stammkulturen, Impfgutentwicklung, Fermentation und Zellgewinnung des Stammes 1679 eingesetzten Verfahren waren im wesentlichen wie oben beschrieben. Nach 67 Stunden Inkubation wurde eine Zelldichte von 4,2 g Trockenzellgewicht pro Liter erreicht und ergab insgesamt 93 g nasses Zellpellet nach der Gewinnung.

B. Fermentation des Stammes 1678 (HPV Typ 16-L1)

[0173] Die für die Herstellung eingefrorener Stammkulturen, Impfgutentwicklung, Fermentation und Zellgewinnung des Stammes 1678 eingesetzten Verfahren waren im wesentlichen wie oben beschrieben. Nach 70,5 Stunden Inkubation wurden die Inhalte von zwei 10-l-Fermentationen gepoolt (eine Zelldichte von 8,7 g Trockenzellgewicht pro Liter), was insgesamt 258 g nasses Zellpellet nach der Gewinnung ergab.

C. Reinigung von rekombinanten HPV Typ 16-L1-Kapsidproteinen

[0174] Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0175] Zellen des Stammes # 1678 wurden bei –70°C eingefroren gelagert. Eingefrorene Zellen (Nassgewicht = 128 g) wurden bei 20-23°C aufgetaut und in 140 ml „Modifiziertem L1-Puffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl) resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellaufschlämmung wurde bei einem Druck von etwa 16000 psi durch 3 Passagen in einem M110-Y Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA) aufgebrochen. Die aufgebrochene Zellaufschlämmung wurde mit 11000 x g 40 Minuten lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstandsflüssigkeit, enthaltend L1-Antigen, wurde gewonnen.

[0176] Die Überstandsflüssigkeit wurde 1:5 durch Zugabe von Puffer A (20 mM MOPS, pH 7,0) verdünnt und auf eine Anionenaustausch-Einfangsäule (5,0 cm ID × 6,4 cm) von Fractogel®-EMD-TMAE-650 (S)-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ), äquilibriert in Puffer A, aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit Puffer A wurde das Antigen mit einem Gradienten von 0-1,0 M NaCl in Puffer A eluiert. Ein Immunodotblot wurde durchgeführt, um festzustellen, welche Fraktionen von der Säule L1-Protein enthielten.

[0177] Fraktionen, welche L1-Protein enthielten, wie durch Immunodotblot bestimmt, wurden einem Assay hinsichtlich Gesamtprotein nach dem Bradford-Verfahren, gefolgt von SDS-PAGE unter Anwendung von Silberfärbung und Westernblotting, unterworfen.

[0178] TMAE-Fraktionen, die eine vergleichbare Reinheit und Anreicherung von L1-Protein zeigten, wurden gepoolt. Das Antigen wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Proben wurden auf 35 % gesättigtes Ammoniumsulfat eingestellt, indem festes Reagenz unter sanftem Rühren im Verlauf von 10 Minuten zugegeben wurde. Die Proben wurden auf Eis gestellt und die Präzipitation 5 h lang stattfinden gelassen. Die Proben wurden mit 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20,0 ml PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl) resuspendiert.

[0179] Die resuspendierten Pellets wurden separat auf einer Größenausschlusssäule (2,6 cm ID × 89 cm) von Sephacryl 500 HR-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) chromatographiert. Der Laufpuffer war PBS. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE unter Anwendung von Silberfärbung und Western-blot-Nachweis analysiert. Die reinsten Fraktionen wurden gepoolt. Die resultierenden Pools wurden in einer 50-ml-Rührzelle unter Verwendung von YM-100-Flachfolienmembranen (Amicon, Beverly, MA) von 43 mm bei einem N_2-Druck von 4-6 psi konzentriert.

[0180] Das Endprodukt wurde mittels SDS-PAGE unter Anwendung von kolloidaler Coomassiefärbung analysiert. Das L1-Protein wurde als zu 70% homogen abgeschätzt. Die Identität von L1 wurde durch Westernblots mit Hilfe der geeigneten Antiseren bestätigt. Das Endprodukt wurde in Aliquots aufgeteilt und bei –70°C gelagert. Diese Prozedur führte zu insgesamt 7,4 mg Protein.

D. Analytische Verfahren

Immunodotblot-Verfahren

[0181] Die Proben wurden (erforderlichenfalls) 1:10 in Milli-Q-H_2O verdünnt und 10 µl der Probe wurden auf PolyScreen™-PVDF-Membranen (NEN Research Products, Boston, MA) aufgetragen. Nachdem die Flecken getrocknet waren, wurden die Membranen in Wasser gewaschen und trocknen gelassen. Ein Lösung von primärem Antikörper wurde hergestellt durch Verdünnung des geeigneten Antiserums in Blottingpuffer (5 % fettfreie Milch in 6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,02 % NaN_3). Die Inkubation war für mindestens 1 Stunde bei 20-23°C. Der Blot wurde jeweils 1 Minute lang in drei Austauschen von PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl) gewaschen. Eine Lösung von sekundärem Antikörper wurde hergestellt durch Verdünnung des geeigneten, an alkalische Phosphatase gekoppelten Konjugat-Antiserums in Blottingpuffer. Die Inkubation fand unter denselben Bedingungen für mindestens 1 Stunde statt. Die Blots wurden wie zuvor gewaschen und unter Verwendung eines einstufigen NBT/BCIP-Substrats (Pierce, Rockford, IL) nachgewiesen.

[0182] Die zum Nachweis verwendeten Antikörper waren wie folgt:
HPV6a-L1 wurde durch MAB 837 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) nachgewiesen. HPV6a-L2 wurde durch den Anti-HPV6a-L2-trpE-Fusion-Mausserumpool # 641 und 647 nachgewiesen. HPV16-L1 wurde durch MAB 885 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) nachgewiesen. HPV16-L2 wurde durch den Anti-HPV16-L2-trpE-Fusion-Mausserumpool # 611 nachgewiesen.

Bradford-Assay hinsichtlich Gesamtprotein

[0183] Gesamtprotein wurde mit Hilfe eines im Handel erhältlichen Coomassie Plus®-Kits (Pierce, Rockford, IL) nachgewiesen. Die Proben wurden auf geeignete Niveaus in Milli-Q-H_2O verdünnt. Die erforderlichen Volumina waren 0,1 ml und 1,0 ml für die Standard- bzw. Mikroassay-Protokolle. Für beide Protokolle wurde BSA (Pierce, Rockford, IL) eingesetzt, um die Standardkurve zu erstellen. Der Assay wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Standardkurven wurden mit Hilfe von CricketGraph®-Software auf einem Macintosh IIci-Computer graphisch dargestellt.

REFERENZBEISPIEL 30

Reinigung von rekombinanten HPV Typ 11-L1-Kapsidproteinen

[0184] Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0185] Zellen wurden bei –70°C eingefroren gelagert. Eingefrorene Zellen (Nassgewicht = 180 g) wurden bei 20-23°C aufgetaut und in 900 ml „Aufbruchpuffer" (50 mM MOPS, pH 7,2, 500 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$) resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren AEBSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 1 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellaufschlämmung wurde bei einem Druck von etwa 16.000 psi durch 4 Passagen in einem M110-Y Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA) aufgebrochen. Ein ausreichendes Volumen an 10%igem Triton X100®-Detergens (Pierce, Rockford, IL) wurde der aufgebrochenen Zellaufschlämmung zugegeben, um die Konzentration an TX100 auf 0,5 % zu bringen. Die Aufschlämmung wurde 20 Stunden lang gerührt. Das mit Triton X100 behandelte Lysat wurde mit 12.000 x g 40 Minuten lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstandsflüssigkeit, enthaltend L1-Protein, wurde gewonnen.

[0186] Die Überstandsflüssigkeit wurde gegen 5 Volumina 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 0,5 M NaCl, unter Verwendung einer 300K-Tangentialströmungs-Membrankassette (Filtron, Northborough, MA) diafiltriert. Das von der Membran zurückgehaltene Material wurde mittels Radioimmunoassay und Westernblots befunden, das L1-Protein zu enthalten.

[0187] Das Retentat wurde auf eine hochauflösende Affinitätssäule (11,0 cm ID × 5,3 cm) von SP-Spherodex (M)®-Harz (IBF, Villeneuve-la-Garenne, Frankreich), äquilibriert in 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 0,5 M NaCl, aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit Äquilibrierungspuffer und einer Stufenwaschung mit 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 1,0 M NaCl, wurde das L1-Protein mit einer Stufenwaschung von 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 2,5 M NaCl, eluiert. Fraktionen wurden während der Waschschritte und Elution gesammelt. Die Säulenfraktionen wurden einem Assay hinsichtlich Gesamtprotein nach dem Bradford-Verfahren unterworfen. Die Fraktionen wurden dann durch Westernblots und SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie-Nachweis analysiert. Fraktionen wurden auch durch Radioimmunoassay analysiert.

[0188] SP-Spherodex-Fraktionen, die eine vergleichbare Reinheit und Anreicherung von L1-Protein zeigten, wurden gepoolt.

[0189] Das Endprodukt wurde durch Westernblots und SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie-Nachweis analysiert. Das L1-Protein wurde durch Densitometrie der mit Coomassie angefärbten Gele als > 90% homogen abgeschätzt. Die Identität des L1-Proteins wurde durch Westernblots bestätigt. Das Endprodukt wurde steril durch eine 0,22-µm-Membran filtriert und bei 4°C gelagert. Diese Prozedur führte zu insgesamt 202 mg Protein.

[0190] Eine elektronenmikroskopische Analyse wird mittels Structure Probe (West Chester, PA) durchgeführt. Ein Aliquot der Probe wird auf ein kohlenstoffbeschichtetes 200-Mesh-Kupfergitter plaziert. Ein Tropfen von 2%iger Phosphorwolframsäure, pH 7,0, wird 20 Sekunden lang auf das Gitter plaziert. Das Gitter wird vor der TEM-Untersuchung lufttrocknen gelassen. Die gesamte Mikroskopie wird mit Hilfe eines JEOL 100 CX-Transmissionselektronenmikroskops (JEOL USA, Inc.) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV durchgeführt. Die gemachten mikroskopischen Aufnahmen haben eine 100.000fache Endvergrößerung.

SDS-PAGE und Westernblot-Assays

[0191] Alle Gele, Puffer und elektrophoretischen Apparaturen wurden von Novex (San Diego, CA) erhalten und nach den Empfehlungen des Herstellers betrieben. In Kürze, Proben wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen in Milli-Q-H_2O verdünnt und 1:1 mit Probeninkubationspuffer gemischt, der 200 mM DTT enthielt. Die Proben wurden 15 Min. lang bei 100° C inkubiert und auf vorgegossene 12%ige Tris-Glycin-Gele aufgetragen. Die Proben wurden bei 125 V 1 h 45 Min. lang elektrophoresiert. Die Gele wurden durch Anfärbung mit kolloidalem Coomassie unter Verwendung eines im Handel erhaltenen Kits (Integrated Separation Systems, Natick, MA) entwickelt.

[0192] Für Westernblots wurden Proteine bei 25 V für 40 Min. auf PVDF-Membranen überführt. Die Membranen wurden mit Milli-Q-H_2O gewaschen und luftgetrocknet. Der primäre Antikörper war polyklonales Kaninchen-Antiserum, induziert gegen ein TrpE-HPV11-L1-Fusionsprotein (Gabe von Dr. D. Brown). Die Antikörperlösung wurde hergestellt durch Verdünnung von Antiserum in Blottingpuffer (5 % fettfreie Milch in 6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,02 % NaN_3). Die Inkubation fand für mindestens 1 h bei 20-23° C statt. Der Blot wurde für jeweils 1 Minute in drei Austauschen von PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl) gewaschen. Eine Lösung von sekundärem Antikörper wurde präpariert durch Verdünnung von Konjugat-Antiserum von an alkalische Phosphatase gekoppeltem Antikaninchen-Ziegen-IgG (Pierce, Rockford, IL) in Blottingpuffer. Die Inkubation fand unter denselben Bedingungen mindestens 1 h lang statt. Die Blots wurden wie zuvor gewaschen und mit Hilfe eines einstufigen NBT/BCIP-Substrats (Pierce, Rockford, IL) nachgewiesen.

REFERENZBEISPIEL 31

Expression von HPV18-L1 und -L2 in Hefe

[0193] Die Plasmide p191-6 (pGAL1-10 + HPV18-L1) und p195-11 (pGAL1-10 + HPV18-L1 + L2) wurden zur Transformation des S. cerevisiae-Stammes # 1558 (MATa, leu2-04, prb1::HIS3, mnn9::URA3, ade1, cir°) verwendet. Klonale Isolate wurden bei 30° C in YEHD-Medium mit 2 % Galactose für 88 h gezüchtet. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Zellpellets mit Glasperlen aufgebrochen und die Zelllysate hinsichtlich der Expression von HPV18-L1- und/oder HPV18-L2-Protein mittels Immunoblot-Analyse analysiert. Proben, die 25 µg Gesamtzellprotein enthielten, wurden durch 10%ige Tris-Glycin-Gele (Novex, Inc.) unter denaturierenden Bedingungen einer Elektrophorese unterworfen und auf Nitrocellulosefilter elektrogeblottet. L1-Protein wurde unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum, das gegen ein trpE-HPV11-L1-Fusionsprotein induziert worden war, als primärer Antikörper (Brown et al., 1994, Virology 201: 46-54) und an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem Antikaninchen-Esel-IgG (Amersham, Inc.) als sekundärer Antikörper einem Immunnachweis unterzogen. Die Filter wurden mit Hilfe des chemolumineszierenden ECL™-Detection Kit (Amersham, Inc.) aufgearbeitet. Eine L1-Proteinbande von 50-55 kD wurde in den beiden L1- und L1 + L2-Coexpressor-Hefeklonen (Stämme 1725 bzw. 1727) nachgewiesen und nicht in der negativen Kontrolle (pGAL1-10 ohne L1- oder L2-Gene).

[0194] Das HPV18-L2-Protein wurde mittels Western-Analyse nachgewiesen unter Verwendung von polyklonalem Ziegen-Antiserum, induziert gegen ein trpE-HPV18-L2-Fusionsprotein, als primärer Antikörper, gefolgt von HRP-konjugiertem, Antiziegen-Kaninchen-IgG (Kirkegaard und Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Die Filter wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet. Das L2-Protein wurde als 75-kD-Proteinbande in dem L1 + L2-Coexpressor-Hefeklon (Stamm 1727), jedoch weder in der negativen Kontrolle noch dem L1-Expressorklon nachgewiesen.

REFERENZBEISPIEL 32

Fermentation von HPV18-L1 (Stamm 1725) und -18-L1 + ΔL2 (Stamm 1727)

[0195] Das Oberflächenwachstum einer Plattenkultur der Stämme 1725 und 1727 wurde steril auf ein leucin-freies flüssiges Medium überführt, das (pro Liter) enthielt: 8,5 g Difco-Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 0,2 g Adenin, 0,2 g Uracil, 10 g Bernsteinsäure, 5 g Ammoniumsulfat, 40 g Glucose, 0,25 g L-Tyrosin, 0,1 g L-Arginin, 0,3 g L-Isoleucin, 0,05 g L-Methionin, 0,2 g L-Tryptophan, 0,05 g L-Histidin, 0,2 g L-Lysin, 0,3 g L-Phenylalanin; dieses Medium wurde vor der Sterilisation mit NaOH auf pH 5,0-5,3 eingestellt. Nach Wachstum bei 28° C, 250 UpM, auf einem Rotationsschüttler wurden eingefrorene Kulturgefäße vorbereitet durch Zugabe von sterilem Glycerin bis zu einer Endkonzent-

ration von 17 % (Gew./Vol.) vor der Lagerung bei –70° C (1 ml pro Kryogefäß). Die Impfgüter wurden im selben Medium (500 ml pro 2-l-Kolben) entwickelt und gestartet durch Überführung des aufgetauten Inhalts eines eingefrorenen Kulturgefäßes und Inkubation bei 28° C, 250 UpM, auf einem Rotationsschüttler für 29 h. Bei der Fermentation eines jeden Stammes wurde ein New Brunswick SF-116-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 10 l nach der Animpfung verwendet. Das Produktmedium enthielt (pro Liter): 20 g Difco-Hefeextrakt, 10 g Sheffield HySoy-Pepton, 20 g Glucose, 20 g Galactose, 0,3 ml Union Carbide UCON LB-625 Antischaummittel; das Medium wurde vor der Sterilisation auf pH 5,3 eingestellt. Der gesamte Inhalt (500 ml) des 2-l-Impfkolbens wurde in den Fermenter überführt, welcher bei 28°C, 5 l Luft pro Minute, 400 UpM, 3,5 psi Druck, inkubiert wurde. Die mechanische Bewegung wurde erforderlichenfalls erhöht, um Niveaus an gelöstem Sauerstoff von mehr als 40 % Sättigung aufrecht zu erhalten. Der Fortschritt der Fermentation wurde durch Offline-Glucose-Messungen (Beckman Glucose 2 Analysator) und Online-Massenspektrometrie (Perkin-Eimer 1200) überwacht. Nach 66 h Inkubation wurden Zelldichten von 9,5 bis 9,7 g Trockenzellgewicht pro Liter erreicht. Die Kulturen wurden durch Hohlfaserfiltration (Amicon H5MP01-43-Kartusche in einem Amicon DC-10-Filtrationssystem) auf etwa 2 l konzentriert, mit 2 l phosphatgepufferter Salzlösung diafiltriert und vor dem Abfüllen in 500-ml-Zentrifugenflaschen weiter konzentriert (auf etwa 1 l). Zellpellets wurden durch Zentrifugation bei 8.000 UpM (Sorval GS-3-Rotor) für 20 Minuten bei 4° C gewonnen. Nach Dekantierung des Überstands wurden die Pellets (insgesamt 191 bis 208 g nasse Zellen) bis zur Verwendung bei –70° C gelagert.

BEISPIEL 6

Reinigung von rekombinanten HPV-Typ 18-L1-Kapsidproteinen

[0196] Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

[0197] Zellen wurden bei –70° C eingefroren gelagert. Eingefrorene Zellen (Nassgewicht = 126 g) wurden bei 20-23° C aufgetaut und in 70 ml "Aufbruchpuffer" (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 100 mM NaCl) resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin A wurden bis zu Endkonzentrationen von 2 mM bzw. 1,7 µM zugegeben. Die Zellaufschlämmung wurde bei einem Druck von etwa 16.000 psi durch vier Passagen in einem M110-Y Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA) aufgebrochen. Die aufgebrochene Zellaufschlämmung wurde mit 12.000 x g 40 Min. lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstandsflüssigkeit, L1-Antigen enthaltend, wurde gewonnen.

[0198] Die Überstandsflüssigkeit wurde durch Zugabe von Puffer A (20 mM MOPS, pH 7,0) 1:5 verdünnt und auf eine Anionenaustausch-Einfangsäule (9,0 cm ID × 3,9 cm) von Fractogel® EMD-TMAE-650 (M)-Harz (EM Separations, Gibbstown, NJ), äquilibriert in Puffer A, aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit Puffer A wurde das Antigen mit einem Gradienten von 0-1,0 M NaCl in Puffer A eluiert. Die Säulenfraktionen wurden einem Assay hinsichtlich Gesamtprotein nach dem Bradford-Verfahren unterworfen. Fraktionen wurden dann bei gleichen Gesamtproteinbeladungen mittels Westernblots und SDS-PAGE mit Silberfärbungsnachweis analysiert.

[0199] TMAE-Fraktionen, die eine vergleichbare Reinheit und Anreicherung von L1-Protein zeigten, wurden gepoolt. Das Antigen wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Die Lösung wurde auf 35 % gesättigtes Ammoniumsulfat eingestellt, indem festes Reagenz unter sanftem Rühren im Verlauf von 10 Minuten zugegeben wurde. Die Probe wurde auf Eis gestellt und die Präzipitation 4 h lang fortschreiten gelassen. Die Probe wurde mit 16.000 x g 45 Min. lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20,0 ml PBS (6,25 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl) resuspendiert.

[0200] Das resuspendierte Pellet wurde auf einer Größenausschlusssäule (2,6 cm ID × 89 cm) von Sephacryl 500 HR-Harz (Pharmacia, Piscataway, NJ) chromatographiert. Der Laufpuffer war PBS. Fraktionen wurden mittels Westernblots und SDS-PAGE mit Silberfärbungsnachweis analysiert. Die reinsten Fraktionen wurden gepoolt. Der resultierende Pool wurde in einer 50-ml-Rührzelle unter Verwendung von YM-100-Flachfolienmembranen (Amicon, Beverly, MA) von 43 mm bei einem N_2-Druck von 4-6 psi konzentriert.

[0201] Das Endprodukt wurde mittels Westernblots und SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie-Nachweis analysiert. Das L1-Protein wurde als 50-60 % homogen abgeschätzt. Die Identität des L1-Proteins wurde mittels Westernblots bestätigt. Das Endprodukt wurde in Aliquots aufgeteilt und bei –70° C gelagert. Dieses Verfahren führte zu insgesamt 12,5 mg Protein.

REFERENZBEISPIEL 33

Herstellung immunogener Zusammensetzungen

[0202] Gereinigte VLPs werden nach bekannten Verfahren formuliert, wie z.B. durch die Zumischung von pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Stabilisatoren oder einem Vakzin-Adjuvans. Die immunogenen VLPs der vorliegenden Erfindung können für die Verwendung als Vakzin durch Kombination mit einer physiologisch annehmbaren Zusammensetzung, wie z.B. PBS, Salzlösung oder destilliertem Wasser, prä-

pariert werden. Die immunogenen VLPs werden in einem Dosisbereich von etwa 0,1 bis 100 µg, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 20 µg verabreicht, um die gewünschte immunogene Wirkung zu erhalten. Die VLP-Menge pro Formulierung kann gemäß einer Vielfalt von Faktoren variieren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, den Zustand, das Gewicht, Alter und Geschlecht des Individuums. Die Verabreichung der VLP-Formulierung kann auf einer Vielfalt von Routen erfolgen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, oral, subkutan, topisch, mukosal und intramuskulär. Solche VLP-Formulierungen können einen einzigen VLP-Typ (d.h. VLP von HPV6a) oder eine Mischung von VLPs (d.h. VLP von HPV6a, HPV11, HPV16 und HPV18) umfassen.

[0203] Ein antimikrobielles Konservierungsmittel, z.B. Thimerosal, kann gegebenenfalls vorhanden sein. Die immunogenen Antigene der vorliegenden Erfindung können gewünschtenfalls in Kombination mit Vakzin-Stabilisatoren und Vakzin-Adjuvanzien eingesetzt werden. Typische Stabilisatoren sind spezielle Verbindungen, z.B. Polyanionen wie Heparin, Inosithexasulfat, sulfatiertes Betacyclodextrin, weniger spezielle Exzipienten, z.B. Aminosäuren, Sorbit, Mannit, Xylit, Glycerin, Sucrose, Dextrose, Trehalose, und Variationen der Lösungsbedingungen, z.B. neutraler pH-Wert, hohe Ionenstärke (ca. 0,5-2,0 M Salze), zweiwertige Kationen (Ca^{2+}, Mg^{2+}). Beispiele von Adjuvanzien sind $Al(OH)_3$ und $Al(PO_4)$. Das Vakzin der vorliegenden Erfindung kann gekühlt oder in lyophilisierter Form gelagert werden.

REFERENZBEISPIEL 34

Herstellung von Antikörpern gegen VLP

[0204] Gereinigte VLP werden zur Bildung von Antikörpern eingesetzt. Der Begriff "Antikörper", wie hier verwendet, schließt sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper sowie Fragmente davon ein, wie z.B. Fv-, Fab- und $F(ab)_2$-Fragmente, welche zur Bindung von Antigen oder Hapten in der Lage sind. Die Antikörper werden in vielfältiger Weise eingesetzt, einschließlich der, jedoch nicht beschränkt auf die, Reinigung von rekombinanten VLPs, Reinigung von nativen L1- oder L2-Proteinen und Kits. Kits würden einen aufgeteilten Träger umfassen, der dazu geeignet ist, in festem Einschluss mindestens einen Behälter zu enthalten. Der Träger würde ferner Reagenzien wie den Anti-VLP-Antikörper oder das VLP, geeignet zum Nachweis von HPV oder Fragmenten von HPV oder Antikörpern gegen HPV, enthalten. Der Träger kann auch Nachweismittel, wie z.B. markiertes Antigen oder Enzymsubstrate oder dgl., enthalten. Die Antikörper oder VLP oder Kits eignen sich für eine Vielfalt von Zwecken, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, forensische Analysen und epidemiologische Studien.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines gereinigten Human-Papillomavirus (HPV)-Proteins, das HPV-Virus-ähnliche Partikel (VLPs) umfasst, umfassend:
(a) Transformieren einer Hefe mit einem rekombinanten DNA-Molekül, wobei das rekombinante DNA-Molekül für HPV-L1- oder HPV-L1- und -L2-Protein kodiert;
(b) Kultivieren der transformierten Hefe unter Bedingungen, welche die Expression des rekombinanten DNA-Moleküls zur Bildung von rohem HPV-Protein gestatten; und
(c) Reinigen des rohen rekombinanten HPV-Proteins mittels Anionenaustauschchromatographie, gefolgt von Größenausschlusschromatographie.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Hefe Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis, Hansenula polymorpha, Pichia pastoris, Kluyveromyces fragilis oder Schizosaccharomyces pombe ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Hefe Saccharomyces cerevisiae ist.

4. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das HPV HPV6a, HPV6b, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV41, HPV45 oder HPV58 ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das HPV HPV6a, HPV6b, HPV11, HPV16 oder HPV18 ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das HPV HPV6a-L1, HPV11-L1, HPV16-L1 oder HPV18-L1 ist.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

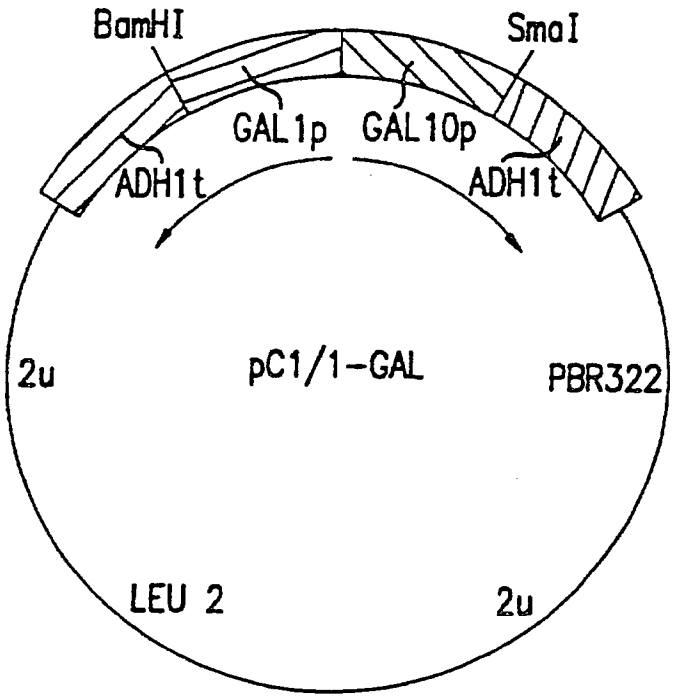
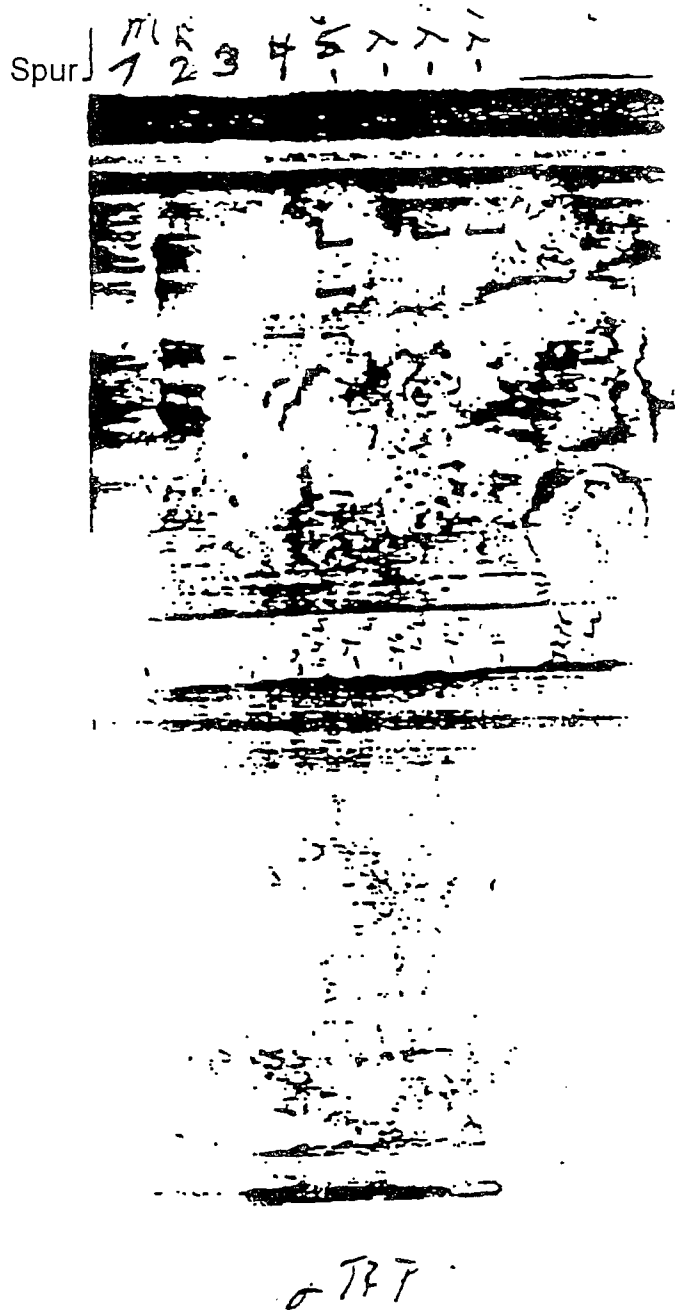


FIG.1

FIGUR 3



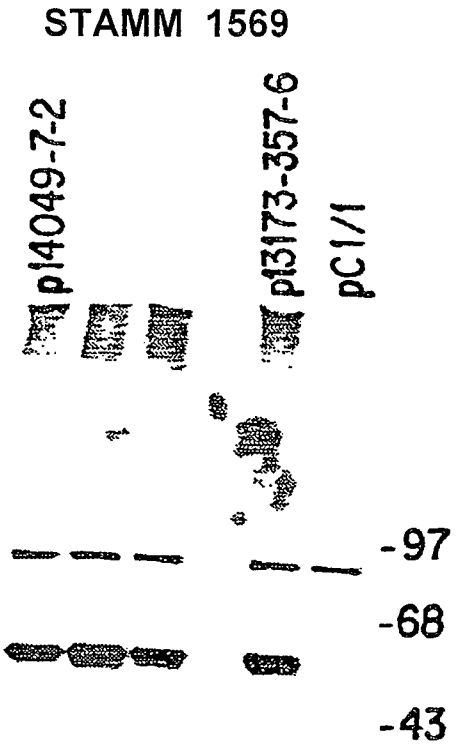

STAMM 1569
p14049-7-2
p13173-357-6
pC1/1
-97
-68
-43

FIG. 2A

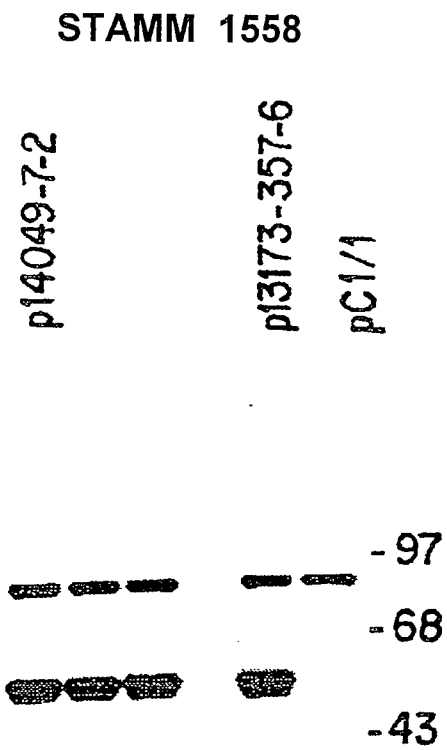
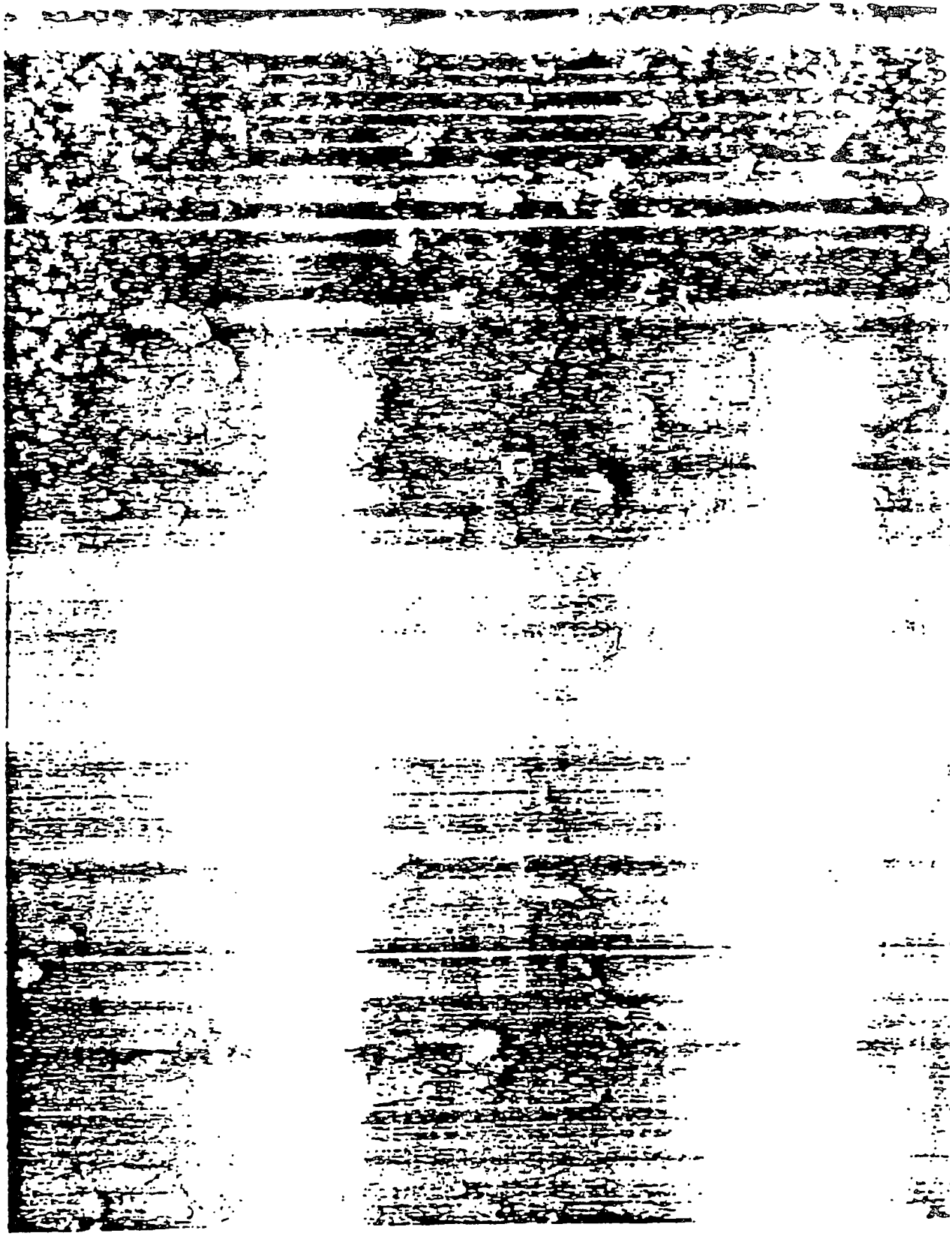
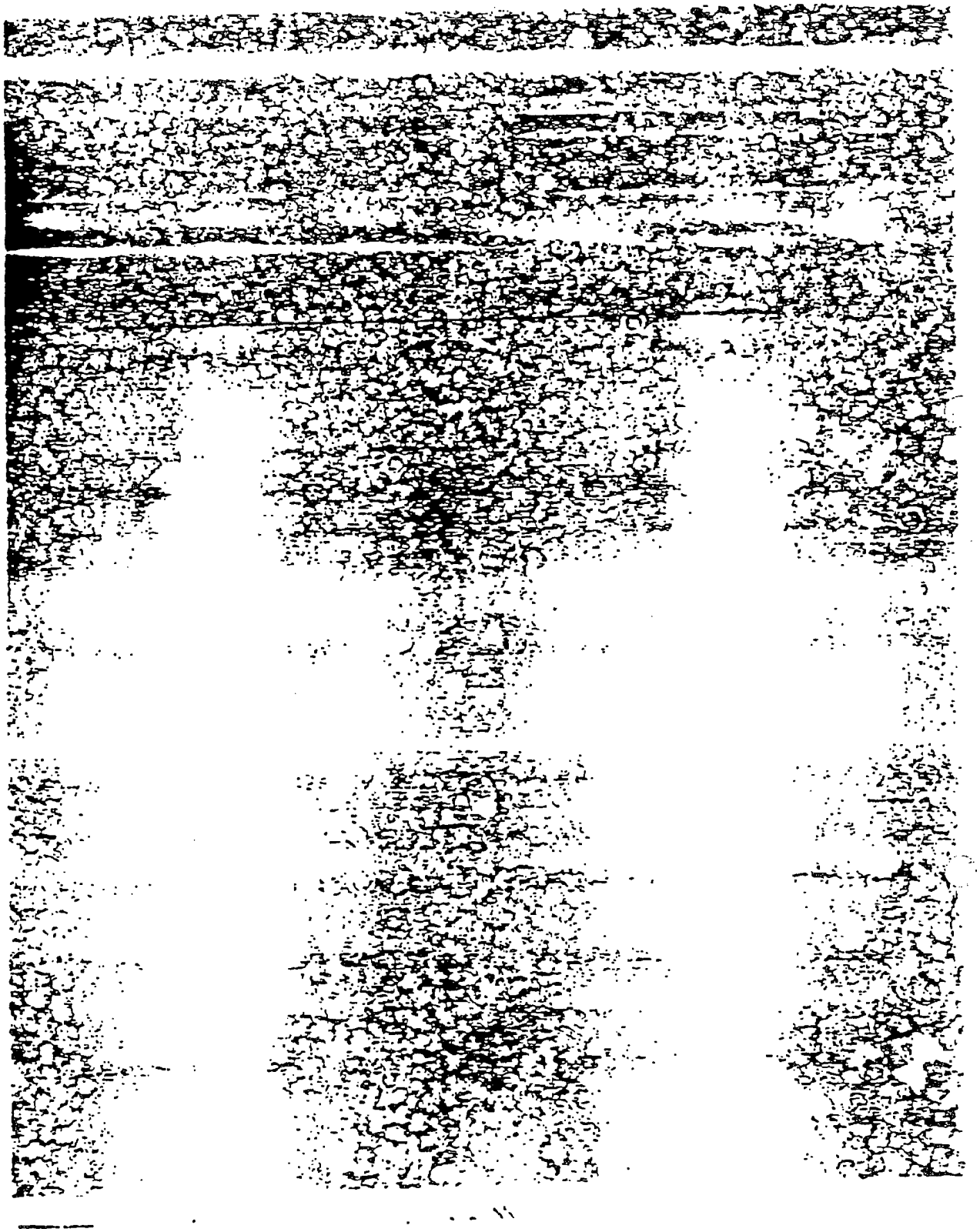

STAMM 1558
p14049-7-2
p13173-357-6
pC1/1
-97
-68
-43

FIG. 2B

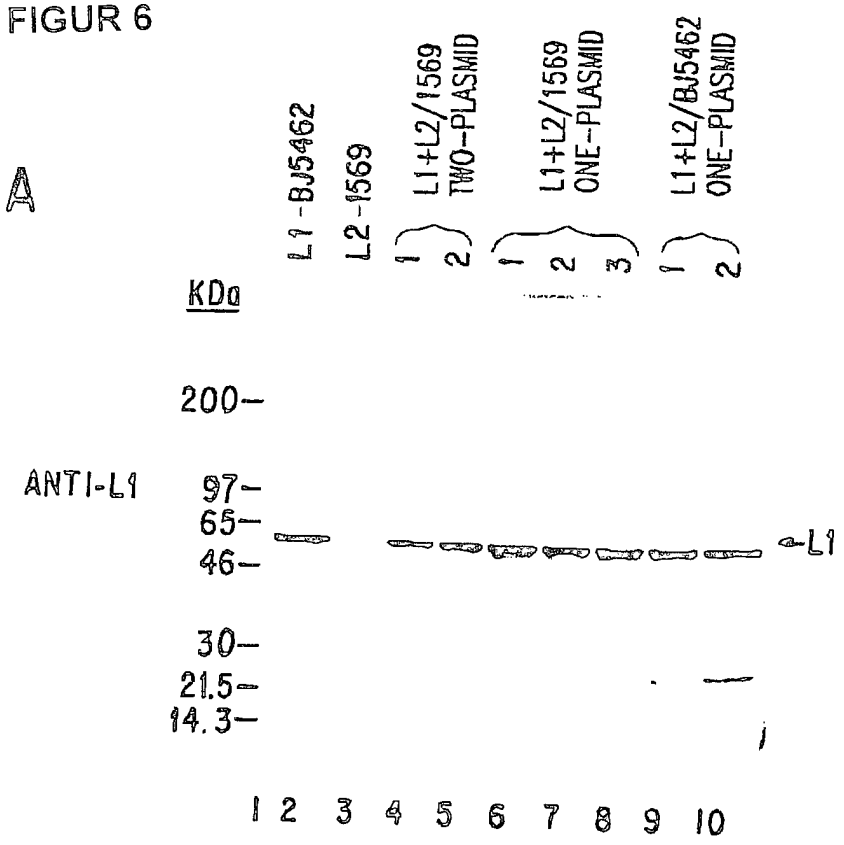
FIGUR 4

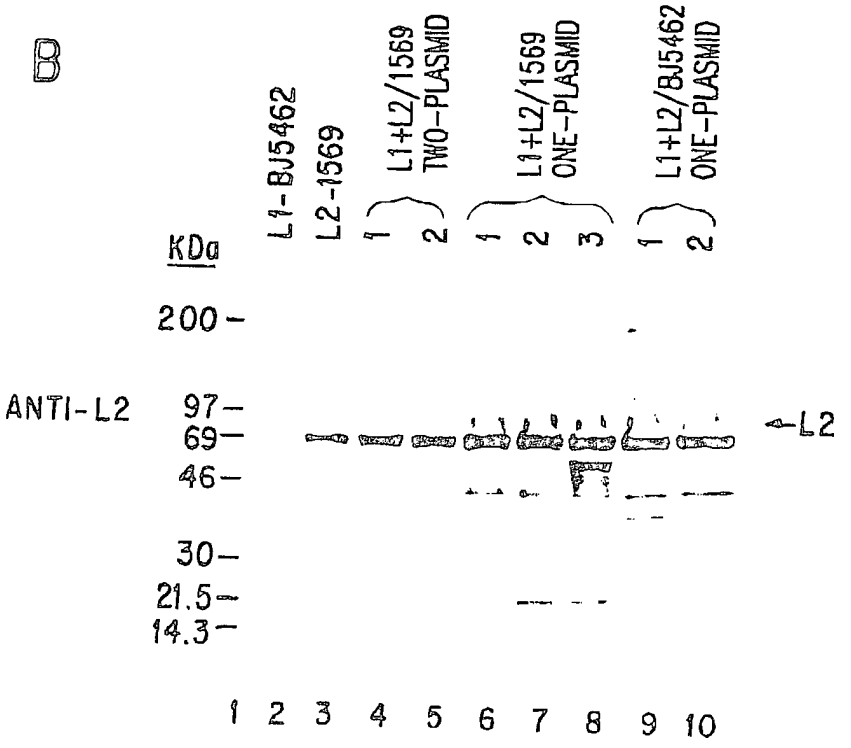


FIGUR 5



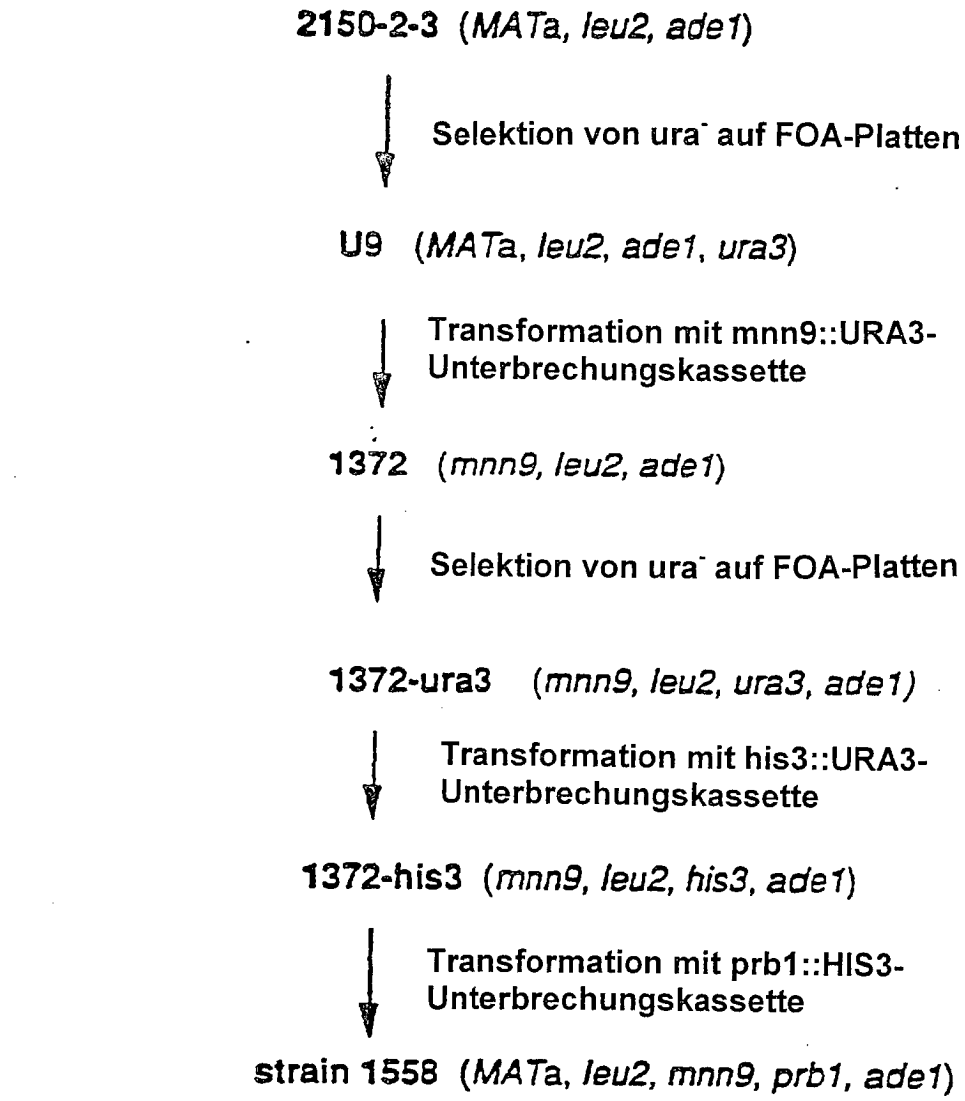
FIGUR 6


A
L1-BJ5462
L2-1569
L1+L2/1569 TWO-PLASMID
L1+L2/1569 ONE-PLASMID
L1+L2/BJ5462 ONE-PLASMID
KDa
200
97
65
46
30
21.5
14.3
ANTI-L1
L1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


B
L1-BJ5462
L2-1569
L1+L2/1569 TWO-PLASMID
L1+L2/1569 ONE-PLASMID
L1+L2/BJ5462 ONE-PLASMID
KDa
200
97
69
46
30
21.5
14.3
ANTI-L2
L2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

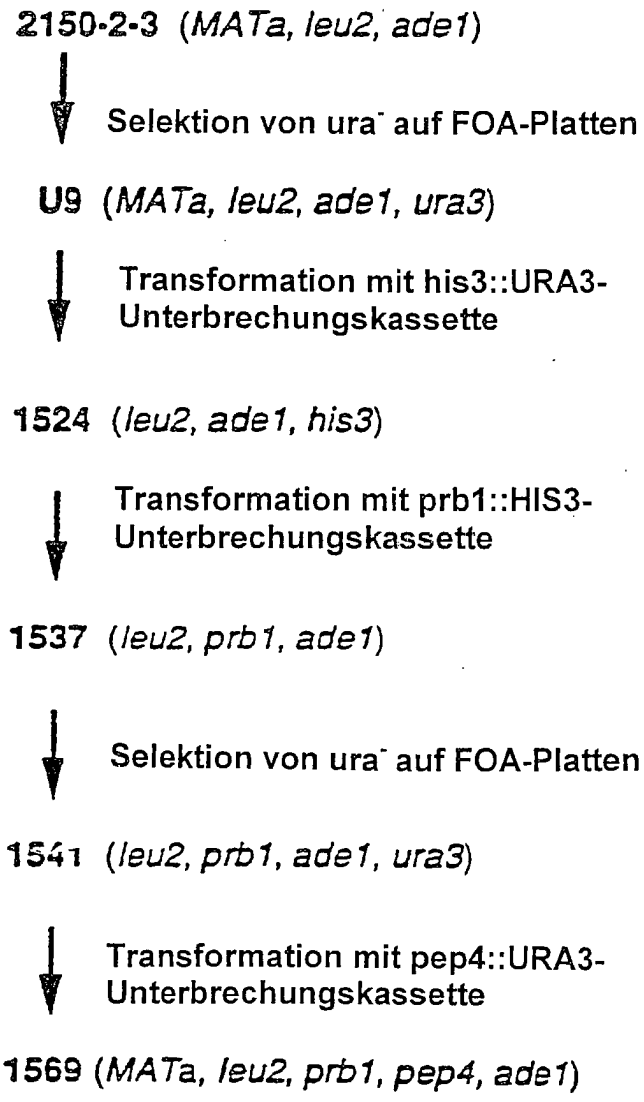
FIGUR 7

Überblick über die Konstruktion des Stammes 1558, der sowohl mnn9- als auch prb1-Mutationen enthält



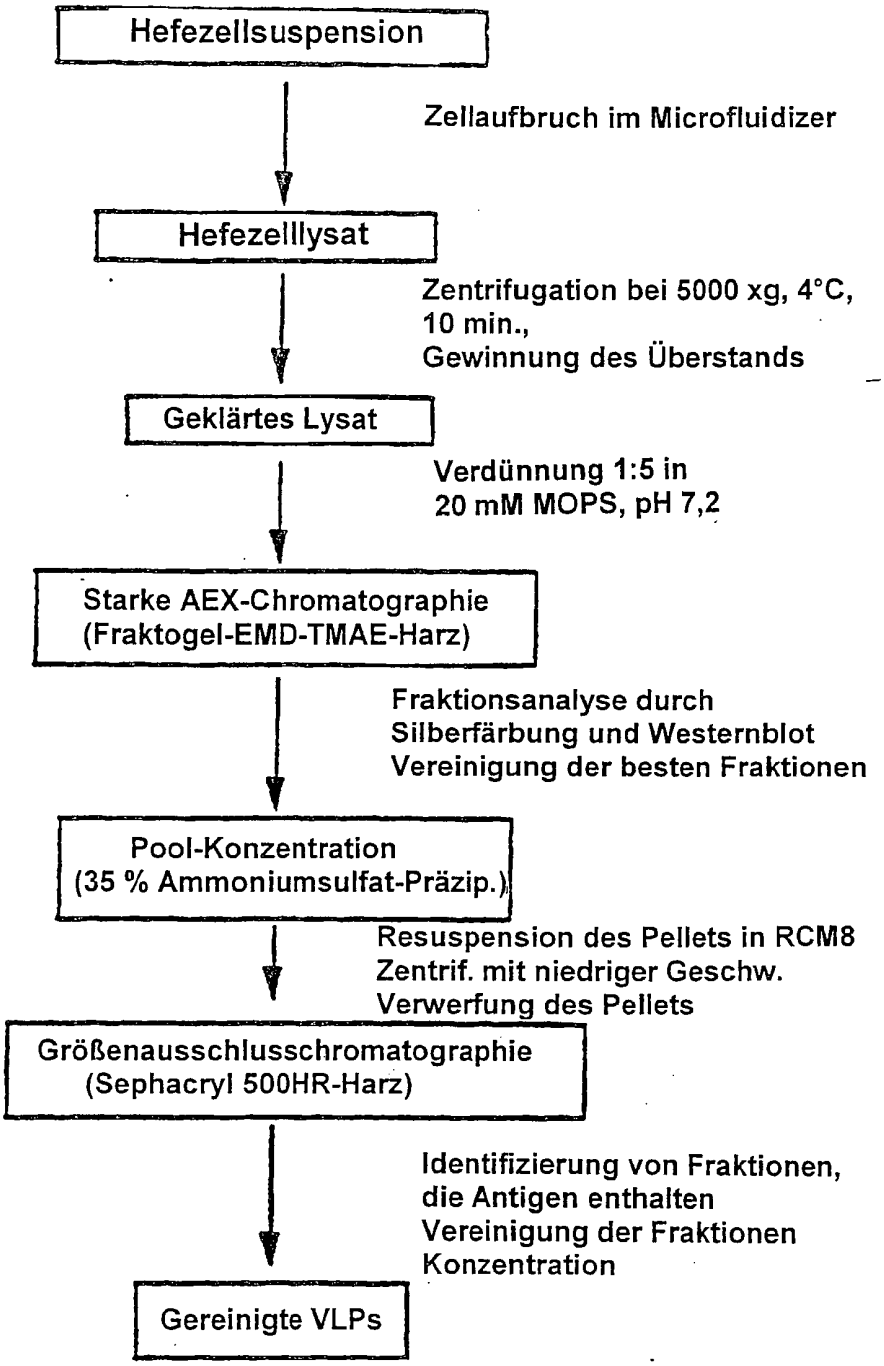
FIGUR 8

Überblick über die Konstruktion des Stammes 1569, der sowohl prb1- als auch pep4-Mutationen enthält



FIGUR 9

Prototyp-Reinigungsschema für
Human-Papillomavirus-VLPs



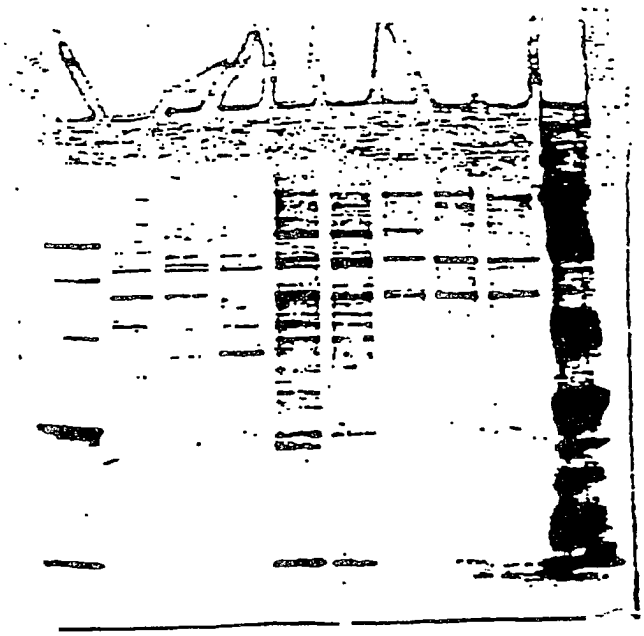
FIGUR 10

Tabelle I. Rekombinante Hefestämme, welche PV-L1- und/oder -L2-Proteine exprimieren

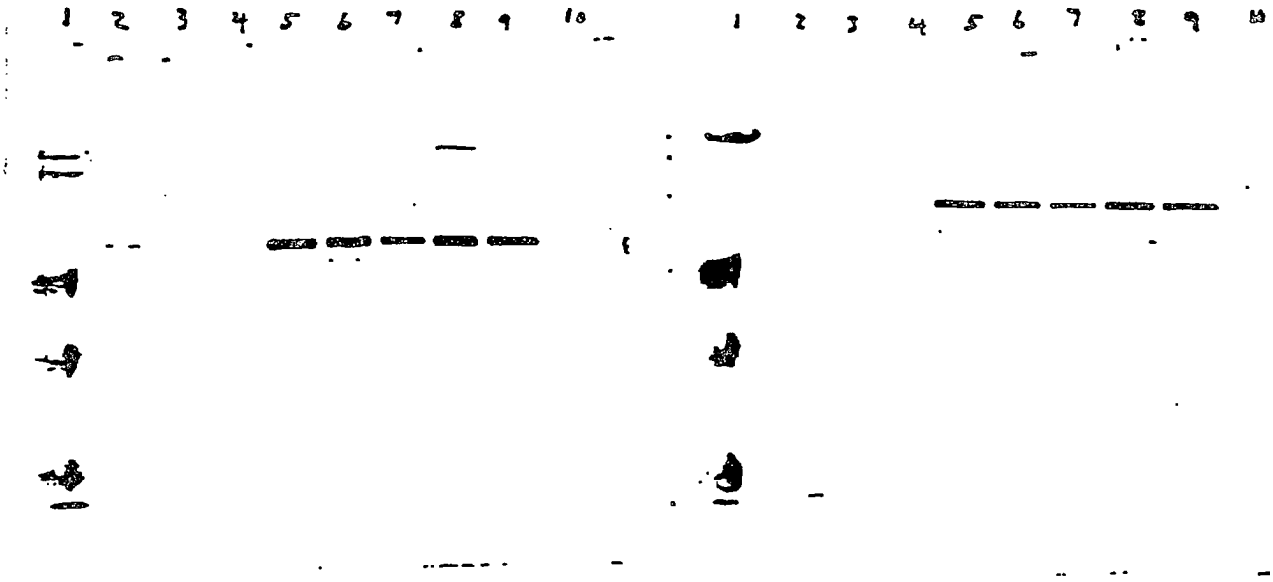
Rekombinanter Stamm	Codierende PV-Sequenz(en)	Hefe-Wirtsstamm[a]
1582	CRPV L1	1569
1583	CRPV L2	1538
1603	CRPV L1 + L2 (2-Plasmid-System)	1592
1606	CRPV L1 + L2	1569
1609	CRPV L1 + L2	BJ5462
1644	HPV 6a L1	1558
1670	HPV 6a L1 + L2	1558
1678	HPV 16 L1	1558
1679	HPV 16 L1 + L2	1558

FIGUR 11

Spur #	Probe
1	M_r-Standards
2	Geklärtes Zelllysat
3	NH_4SO_4-Überstands-Pool 1
4	NH_4SO_4-Überstands-Pool 2
5	Konzentrierter TMAE-Pool
6	Konzentrierter TMAE-Pool
7	Sephacryl 500HR-Pool 1
8	Sephacryl 500HR-Pool 2
9	Konzentriertes Endprodukt
10	M_r-Standards oder Blindprobe



Anfärbung mit kolloidalem Comassie



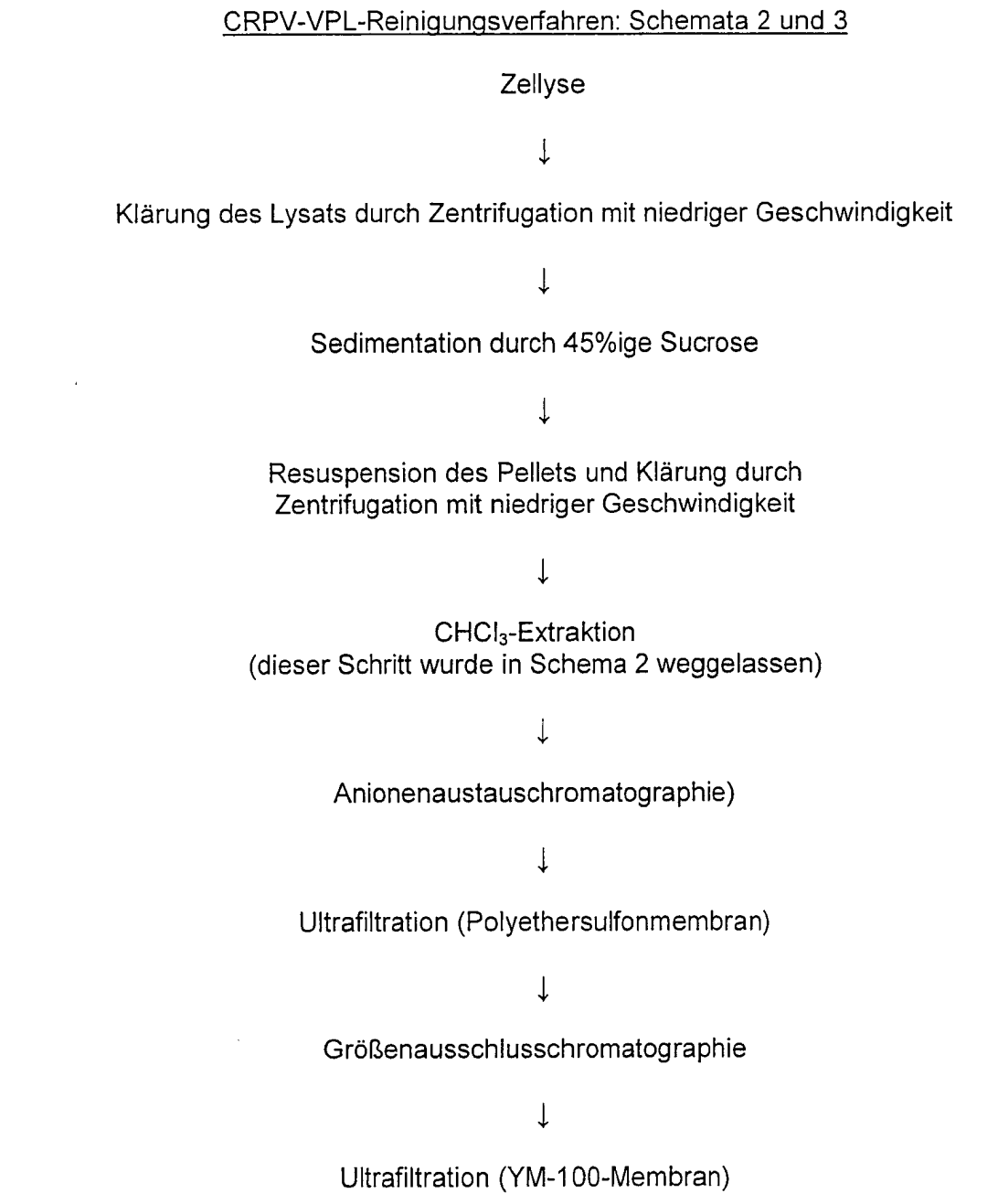
Westernblot für L1-Protein

Westernblot für L2-Protein

Reinigung von HPV Typ 16-L1 + -L2-Kapsidproteinen

FIGUR 12

3URE JC-2: Schematisches Diagramm eines CRPV-VLP-Reinigungsverfahrens

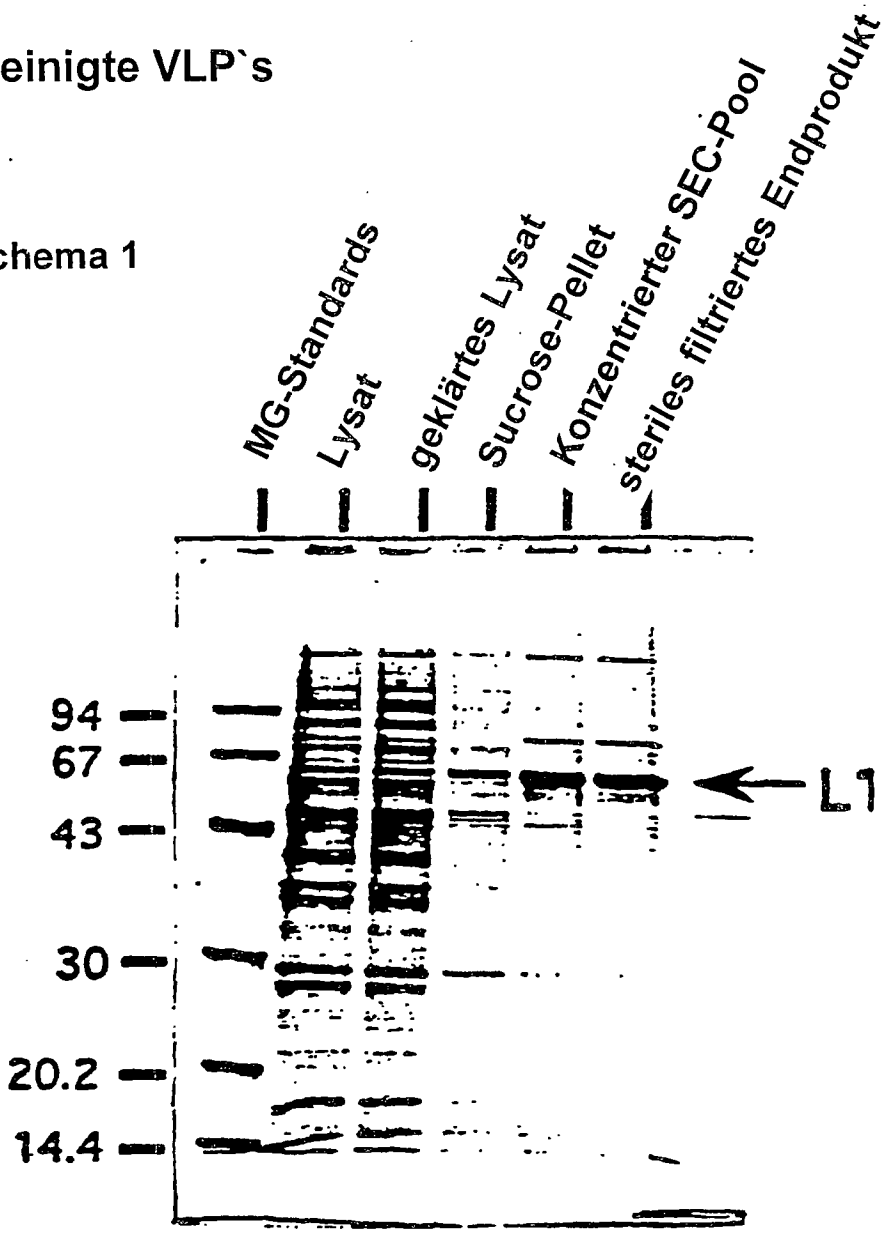


FIGUR 13

SDS/PAGE (REDUZIERENDE BEDINGUNGEN)

Gereinigte VLP`s

Schema 1



FIGUR 14

SDS/PAGE (REDUZIERENDE BEDINGUNGEN)

Gereinigte VLP`s

Schema 2 Schema 3

