



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

- (51) Int.Cl. #: **C 12 Q 1/70 (2006.01)**                      **C 12 N 15/00 (2006.01)**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1987 00529**
- (22) Indleveringsdag: **1987-02-02**
- (24) Løbedag: **1987-02-02**
- (41) Alm. tilgængelig: **1987-08-01**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **2006-04-18**
- (30) Prioritet: **1986-01-31 FR 8601425**
- 
- (73) Patenthaver: **F. Hoffmann-La Roche Ltd., Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Schweiz**
- (72) Opfinder: **Sylvie Beaudenon, 13 bis, rue des Truilles, 92140 Clamart, Frankrig**  
**Diana Kremsdorf, 35 rue Esquirol, 75013 Paris, Frankrig**  
**Odile Croissant, 19 rue Auguste Lancon, 75013 Paris, Frankrig**  
**Gerard Orth, 49 rue du Dr. Roux, 92330 Sceaux, Frankrig**
- 
- (74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**
- 

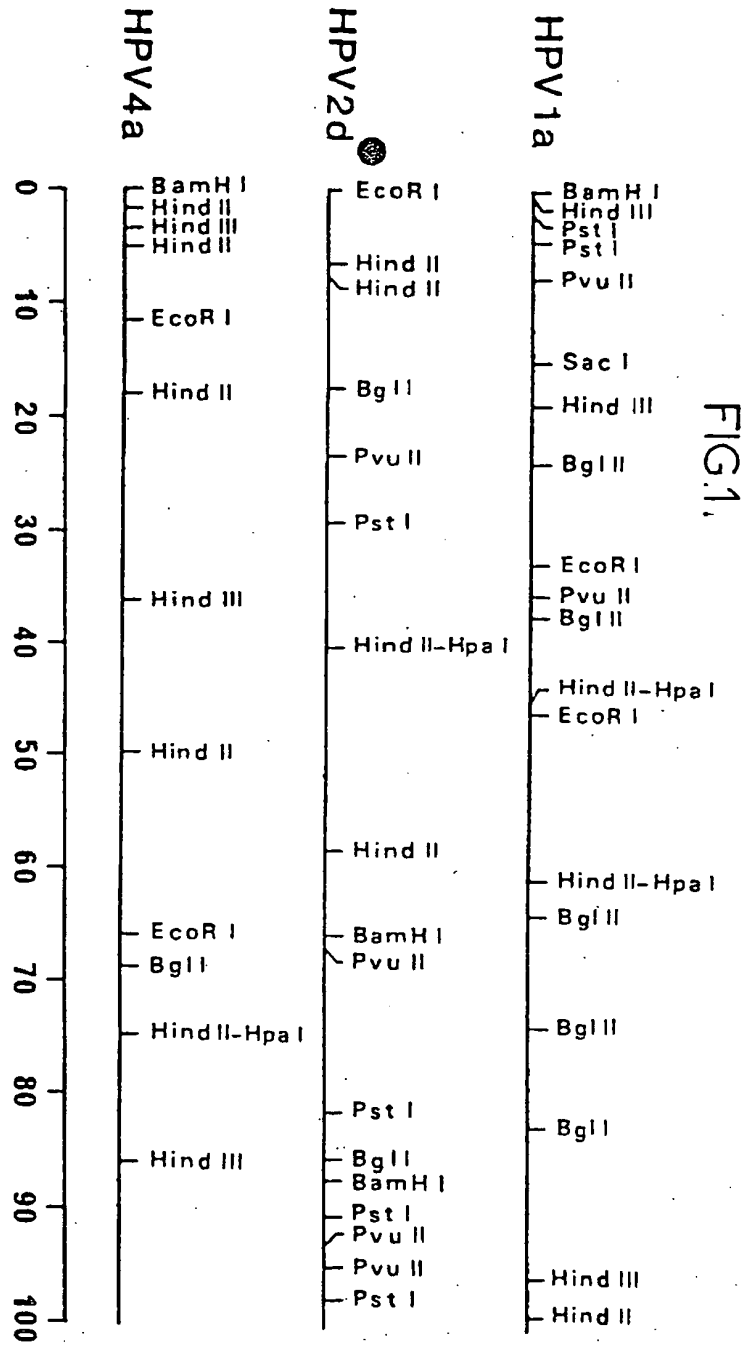
(54) Benævnelse: **DNA-fragmenter af humant papillomavirus og fremgangsmåde til in vitro diagnosticering af papillomavirusinfektioner**

(56) Fremdragne publikationer:  
**Ingen**

(57) Sammendrag:

DNA af humant papillomavirus HPV-IP5 og HPV-IP6 og fragmenter af sådanne DNA'er kan benyttes til frembringelse af midler, hvormed man kan foretage in vitro diagnosticering af papillomavirusinfektioner i biologiske prøver.

Med sådanne midler kan man diagnosticere en række hud- og slimhindsygdomme, herunder både godartede lidelser, såsom vorter, og ondartede lidelser, såsom livmoderhalskræft.



Den foreliggende opfindelse angår DNA-fragmenter af papillomavirus, og nærmere bestemt angår opfindelsen sonder afledt af papillomavirus samt en fremgangsmåde til in vitro diagnosticering af papillomavirusinfektioner under anvendelse af sådanne sonder.

5

Udtrykket "papillomavirus" omfatter et stort antal virustyper, som har det til fælles, at de gøres ansvarlige for en række former for virusinfektioner, der placeres sig imellem de relativt godartede hud- og slimhindevorter og de former for hyperplasi, der mistænkes for at kunne degenerere til intraepitelial neoplasi og hud- og slimhindecancer. Blandt sådanne papillomavirusinfektioner kan man især nævne epidermo-dysplasia verruciformis, som visse steder i det følgende er angivet ved forkortelsen "EV".

15 Der er allerede beskrevet et antal typer af papillomavirus. EP-patentansøgning nr. 85.402362.9 (publiceret den 10. september 1986 under nr. 192001) beskriver et antal nye typer og undertyper af papillomavirus, som er isoleret fra vorter, fra inficerede læsioner, som antages at kunne give anledning til udvikling af hudcancer hos store dele af de ramte personer, og fra præ-cancerlæsioner i huden, orale hyperplasi-læsioner og cancer i livmoderhalsen.

25 Man har nu anerkendt den vigtige rolle, som de forskellige typer af humant papillomavirus (HPV) spiller i forbindelse med dannelsen af neoplasma. Disse virustypers patogenicitet påvirkes ligeledes af forskellige genetiske faktorer, især immunologiske og/eller udefra kommende faktorer, såsom kemisk stråling i patogenesen af papillomavirusinfektioner.

30 Flere nye typer og undertyper af papillomavirus er identificeret i den ovennævnte ældre patentansøgning. Udnyttelsen af DNA'er fra disse nye papillomavirustyper, enten

hver for sig eller i kombinationer, i mere raffinerede diagnoseteknikker in vitro, eventuelt sammen med DNA'er af tidligere kendte papillomavirustyper, er ligeledes beskrevet i den ovennævnte patentansøgning.

5 Generelt anføres det i den ovennævnte EP-patentansøgning, at de omtalte papillomavirustyper ganske vist indbyrdes er særdeles forskellige, men at de har en størrelse på omkring 7.000 - 8.000 basepar. Desuden kan deres geno-  
10 mer fremvise bestemte grader af homologi, bedømt som procentvis homologi imellem forskellige typer og undertyper af papillomavirus, ved hybridiseringsforsøg gennemført under kritiske eller ikke-kritiske hybridiseringsbetin-  
15 gelser.

Det er anført, at papillomavirus, som udviser grader af  
15 homologi på under 50% under nøjagtige eller kritiske hybridiseringsbetingelser, hører til forskellige virustyper. De virustyper, for hvilke man under nøjagtige eller kri-  
20 tiske hybridiseringsbetingelser observerer grader af homologi på over 50%, betragtes som hørende til den samme type. De kan danne forskellige undertyper inden for den-  
25 ne samme type.

Hybridiseringsforsøgene under ikke-kritiske betingelser omfatter, at man bringer DNA'er hidrørende fra to virus-  
isolatorer i indbyrdes kontakt under de følgende betin-  
25 gelser, som er beskrevet af Heilman, C.A. et al., 1980; J. Virol., 36, 395-407 og Croissant et al., 1982, C.R. Acad. Sc. Paris, 294, 581-586 (heteroduplex-molekyler).

Hybridiseringsforsøgene under nøjagtige eller kritiske betingelser omfatter, at man bringer DNA'er hidrørende  
30 fra to virusisolater i indbyrdes kontakt under de betingelser, der er beskrevet af Heilman, C.A., et al., 1980, og Kremsdorf, D., et al. ((1982), J. Virol. 43:436-447 og 1983, J. Virol. 48:340-351) samt af Davis, R.W., et al.,

1971, Methods Enzymol., 21, 413-418 (heteroduplex-molekyler).

Betegnelsen af visse af de i teksten beskrevne HPV er modificeret i henhold til den i vore dage gældende internationale nomenklatur.

5 Især bærer de i den nedenfor angivne liste identificerede isolater i hvert tilfælde efter "i stedet for" (og dem, som er angivet i nærværende tekst) nutidige betegnelser, som er angivet til venstre.

- 10 HPV32 i stedet for HPV31 (BEAUDENON S. et al., 1987)  
HPV34 i stedet for HPV32 (KAWASHIMA M. et al., 1986)  
HPV33 i stedet for HPV-IP2 (BEAUDENON S. et al., 1986)  
HPV36 i stedet for HPV-IP4 (KAWASHIMA M. et al., 1986)  
HPV39 i stedet for HPV-IP5 (BEAUDENON S. et al., Virology 161:374-  
15 384, 1987)  
HPV42 i stedet for HPV-IP6 (BEAUDENON S. et al., Virology 161:374-  
384, 1987)

De forkortelser, som anvendes i den foreliggende tekst til identifikation af forskellige papillomavira, er i overensstemmelse med den gældende, aktuelle internationale nomenklatur. Dertil anvendes i det nedenstående - hvor det er hensigtsmæssigt - de tidligere anvendte forkortelser, idet de tidligere forkortelser følger umiddelbart efter de korrigerede forkortelser i overensstemmelse med den internationale nomenklatur. Disse tidligere forkortelser er omgivet af parenteser.

Med udgangspunkt i disse betragtninger er flere nye virusarter gjort til genstand for en karakteriserende omtale i den ovennævnte ældre patentansøgning. Ligeledes er der i denne ansøgning beskrevet de genetiske rekombinanter, som helt eller delvis omfatter genomeerne (benævnt HPV-DNA'er) af disse virusarter. Opfindelsen beskrevet i den ovennævnte ældre patentansøgning omfatter således alle de HPV-DNA'er, som kan udvælges blandt de DNA'er, der har en størrelse i området fra 7.000 til 8.000 basepar og er karakterise-

ret ved de restriktionskort, som fremgår af ansøgningens tegnninger. Nærmere bestemt er der tale om HPV-DNA'er, som er opnået ud fra papillomavirus, og som svarer til betegnelserne HPV2d, HPV10b, HPV14a, HPV14b, HPV15, HPV17a,, HPV17b, HPV19, HPV20, HPV21, 5 HPV22, HPV23, HPV24, HPV28, HPV29, HPV31, HPV32, HPV-IP2 og HPV-IP4.

Den ovennævnte ældre EP-patentansøgning omfatter desuden blandinger eller "coctails" af HPV-DNA'er isoleret fra nye papillomavirusarter eller papillomavirus, som var kendt på ansøgningens indleveringsdag, eller hybridiseringssonder, som indeholder disse HPV-DNA-blandinger, og som mere effektivt kan anvendes til diagnose af forskellige kategorier af infektioner, endog de risikoniveauer, som ledsager opdagelsen af et bestemt papillomavirus hos 15 en patient. Antallet af papillomavirus-sonder beskrevet i den ovennævnte EP-ansøgning, hvortil kommer sonder bestående af genomisk DNA fra allerede isoleret papillomavirus og disses forbindelser i de bestemte blandinger, gør det således muligt at gennemføre avancerede diagnoser, i særdeleshed en høj grad af adskillelse af 20 de forskellige kategorier af infektioner, som må tilskrives forskellige typer af papillomavirus, eller som må mistænkes for at være udviklet under indvirkning af disse sidstnævnte typer. Inden for en bestemt kategori af infektioner bliver det endvidere muligt i større udstrækning at forudsige graden af risiko for, at infektionerne transformerer sig til mere farlige sygdomme. Nærmere bestemt tilvejebringer den ovennævnte ældre ansøgning et middel, som i tilfælde af infektioner, der manifesterer sig ved epidermodysplasia verruciformis, gør det muligt i højere grad at bedømme risikoen for, at denne sidstnævnte tilstand udvikler sig i retning 25 af hudcancer.

Opfindelsen, som er beskrevet i den ovennævnte EP-patentansøgning, omfatter således nærmere bestemt midler til diagnostiske formål. En foretrukken gruppe af midler til disse formål er defineret ved, 35 at de indeholder:

- 1) i det mindste DNA'et af HPV2d,
- 2) mindst ét af DNA'erne af HPV10b, 28 og 29,
- 3) mindst ét af DNA'erne af HPV17 og 24,
- 4) mindst ét af DNA'erne HPV14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23 og 36  
5 (IP4),
- 5) mindst ét af DNA'erne af HPV15 og 17,
- 6) DNA'et af HPV24,
- 7) DNA'et af HPV14, 34 (32) og 36 (IP4),
- 8) DNA'et af HPV32 (31),
- 10 9) DNA'et af HPV34 (32) og
- 10) mindst ét af DNA'erne af HPV16, 18 og 33 (IP2),

sådan at forstå, at DNA'erne i de ti grupper er valgt på en sådan måde, at de under alle omstændigheder er indbyrdes forskellige.

15

I gruppen (10) er DNA'et af HPV33 (IP2) fortrinsvis knyttet til DNA'et af HPV16 eller HPV18.

20

På de medfølgende tegningsfigurer 1 til 10 er vist de fysiske restriktionskort for de pågældende HPV-DNA'er.

25

Disse fysiske restriktionskort angiver beliggenheden af de steder, hvor forskellige restriktions-endonucleaser bevirker skæring. Kortenes origin består generelt af et enkelt skæringssted. De enkelte afstande fra dette origin er udtrykt som procenter af genomets længde.

30

Den foreliggende opfindelse angår for nyligt isolerede papillomavirus, genomiske DNA'er, som kan ekstraheres derfra, eller fragmenter af disse genomiske DNA'er, og opfindelsen angår endvidere hidtil ukendte krydsede sonder, som kan tilvejebringes ud fra disse HPV-DNA'er eller HPV-DNA-fragmenter.

35

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af en HPV-DNA-sonde, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendomme-

lig ved, at man kloner en vektor ind i en passende værtsorganisme, idet denne vektor på forhånd er blevet modificeret ved rekombination in vitro af et helt DNA eller en del af et DNA fra en virus valgt blandt HPV39 (IP5) og HPV42 (IP6) og en passende vektor, 5 hvorved man opnår et rekombinant DNA, der indeholder dette DNA på et sted i vektoren, som muliggør dennes kloning i værtsorganismen, især i en bakterie, hvorefter man udvinder og renser det klonede rekombinant-DNA. Den anvendte vektor kan med fordel være et plasmid eller en phag, som er i stand til at replikere i en proka- 10 ryot mikroorganisme, såsom E. coli.

Det foretrækkes endvidere, at denne DNA-HPV-sonde forsynes med en markering for at lette betingelserne for dens anvendelse. Til dette formål kan man anvende et hvilket som helst markeringsprincip, 15 såsom radioaktiv, immunofluorescerende eller enzymatisk markering.

Opfindelsen angår endvidere hidtil ukendte "coctails" indeholdende sådanne sonder samt anvendelsen af sådanne sonder i "coctails" af allerede kendte sonder, som er beskrevet i den ovennævnte ældre 20 ansøgning, men som er kompletteret med et af de HPV-DNA'er, der omfattes af opfindelsen. Følgelig angår opfindelsen også forbedrede sæt eller "kits" til diagnostisk anvendelse.

De omhandlede HPV-DNA'er er karakteriseret ved de restriktions- 25 kort, som fremgår af figurerne 10 og 11, og de benævnes henholdsvis HPV39 (HPV-IP5) og HPV42 (HPV IP6).

De krydsede sonder, som konstrueres ud fra HPV39 (IP5)- eller HPV42 (IP6)-genomet, er særligt anvendelige under de betingelser, 30 som er beskrevet i den ovennævnte ældre ansøgning, og som ligeledes vil blive beskrevet nedenfor, til diagnosticering og/eller opsporing in vitro af de typer af papillomavirus, som udgør en risiko for udvikling af genital-neoplasia, i særdeleshed cancer i livmoderhalsen.

35

Disse krydsede sonder kan med fordel inkorporeres i blandinger til diagnosticering af sygdomme af den samme type som den, der beskrives nærmere nedenfor.

- 5 Opfindelsen angår også fragmenter af de i forvejen kendte HPV-DNA'er, som er i stand til at hybridisere med de nye fragmenter ifølge opfindelsen, især under kritiske betingelser. Endvidere angår opfindelsen rekombinant-DNA'er, der indeholder hver af de ovennævnte HPV-DNA'er eller en del heraf, nærmere bestemt rekombinant-DNA'er indeholdende de fragmenter, der svarer til generne E1, 10 E2, E6-E7, L1, L2 og den intergeniske region NC, eller de fragmenter, der indeholder sekvenser svarende til de intergeniske regioner af HPV-DNA'er. Endelig angår opfindelsen sonder, som kan tilvejebringes på grundlag af disse HPV-DNA'er eller på grundlag af 15 tilsvarende fragmenter, samt metoder til diagnosticering in vitro ved anvendelse af disse sonder.

DNA-virus-præparaterne ekstraheres ved anvendelse af de teknikker, som er beskrevet nedenfor i eksemplerne 1 og 2.

- 20 Nedenfor følger en mere detaljeret beskrivelse af de betingelser, hvorunder man isolerer virus, og de betingelser, hvorunder man opnår HPV-DNA'er ud fra de pågældende virus.

- 25 Molekylær kloning og karakterisering af en ny type HPV knyttet til genital-neoplasia og til cancer i livmoderhalsen (HPV39) (HPV-IP5)

- En ny type HPV er påvist i DNA udvundet ved biopsi af intraepithelial neoplasia (bowenoide papler på penis), gennem molekylær hybridisering på kopien under ikke-kritiske betingelser. Der anvendes 30 en radioaktiv DNA-sonde, som var specifik for HPV6 eller HPV10. En undersøgelse af sensibiliteten af DNA'et af dette HPV over for forskellige restriktions-endonucleaser viste, at enzymet EcoRI overskærer det virale DNA en gang. Efter digestion af DNA'et 35 udvundet fra læsioner med enzymet EcoRI bliver den fraktion, som

omfatter DNA-molekyler på 8 kb, renses ved centrifugering i en saccharose-gradient. DNA-molekylerne på 8 kb indføres ved EcoRI-stedet i DNA'et af bacteriophagen  $\lambda$ gtWES $\lambda$ B. Efter indkapsling af rekombinant-DNA'et og infektion med bakterien *Escherichia coli* K12 (stamme LA101) bliver de rekombinante bacteriophager, som har integreret HPV-DNA'et, udvalgt ved hjælp af en hybridiseringsteknik på lyseringsplader (Benton og Davis) under anvendelse af en radioaktiv DNA-sonde, som er specifik for DNA'et af HPV6, under ikke-kritiske betingelser. Flere rekombinante bacteriophager, som til-

5 sammen indeholder alle de virale sekvenser, isoleres. Skæringen af de rekombinante bacteriophagers DNA med indføringsenzymet EcoRI frembringer et fragment med en størrelse på 8 kb, som krydses med DNA'et af HPV6 under ikke-kritiske betingelser. Skæringen af de rekombinante bacteriophagers DNA og af DNA-præparatet, der er ud-

10 vundet fra læsioner fremkaldt af en blanding af endonucleaserne EcoRI og PstI, frembringer de samme syv fragmenter, hvis totale molekylvægt svarer til molekylvægten af et HPV-genom (8 kb).

15

DNA'et af det nye HPV blev udskåret i phag-DNA-sekvenser og på ny klonet ind i plasmidet pSP65. Et restriktionskort for det virale DNA blev konstrueret på basis af undersøgelser af sensibiliteten af dette DNA på 16 restriktions-endonucleaser. Der blev således lokaliseret 22 overskæringssteder (fig. 10). Restriktionskortet for det nye HPV er forskelligt fra restriktionskortene for samtlige de HPV'er, der på dette tidspunkt er identificeret. Graden af homologi imellem DNA'et af det nye HPV og DNA'erne af de HPV'er, der er identificeret på nuværende tidspunkt, er blevet analyseret ved hybridiseringsforsøg på kopierne under fastlagte betingelser, idet man anvendte en radioaktiv sonde fremstillet på basis af oprenset DNA fra det nye HPV. Man påviste en delvis homologi med DNA'et af HPV18 og, i mindre grad, med DNA'et af HPV26. Desuden påvistes en svag homologi med DNA'erne af HPV-typerne 2, 6, 10, 13, 29, 32 (31) og HPV33 (IP2). Graden af homologi imellem DNA'et af det nye HPV og DNA'et af HPV18 er bestemt mere nøjagtigt ved

20

25

30

35 DNA-DNA-reassociationsforsøg i flydende medium efterfulgt af en

behandling af hybridiseringsgrad på 2% imellem disse to DNA'er. Dette nye virus, som er karakteriseret på basis af bowenoide papillomer på penis, udgør således en hidtil ukendt HPV-type, som foreløbig benævnes HPV39 (IP5).

5

En analyse i elektronmikroskop af de heteroduplex-molekyler, der under forskellige betingelser dannes imellem DNA'et af HPV39 (IP5) og DNA'et af HPV42 (16), har gjort det muligt at ensrette og dermed sammenligne de fysiske kort over disse to genomer og definere de teoretiske positioner af de forskellige gener, der bæres af DNA'et af HPV39 (IP5), i forhold til begyndelsespunktet for kortet over dette DNA. Disse positioner er udtrykt som procenter af genomets længde i forhold til dette origin (punktet nul på restriktionskortet vist på fig. 10).

15

Formodet lokalisering af de vigtigste gener og  
den intergeniske region (NC) i HPV39 (IP5)

20		IP5
	E6-E7	18-28
	E1	28-53
	E2	51,5-66
	L2	69,5-89
25	L1	87-8
	NC	7,5-18

En udnyttelse af radioaktive sonder fremstillet ud fra DNA fra rensede HPV39 (IP5) har gjort det muligt at bestemme den patogene styrke af dette virus. I løbet af en undersøgelse af 1522 udtagne prøver af cervico-vaginale celler, bestemt til at fastslå frekvensen af de infektioner af livmoderhalsens epitel, som skyldes et HPV, påviste man HPV39 (IP5) i 5 af de 110 prøver, der indeholdt et HPV. På den anden side påviste man HPV39 (IP5) i 3 ud af 93 biopsier analyseret for angribende cancer i livmoderhalsen. I disse

35

tre tilfælde observerede man en integration af samtlige DNA-sekvenser fra HPV39 (IP5) i det cellulære DNA.

5 HPV39 (IP5) er således en genital HPV-type, som udgør et potentielt concogen. Det er således ønskeligt at inkorporere den i alle blandinger af HPV-DNA'er, som er beregnet til fremstilling af molekylære sonder, med henblik på diagnosticering eller opsporing af HPV-typer, der udgør en risiko for udvikling af genitale neoplasier, herunder især cancer i livmoderhalsen.

10

Molekylær kloning og karakterisering af en ny HPV-type knyttet til genitale læsioner (HPV42 (IP6))

15 En anden, hidtil ukendt, HPV-type er påvist i DNA udvundet fra vulva-læsioner beskrevet som papillomer, der udviser minimal cellulær atypi, ved hybridisering under kritiske betingelser med en radioaktiv DNA-sonde, der er specifik for HPV32 (31). En undersøgelse af sensibiliteten af DNA'et af dette HPV over for forskellige restriktionsenzymmer har vist, at enzymet BamHI overskærer det

20 virale DNA en enkelt gang. Efter digestion af DNA, som er udvundet fra læsioner med enzymet BamHI, blev DNA-molekylerne med en størrelse på 8 kb oprenset ved centrifugering i en saccharose-gradient og derefter indført på BamHI-stedet i DNA'et af bacteriophag

25 lambda L 47.1. Efter indkapsling af det rekombinante DNA og infektion med Escherichia coli K12-bakterier (af stammen LA 101) blev de rekombinante bacteriophager, som havde integreret DNA'et af det nye HPV, udvalgt ved hybridiseringsteknik på lyseringsplader (Benton og Davis), idet man anvendte en radioaktiv DNA-sonde, som var specifik for HPV32 (31), under kritiske betingelser. Der isolerede

30 flere rekombinante bacteriophager, der indeholdt samtlige de virale sekvenser. Overskæringen af DNA'et fra de rekombinante bacteriophager med endonucleasen BamHI frembringer et fragment med en størrelse på 8 kb, der krydses med DNA'et af HPV32 (31) under kritiske betingelser. Skæringen af DNA'et fra de rekombinante bacteriophager og af DNA-præparatet, der er udvundet fra læsioner, med

35

en blanding af endonucleaserne BamHI og PstI frembringer de samme syv fragmenter, hvis totale molekylvægt svarer til molekylvægten af et papillomavirus-genom.

- 5 DNA'et af det nye HPV blev udskåret i phag-DNA-sekvenser og på ny klonet ind i plasmidet pSP64. Et restriktionskort over DNA'et af det nye HPV er blevet konstrueret på basis af undersøgelser af følsomheden af dette DNA over for 20 restriktions-endonucleaser. På denne måde lokaliseredes 26 kløvningssteder (fig. 10). Dette
- 10 restriktionskort er forskelligt fra restriktionskortene for samtlige de HPV'er, der til dato er isoleret. Graden af homologi imellem DNA'et af det nye HPV og DNA'erne af de til dato identificerede HPV'er er blevet analyseret ved hybridiseringsforsøg på kopierne under kritiske betingelser, idet man anvendte en radioaktiv
- 15 DNA-sonde, som var specifik for det nye HPV. Man har observeret en partiel hybridisering med DNA'et af HPV32 (31), og en svagt krydset hybridisering blev opnået med DNA'erne af HPV6, HPV13 og HPV33 (IP2). Homologierne imellem DNA af det nye HPV og DNA af HPV32 (31) blev bestemt mere nøjagtigt ved DNA-DNA-reassociation i flydende medium efterfulgt af en behandling af hybriderne med S1-nuclease. Man påviste en hybridisering på 20% imellem de to
- 20 DNA'er. Virus isoleret fra bowenoide vulva-papillomer udgjorde således en ny HPV-type, som foreløbig benævnes HPV-IP6.
- 25 En elektronmikroskopisk analyse af de heteroduplex-molekyler, som dannes under forskellige betingelser imellem DNA fra HPV-IP6 og DNA fra HPV32 (31), gør det muligt at sammenstille de fysiske kort over disse to genomer og derved definere den teoretiske position af de forskellige gener, som bæres af DNA'et af HPV42 (IP6), som
- 30 angivet nedenfor i forhold til nulpunktet af kortet på fig. 11 og udtrykt i procent af længden.

Formodet lokalisering af de vigtigste gener og  
den intergeniske region (NC) i HPV42 (IP6)

		HPV42 (IP6)
5	E6-E7	11,5-21,5
	E1	21,5-46,5
	E2	45-59,5
	L2	63-82,5
10	L1	80,5-15
	NC	1,5-11,5

Anvendelse af radioaktive sonder fremstillet ud fra rensede DNA fra HPV-IP6 har gjort det muligt at bestemme den patogene styrke af dette virus. Man har analyseret prøver af proliferative godartede læsioner (condylomer og papillomer) eller af intraepitheliale neoplasier fra de ydre kønsorganer, perinealområdet og livmoderhalsen hidrørende fra 163 patienter. Man påviste DNA fra HPV42 (IP6) hos 10 patienter med godartede læsioner (condylomer og papillomer). I løbet af en undersøgelse af 1522 udtagne prøver af cervico-vaginale celler, beregnet til at fastslå den hyppighed, hvormed livmoderhalsens epitel inficeres af et HPV, påviste man DNA fra HPV42 (IP6) i 9 prøver svarende til en normal eller inflammatorisk cytologi eller til en let dysplasi i 110 prøver indeholdende et HPV-DNA.

HPV42 (IP6) udgør således en yderligere genital HPV-type, der optræder relativt hyppigt, og som sandsynligvis kun besidder en svag potentiel oncogen virkning. Det er således ønskeligt at inkorporere HPV-IP6 i alle HPV-DNA-blandinger, som er beregnet til fremstilling af molekulære sonder med henblik på diagnosticering eller opsporing af seksuelt overførte HPV typer, som kan fremkalde godartede genitale tumorer, og som ikke udgør nogen væsentlig risiko for udvikling af genitale neoplasier, i særdeleshed livmoderhalskræft.

- Under indtryk af de store indbyrdes forskelle imellem HPV'er, som kan isoleres fra forskellige former for vorter eller andre hud- eller slimhindelæsioner, foretrækker man imidlertid til diagnosticering af hver af de påvirkningstyper, der er anført i tabellen,
- 5 at anvende blandinger, som omfatter mindst et eller to HPV-DNA'er, når først andre HPV-DNA'er er vist også at kunne gribe ind i udviklingen af den samme type af påvirkning. Diagnosticeringen af infektionens art og dens mulige udvikling vil blive så meget mere effektiv, når det anvendte antal sonder forøges. Hybridiserings-
- 10 forsøgene, som gennemføres med forskellige blandinger af sonder, gør det desuden muligt at foretage differentiale diagnosticeringer, som frembyder en grad af sandsynlighed, der er af lige så stor betydning som arten af den sygdom, som patienten lider af.
- 15 Opfindelsen angår således også blandinger eller "coctails" eller midler, der indeholder HPV-DNA39(IP5) og/eller HPV-DNA42(IP6) alene eller i blanding med andre HPV-DNA'er (eller sonder, der indeholder disse HPV-DNA'er eller sekvenser af disse), som kan anvendes i kombinationer til gennemførelse af totale diagnosticeringer
- 20 af forskellige former for infektioner med papillomavirus, eventuelt med det formål at forudsige den mulige udvikling af infektionen.
- De foretrukne blandinger ifølge opfindelsen er angivet i den efterfølgende tabel:
- 25

## TABEL

Egenskaber af HPV-DNA-blandinger til anvendelse ved virologisk  
diagnosticering af papillomavirusinfektioner

Blan- ding nr.	Konstitution (type af HPV) <sup>1)</sup>	Sygdomme, der kan diagnosticeres
1	1, 2d, 4	Hud- og slimhindevorter (især almindelige vorter og fodvorter). Differential diagnosticering af epidermo-dysplasia verruciformis.
2	3, 10a, 10b, 28, 29	Plane eller intermediære hud- eller slimhindevorter. Intraepi- thelial neoplasia og hudcancer. Differential diagnosticering af epidermo-dysplasia verruciformis.
3	5, 17a, 24	Epidermo-dysplasia verruciformis. Intraepithelial neoplasia og hudcancer.
4	5, 8, 12, 14a, 14b, 19, 20, 21, 22, 23, 36 (IP4)	Epidermo-dysplasia verruciformis.
5	9, 15, 17a, 17b	Epidermo-dysplasia verruciformis.
6	24	Epidermo-dysplasia verruciformis.
7	5, 8, 14b, 34 (32), 36 (IP4)	Hudcancer hidrørende fra epidermo-dysplasia verruciformis. Intraepithelial neoplasia og hudcancer.
8	13, 32 (31)	Epithelial hyperplasia (fokal oral); differential diagnostic- ring af oral intraepithelial neoplasia.
9	34 (32), 36 (IP4)	Intraepithelial neoplasia og hudcancer.
10	16, 18, 33 (IP2) og 39 (IP5)	Genital neoplasia og livmoderhalscancer.
11	6, 11, 42 (IP6)	Condylomer, papillomer.

Den ovenfor viste tabel angiver også arten af de påvirkninger, som kan diagnosticeres ved anvendelse af de blandinger, som er angivet til venstre i tabellen. Som allerede anført er restriktionskortene for de øvrige HPV-DNA'er, som er identificeret i den ovenstående tabel, gengivet på figurerne 1 til 9.

Det skal bemærkes, at HPV39 (IP5) kan betragtes som værende særligt repræsentative for de sonder, der kan anvendes til påvisning af risikoen for udvikling af livmoderhalskræft, og HPV-IP6 kan opfattes som værende repræsentativ for sonder, der kan anvendes til påvisning af infektioner med godartede papillomer.

DNA'et af HPV42 (IP6) kan knyttes til DNA'et af HPV6 og/eller HPV11.

15

Endelig angår opfindelsen også en blanding af samtlige disse sonder.

Nærmere bestemt angår opfindelsen en "coctail" af sonder, der indeholder specifikke HPV-DNA'er udvundet fra genitale cancerformer, hvilken "coctail" indeholder:

25

- HPV33 (IP2)
- HPV39 (IP5)
- HPV42 (IP6)
- HPV6
- HPV11
- HPV16
- HPV18

30

- HPV32 (31)
- HPV35

HPV42 (IP6) er repræsentativ for de sonder, der kan anvendes til påvisning af godartede papillomavirus-infektioner.

DNA'et af HPV42 (IP6) kan knyttes til DNA'et af HPV-IP6 og/eller HPV11.

Med opfindelsen tilvejebringes således også testsystemer eller "kits" til diagnosticering, hvilke systemer omfatter mindst 11 grupper, som er de 11 grupper, der anført i den ovenstående tabel under rubrikken "blanding nr.".

Det foregående har især bekræftet sig med anvendelsen af sonder indeholdende hele klonede HPV-DNA'er. Disse kan imidlertid substitueres med indklonede fragmenter af disse forskellige DNA'er, især med generne E1 eller L1 og med generne E6-E7.

Det grundlæggende princip for påvisning in vitro af HPV-DNA omfatter naturligvis en anvendelse af krydsninger frembragt under kritiske eller mindre kritiske betingelser. Man kan eksempelvis gå frem som beskrevet i det følgende, idet det naturligvis skal forstås, at de beskrevne diagnostiske forsøg ikke skal opfattes som værende begrænsende for de betingelser, hvorunder man kan anvende de omhandlede sonder eller blandinger af sonder.

Formålet med de forsøg, der gør brug af et system af sonder fremstillet ud fra blandinger af klonede HPV-DNA'er, er at påvise et HPV og at identificere HPV-typen i en biopsi, i celler opnået ved skrabning af læsioner eller i snit af biopsier, der er fikseret eksempelvis med Carnoy's blanding (ethanol, chloroform og eddikesyre, 6:3:1) og indesluttet i paraffin. Forsøget nødvendiggør en forudgående ekstraktion af prøvernes DNA'er ved metoder, hvis principper kendes og anvendes ved analysering af DNA ved molekylære hybridiseringsforsøg, og som gennemføres under kritiske eller mindre kritiske betingelser ved hjælp af radioaktive sonder (mærket med  $^{32}\text{P}$  eller  $^{35}\text{S}$ ) fremstillet ud fra blandinger af HPV-DNA'er. Hvert forsøg kræver generelt, at man anvender flere blandinger af sonder.

Man kan anvende flere forskellige metoder til hybridisering. Man kan for eksempel anvende plet-hybridiseringsmetoden. Denne metode indebærer, at man efter denaturering af DNA afsætter en fastlagt mængde af DNA'et på membranerne (nitrocellulose eller Genescreenplus), hybridiserer hver membran under sædvanlige betingelser med en blanding af sonder og påviser de radioaktive hybrider ved at bringe membranerne i kontakt med en radiografisk film. Man kan også anvende en metode med hybridisering af kopier. Denne metode består i, at man ved elektroforese på agarose-gel foretager en separation af de dannede DNA-fragmenter efter behandling af DNA'et med restriktionsenzymmer. Efter basisk denaturering overføres fragmenterne til membraner (nitrocellulose, Genescreenplus), hvor de under sædvanlige betingelser hybridiseres med forskellige blandinger af sonder. Dannelsen af radioaktive hybrider påvises, efter at membranerne er bragt i kontakt med en radiografisk film.

Man kan også anvende en metode til hybridisering in situ, for eksempel på udskåret væv, som er fikseret ved hjælp af Carnoy's blanding og indesluttet i paraffin.

De radioaktive sonder består dels af HPV-DNA'er, der er mærket ved den metode, der benævnes "nick-translation", og dels af RNA'er fremstillet ved transkription af virus-DNA'er, der er indført i en vektor, eksempelvis af typen pSP6. Anvendelsen af radioaktive sonder frembyder fordele med hensyn til en høj grad af sensibilitet, men dette udelukker ikke en anvendelse af ikke-radioaktive sonder, eksempelvis biotinylerede sonder, som kan genkendes af antistoffer, der enten i sig selv er mærkede eller selv genkendes af antistoffer, som bærer enzymatisk, fluorescerende eller lignende markering.

Således omfatter opfindelsen også udstyr eller "kits", der indeholder et antal af de ovennævnte sonder, og som

omfatter henholdsvis HPV39 (IP5) og HPV42 (IP6) på isoleret form i blanding med andre sonder, især de i det foregående nævnte, hvilke "kits" er beregnet til diagnostiske undersøgelser in vitro ved hybridisering imellem virale præparater, der er opnået fra patienter, og de forskellige grupper eller blandinger.

- Som det siger sig selv, og som det også fremgår af det foregående, er opfindelsen på ingen måde begrænset til de udførelsesformer, som er specifikt omtalt ovenfor.
- 10 Tværtimod omfatter opfindelsen alle tænkelige varianter, blandt hvilke man kan nævne den i patentkravene givne henvisning til en HPV-DNA-angivelse efterfulgt af et bestemt tal og til den angivelse, der svarer til et HPV-DNA, hvis restriktionskort er gengivet på tegningen.
- 15 Patentkravene dækker alle de HPV-DNA'er, som har det til fælles med det bestemte HPV-DNA, at de kan klassificeres under den samme type ifølge den definition, der er givet ovenfor, og også alle HPV-DNA'er, der hører til samme undertype.
- 20 Det bemærkes, at de nedennævnte rekombinant-DNA'er er deponeret den 21. januar 1986 hos C.N.C.M. (Collection Nationale des Cultures de Micro-Organismes ved Institut Pasteur i Paris under de følgende numre:

- 25 pSP65/HPV39 (IP5) (plasmid i E. coli) : nr. I-507  
pSP64/HPV42 (IP6) (plasmid i E. coli) : nr. I-508

Til orientering kan henvises til følgende bibliografi:

- 1) Dürst, M. et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:3812-3815.
- 1a) Bospart, M. et al., 1984. Embo J. 3:1151-1157.
- 30 2) Coggin, J.R., Jr. et al., 1979. Cancer Res., 39: 545-546.

- 3) Gissmann, L. et al., 1982. J. Virol. 44:393-400.
- 4) Green, M. et al., 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:4437-4441.
- 5) Heilman, C.A. et al., 1980. Virol. 36:395-407.
- 5 6) Jablonska, S. et al., 1972. Cancer Res., 32:583-589.
- 7) Jablonska, S. et al., 1982. Springer Semin. Immunopathol. 5:33-62.
- 8) Kremsdorf, D. et al., 1982. J. Virol. 43:436-447.
- 9) Kremsdorf, D. et al., 1983. J. Virol. 48:340-351.
- 10 10) Lutzner, M.A. et al., 1978. Bull. Cancer, 65:169-182.
- 11) Lutzner, M.A. et al., 1983. Lancet ii:422-424.
- 12) Migozzi, M. et al., 1965. Bull. Soc. Franc. Derm. Syph. 72:747-748.
- 15 13) Orth, G. et al., 1980. Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, 7:259-282.
- 14) Orth, G. et al., 1981. J. Invest. Dermatol. 76:97-102.
- 15) Orth, G. et al., 1979. Cancer Res. 39:1074-1082.
- 20 16) Ostrow, R.S. et al., 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79:1634-1638.
- 17) Ostrow, R.S. et al., 1983. Ann. Acad. Dermatol. 8:398-404.

- 18) Pfister, H. et al., 1983. *Cancer Res.* 43:1436-1441.
- 19) Pfister, H. et al., 1983. *J. Virol.* 47:363-366.
- 20) Pfister, H. et al., 1981. *Int. J. Caancer*, 27:  
645-650.
- 5 21) Rueda, L.A. et al., 1976. *Med. Cut. I.L.A.* 2:113-136.
- 22) Rüter, M. et al. *J. Invest. Dermatol.* 47:247-252.
- 23) Sutcliffe, J.G., 1978. *Nucleic Acids Res.* 5:2721-  
2728.
- 24) Tsumori, T. et al., 1983. *J. Gen. Virol.* 64:967-969.
- 10 De følgende litteratursteder bør ligeledes nævnes (foran  
visse af referancerne er anført et bestemt HPV, når dette  
beskrives første gang af den pågældende forfatter):
- HPV18: Boshart, M. et al., 1984. *EMBO J.* 3:1151-1157.
- HPV-IP2: Beaudenon, S. et al., 1986. *Nature* 321:246,249.
- 15 Beaudenon, S. et al., 1987. *J. Inv. Demertal*  
88, nr. 1.
- Kawashima, M. et al., 1986a. *J. Virol.* 57:  
688-692.
- 20 Kawashima, M. et al., 1986b. *Virology* 154:  
389-394.
- HPV6: De Villiers, E.M. et al., 1981. *J. Virol.* 40:  
932-935.
- HPV11: Gissmann, L. et al., 1982. *J. Virol.* 44:393-400.
- HPV31: Lorincz, A. et al., 1986a. *J. Virol.* 58:225-229.
- 25 HPV35: Lorincz, A. et al., 1986b. *Bambury Report* 21:  
225-237.
- HPV16: Durst et al., 1983.

P a t e n t k r a v :  
-----

- 5 1. HPV-DNA med en størrelse på mellem ca. 7000 og ca. 8000 basepar eller et fragment heraf, k e n d e t e g n e t ved, at det er udvundet af et papillomavirus valgt blandt HPV39 (IP5) og HPV42 (IP6).
- 10 2. DNA-fragment ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det svarer til generne E1, E6-E7, L1 eller L2 eller til et fragment, der modsvarer en intergenisk region i fragmentet, der svarer til HPV-DNA'et.
- 15 3. Rekombinant DNA, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder et HPV-DNA ifølge krav 1 eller et DNA-fragment ifølge krav 2.
4. Anvendelse af et DNA, et DNA-fragment eller et rekombinant DNA ifølge ethvert af kravene 1 til 3 som sonde til påvisning af HPV-DNA'er.
- 20 5. Middel der indeholder en blanding af HPV-DNA'er der kan anvendes til påvisning af et papillomavirus i et biologisk medium, som indeholder et sådant virus, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder et HPV-DNA i overensstemmelse med krav 1 knyttet til et eller flere adskilte HPV-DNA'er.
- 25 6. Middel ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en blanding af HPV-DNA'erne 33 (IP2), 39 (IP5), 42 (IP6), 6, 11, 16, 18, 32 (31), 35.
- 30 7. Middel ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder HPV-DNA42 (IP6) i blanding med HPV-DNA6 eller med HPV-DNA11 eller begge sammen.

8. Fremgangsmåde til fremstilling af en sonde til påvisning af et HPV-DNA, k e n d e t e g n e t ved, at man kloner en på forhånd modificeret vektor ind i en værtsorganisme, såsom en prokaryot mikroorganisme, ved rekombination in vitro med HPV-DNA ifølge krav 1 eller et DNA-fragment ifølge krav 2 og en passende vektor til opnåelse af en rekombinant-vektor, som indeholder det virus-afledte DNA eller DNA-fragment på et sted, der muliggør en senere kloning af vektoren i værtsorganismen, og at man udvinder og renser det opnåede klonede rekombinant-DNA, hvorefter man om ønsket mærker det opnåede klonede DNA.

9. Udstyr eller sæt omfattende ni grupper af sonder eller blandinger af forskellige sonder, og disse grupper (1-9) består henholdsvis af:

15

- 1) mindst et HPV-DNA2d
- 2) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 20b, 28 og 29
- 3) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 17 og 24
- 4) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23 og 36 (IP4)

20

- 5) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 15 og 17
- 6) DNA af HPV24
- 7) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 14, 34 (32) og 36(IP4)
- 8) HPV-DNA 32 (31)

25

- 9) HPV-DNA 34 (32)
- k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere indeholder to andre grupper (10 og 11) bestående af

10) DNA af HPV39 (IP5) alene eller i blanding med mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 16, 18, og 33 (IP2)

30

11) DNA af HPV42 (IP6) alene eller i blanding med mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 6 og 11,

idet DNA'erne i de 11 grupper vælges på en sådan måde, at de under alle omstændigheder er indbyrdes forskellige i det omfang, hvor

hver af de 11 grupper reduceres til et enkelt af de DNA'er, der indgår i gruppen.

10. Udstyr eller sæt til differentieret diagnosticering in vitro  
 5 imellem forskellige typer af vorter og hyperplasier, der svarer til variable prognoser, og som strækker sig fra godartede tilfælde til former, som vil kunne degenerere til intraepitheliale neoplasier og cancer i hud og slimhinder, hvorhos det omfatter ni grupper af rekombinante sonder, der indeholder indførte DNA-fragmenter  
 10 af papillomavirus, hvilke grupper (1-9) er fremstillet fra henholdsvis:

- 1) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 1, 2d og 4
- 2) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 3, 10a, 10b, 28 og 29
- 15 3) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 5, 17a og 24
- 4) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 5, 8, 12, 14a, 14b, 19, 20, 21, 22, 23 og 36 (IP4)
- 5) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 9, 15, 17a og 17b
- 6) HPV-DNA 24
- 20 7) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 5, 8, 14b, 34 (32) og 36 (IP4)
- 8) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 13 og 32 (31)
- 9) mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 34 (32) og 36 (IP4),  
 k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere indeholder to andre grupper (10 og 11) fremstillet ud fra
- 25 10) DNA af HPV 39 (IP5) alene eller i blanding med mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 16, 18, og 33 (IP2)
- 11) DNA af HPV42 (IP6) alene eller i blanding med mindst et DNA valgt blandt HPV-DNA'er 6 og 11

30

idet DNA'erne fra de 11 grupper er udvalgt således, at de under alle omstændigheder er forskellige fra hinanden, selv om hver af de 11 grupper blev reduceret til kun ét af DNA'erne af hvilke den består, og at disse sonder gennem de krydsninger, som disse blandinger vil kunne indgå med et DNA-præparat hidrørende fra patienten-

35

ten, gør det muligt at påvise eksistensen eller den mulige opståen af en af de følgende sygdomme:

- 5 1) hud- og slimhindevorter (især almindelige vorter og fodvorter). Differentiel diagnosticering af epidermo-dysplasia verruciformis.
- 2) Plane eller intermediære hud- eller slimhindevorter. Intraepithelial neoplasia og hudcancer. Differentiel diagnosticering af epidermo-dysplasia verruciformis.
- 10 3) Epidermo-dysplasia verruciformis. Intraepithelial neoplasia og hudcancer.
- 4) Epidermo-dysplasia verruciformis.
- 5) Epidermo-dysplasia verruciformis.
- 6) Epidermo-dysplasia verruciformis.
- 15 7) Hudcancer hidrørende fra epidermo-dysplasia verruciformis. Intraepithelial neoplasia og hudcancer.
- 8) Epithelial hyperplasia (fokal oral). Differential diagnosticering af intraepithelial oral neoplasia.
- 9) Intraepithelial neoplasia og hudcancer.
- 20 10) Genital neoplasia og livmoderhalscancer.
- 11) Condylomer og papillomer.

11. Fremgangsmåde til påvisning og identifikation af papillomavirus i en biologisk prøve der indbefatter, at man gennemfører hybridiseringsforsøg med et HPV-DNA, et DNA-fragment eller et rekombinant-DNA ifølge krav 3 eller med et middel ifølge ethvert af kravene 5-7, og påvisning af de HPV-DNA'er, som er udvundet fra de nævnte biologiske prøver, der giver anledning til hybridisering.

30 12. Fremgangsmåde ifølge krav 11 anvendt til in vitro påvisning af risici for livmoderhalscancer, kendt eget ved, at det anvendte HPV-DNA, DNA-fragment eller rekombinant-DNA er afledt af HPV39 (IP5).

13. Fremgangsmåde ifølge krav 11 anvendt til in vitro påvisning af risici for genitale cancere, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et middel ifølge krav 6.
- 5 14. Fremgangsmåde ifølge krav 11 anvendt til in vitro påvisning af godartede papillomavirusinfektioner, k e n d e t e g n e t ved, at det anvendte HPV-DNA, DNA-fragment eller rekombinant-DNA er afledt af HPV42 (IP6).
- 10 15. Fremgangsmåde ifølge krav 11 anvendt til in vitro påvisning af godartede papillomavirusinfektioner, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et middel ifølge krav 7.

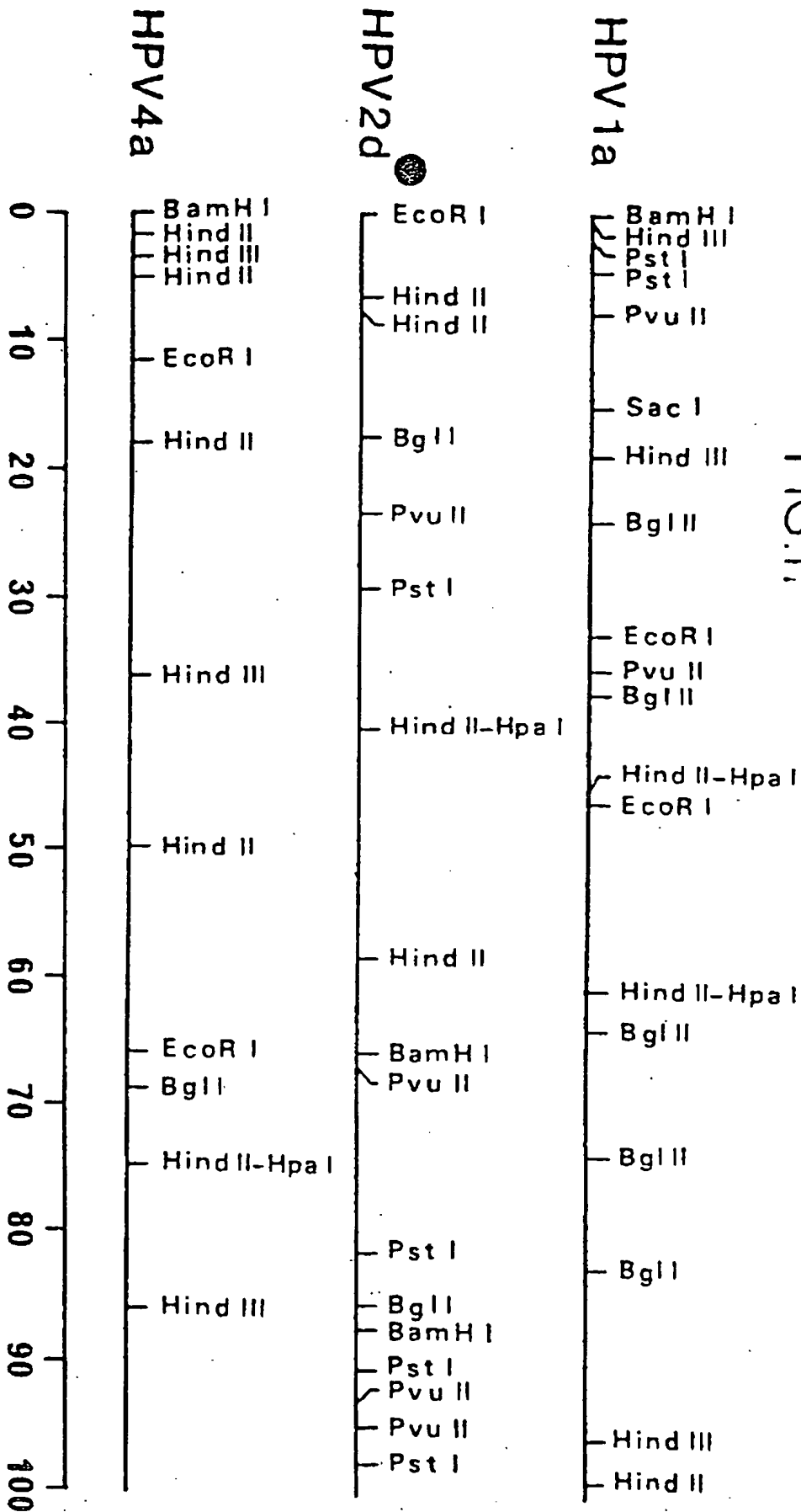


FIG.1.

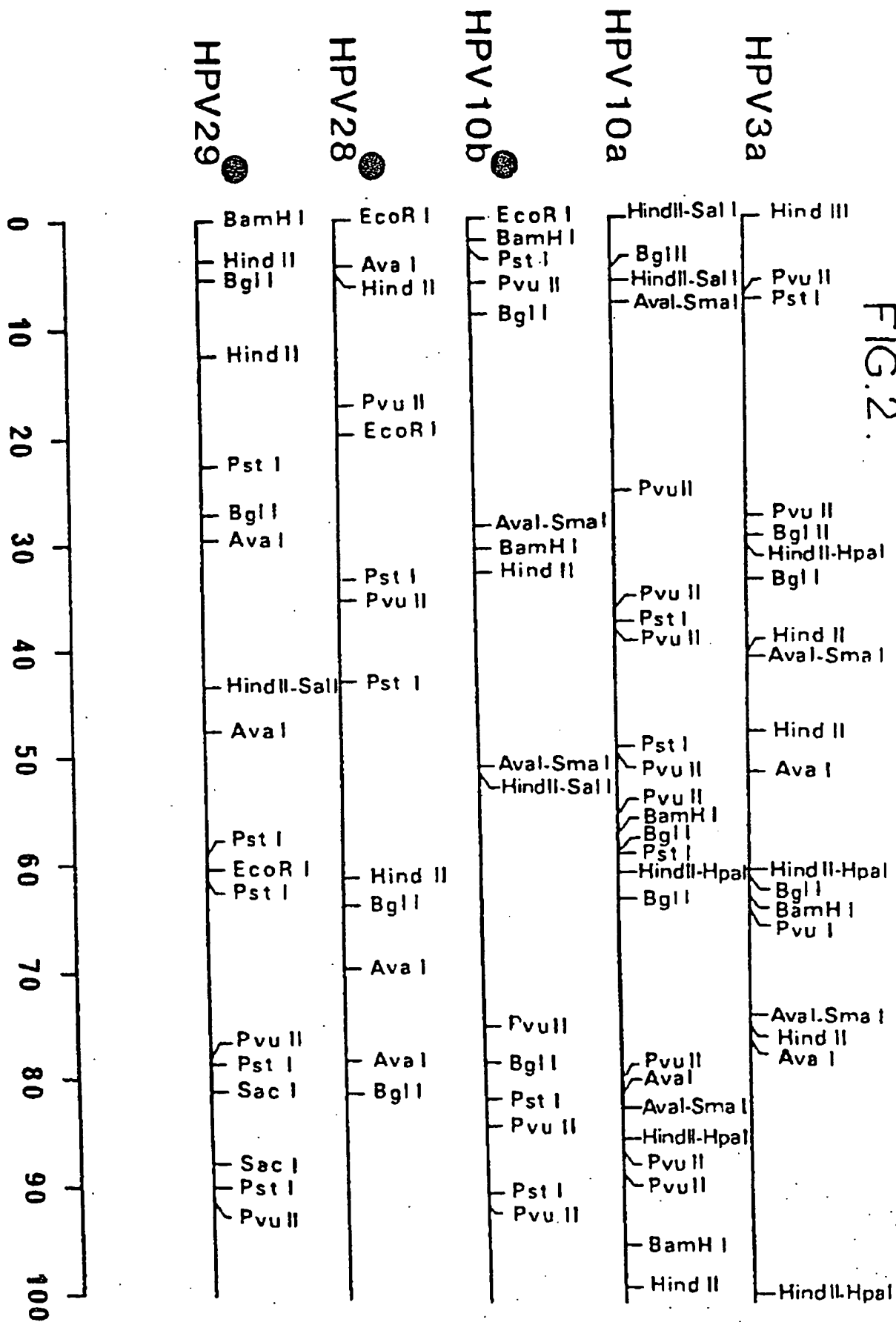


FIG.2.

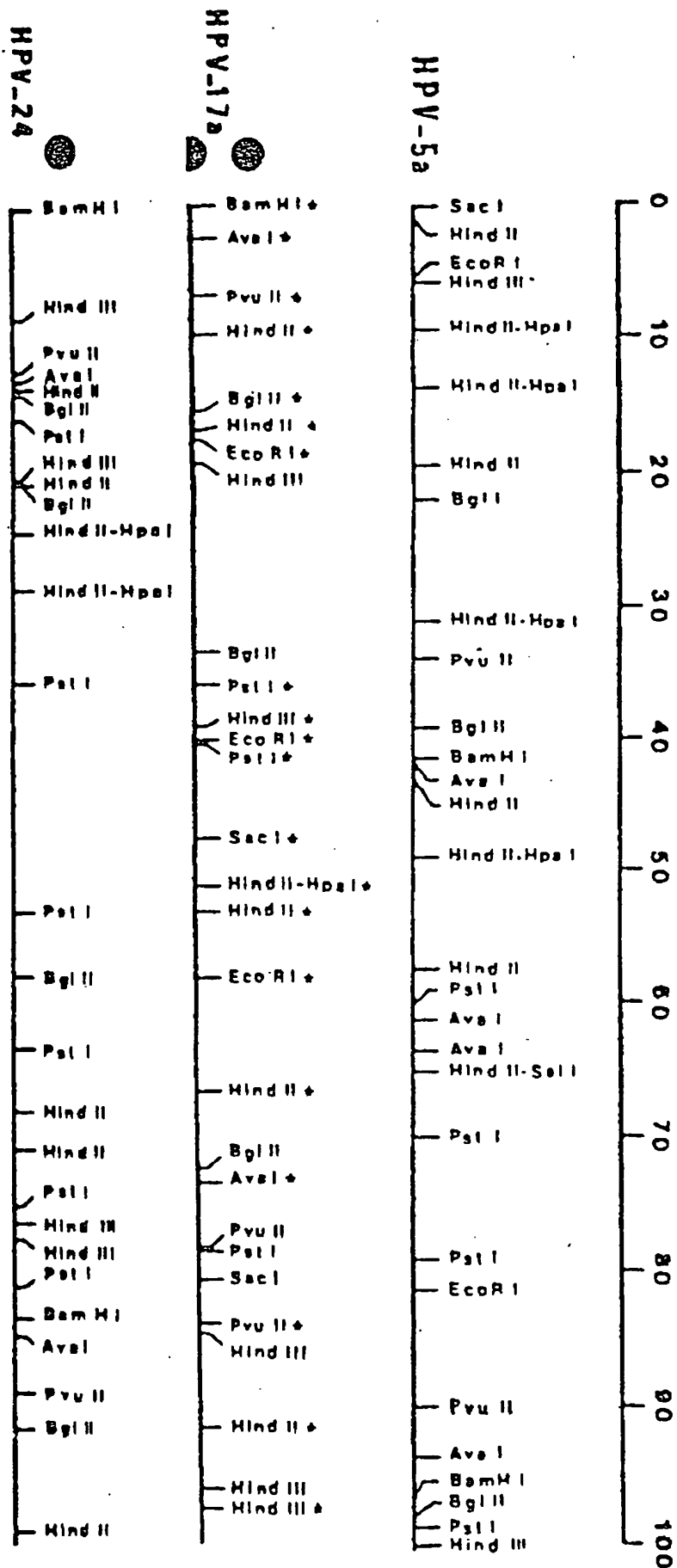


FIG. 3.

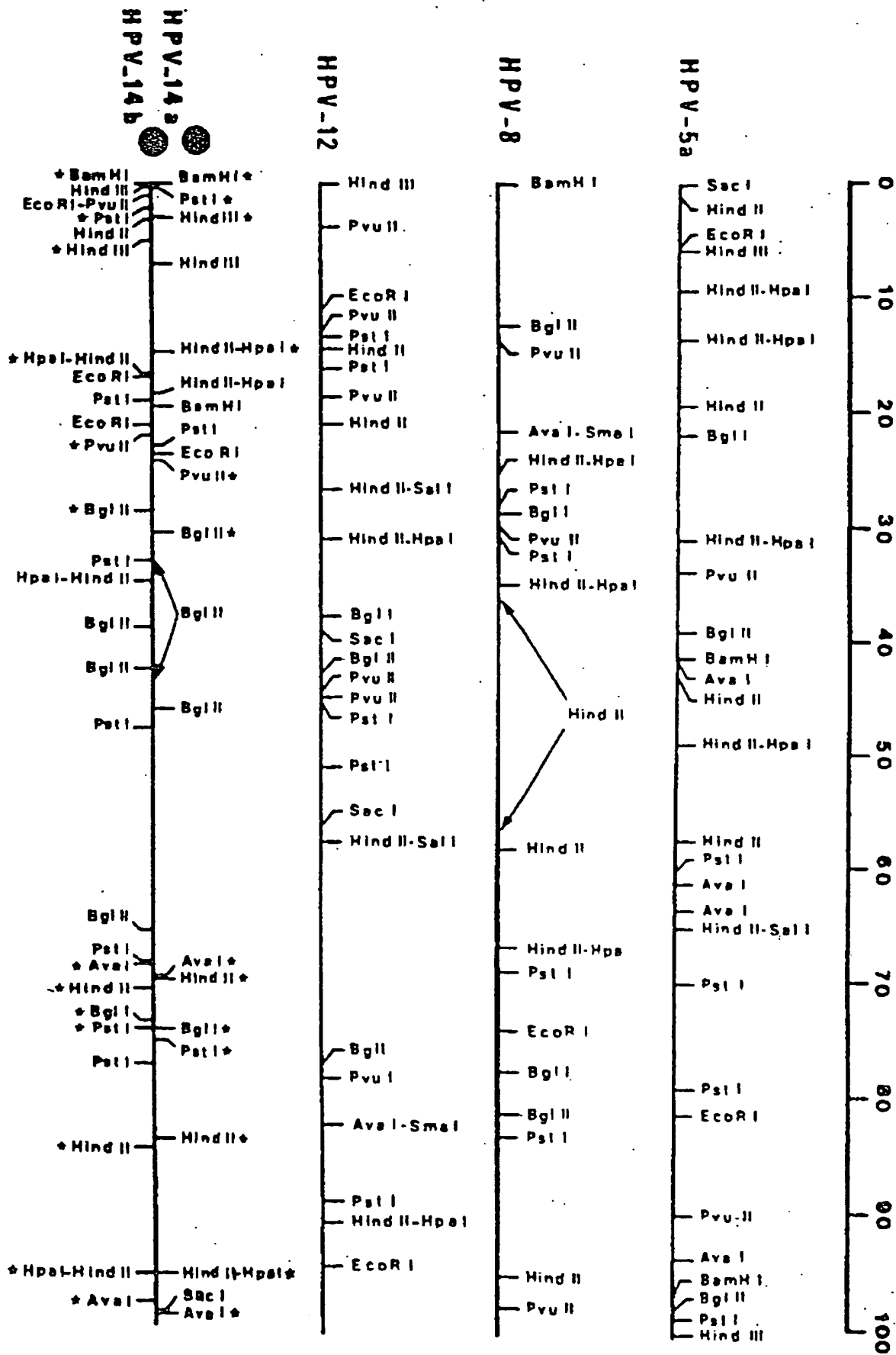


FIG. 4a.

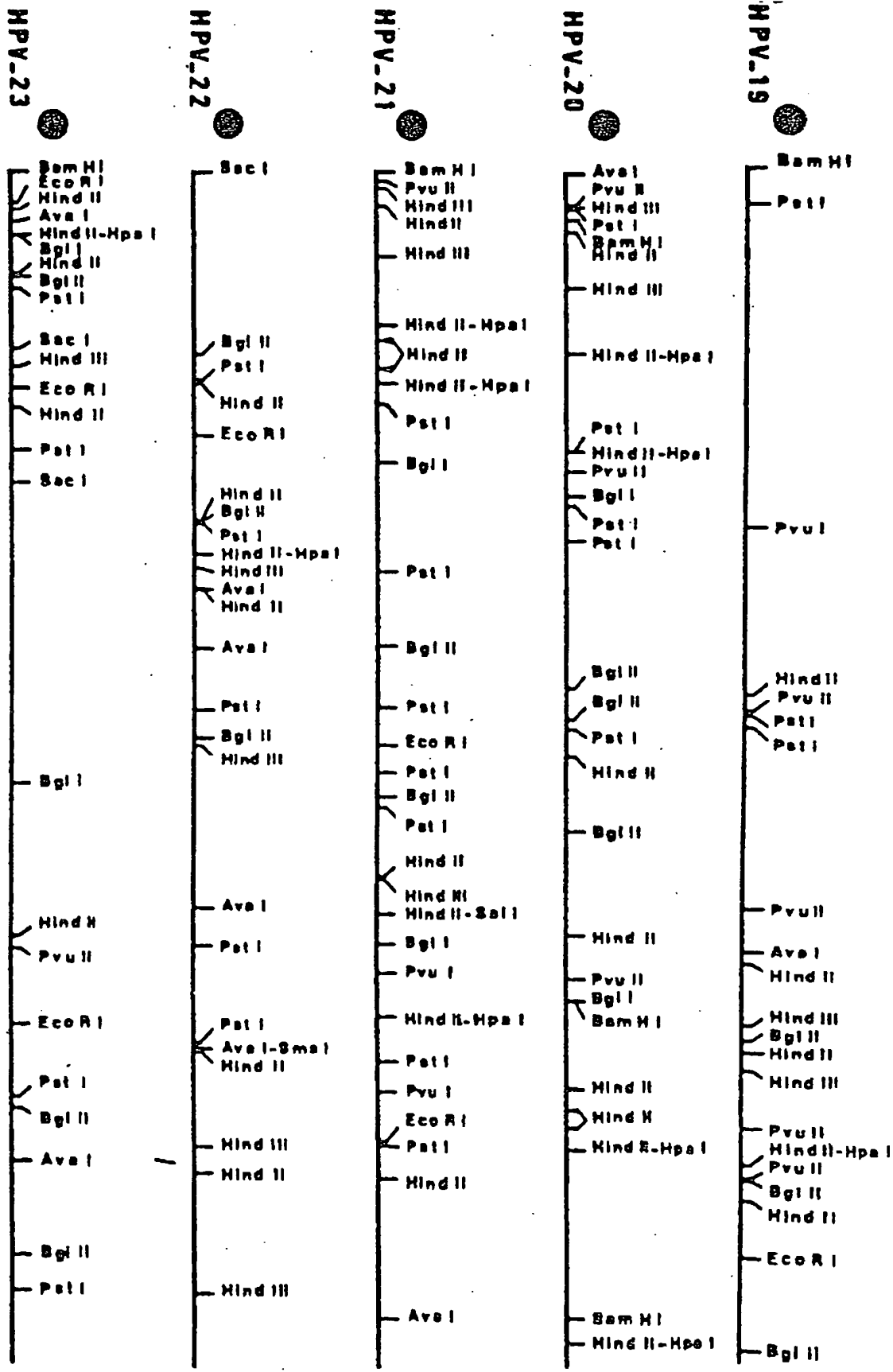


FIG. 4b



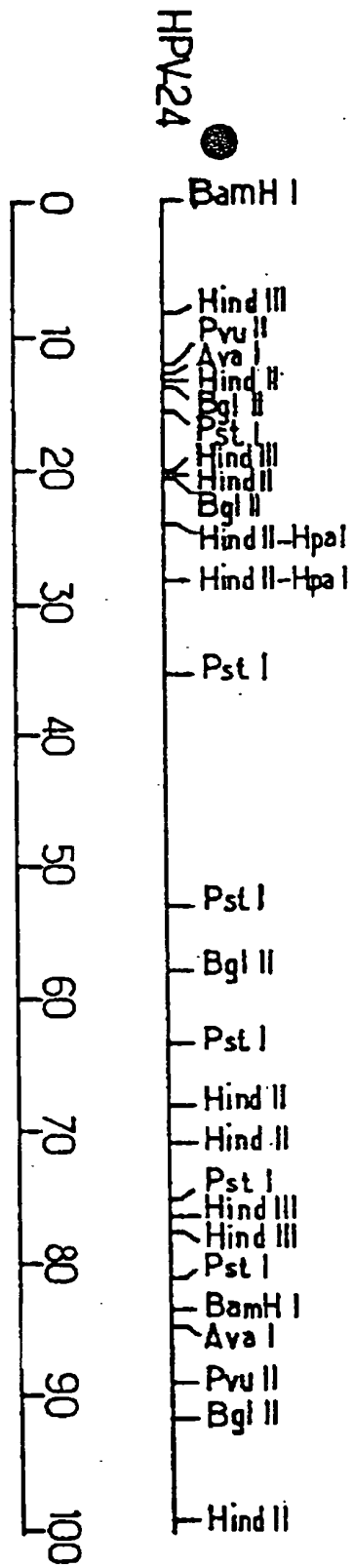


FIG. 6.



FIG. 9

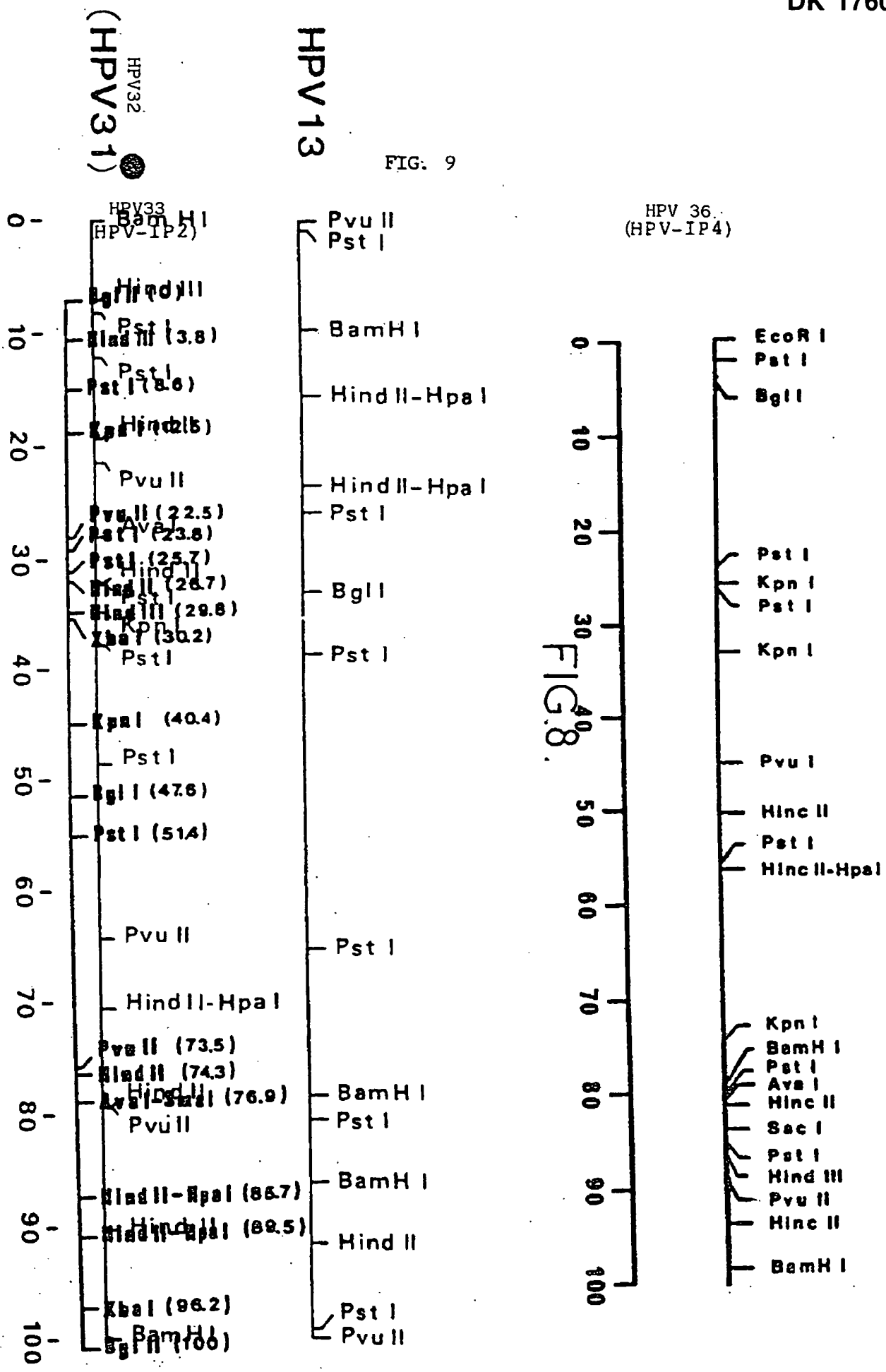
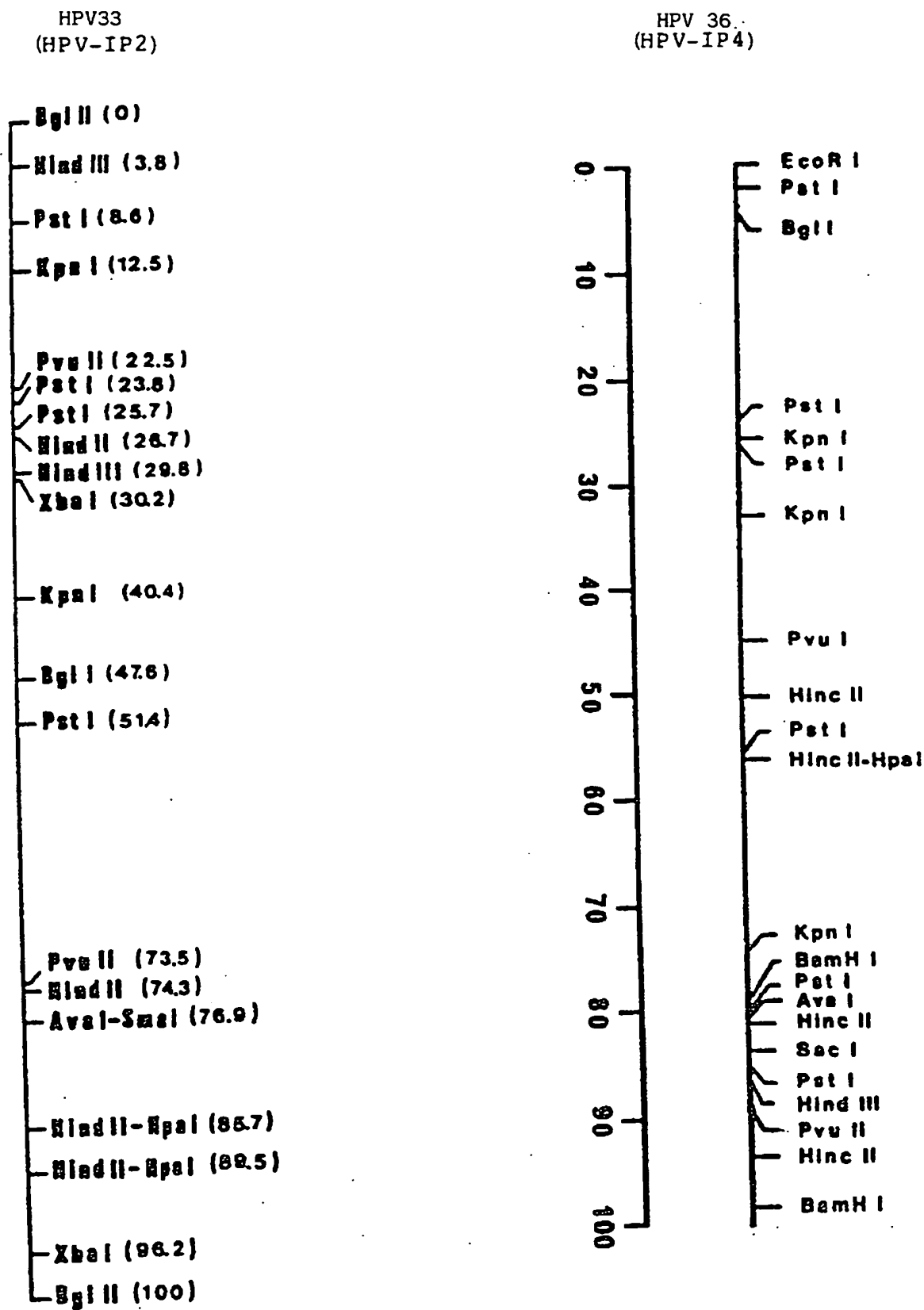


FIG. 8

FIG. 9



HPV39  
(IP5)

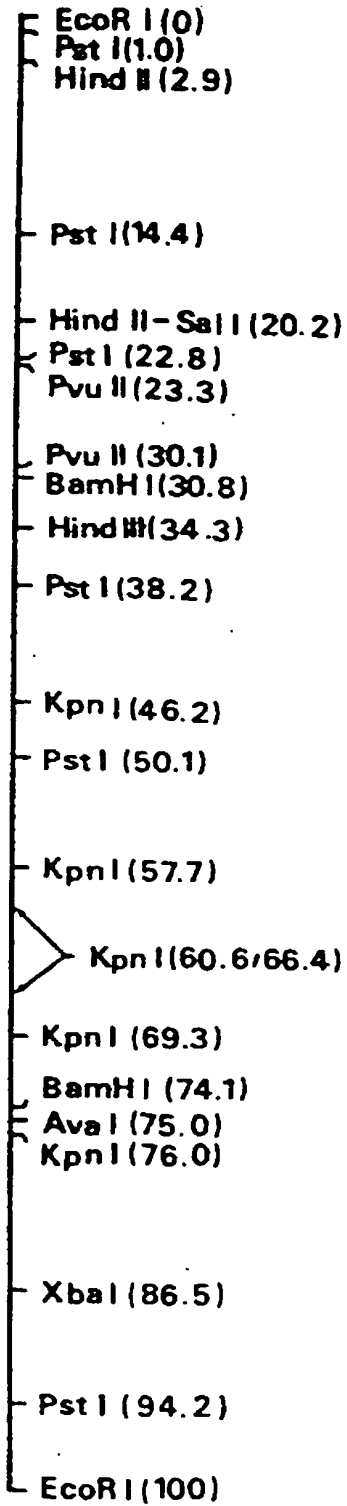


FIG. 10

HPV42<sup>PVS</sup>  
(IP6)

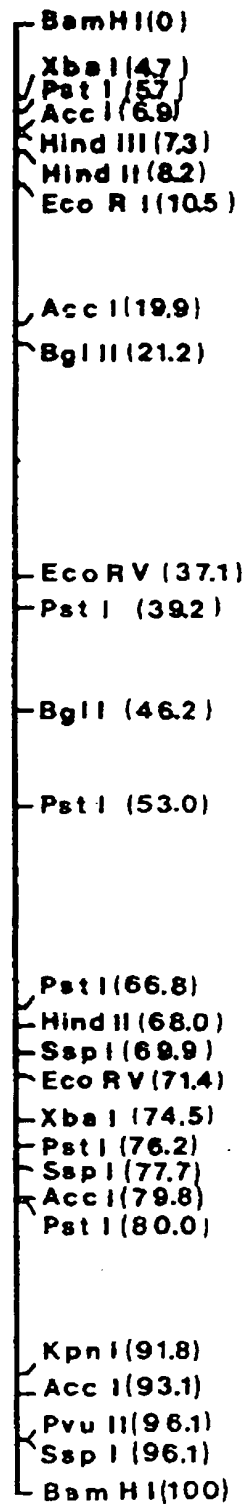


FIG. 11