



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104519909 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201380036458. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 05. 09

A61K 39/295(2006. 01)

(30) 优先权数据

486/CHE/2012 2012. 05. 09 IN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IN2013/000306 2013. 05. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/168182 EN 2013. 11. 14

(71) 申请人 巴拉特生物技术国际有限公司

地址 印度海得拉巴

(72) 发明人 克里希纳·默斯·艾拉

坎达斯瓦弥·苏玛斯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

权利要求书1页 说明书12页

序列表17页 附图2页

(54) 发明名称

疫苗组合物

(57) 摘要

适于向人类施用的包含以下抗原中的至少两种或更多种的疫苗组合物:DTap-HEV-HepB-HPV。公开了适于相伴施用的这些抗原的組合的若干变化。公开了制备疫苗组合物的方法。提供了编码抗原的核酸,及其制备方法和用途。

1. 用于对人类施用的疫苗组合物,所述疫苗组合物包含:
 - (i) 白喉类毒素, ' D' ;
 - (ii) 破伤风类毒素, ' T' ;
 - (iii) 百日咳抗原;
 - (iv) 重组乙型肝炎病毒表面抗原, HBsAg ;
 - (v) 重组人乳头瘤病毒 HPV16 和 HPV18 的 L1 抗原;
 - (vi) 重组戊型肝炎 (HEV) ORF2 抗原;
 - (vii) 与 HBsAg 或戊型肝炎 (HEV) 蛋白嵌合融合的重组 HPV L2 表位。
2. 根据权利要求 1 所述的疫苗组合物,其中组分包括戊型肝炎 ORF2,所述戊型肝炎 ORF2 包含由基因 SEQ ID NO. 3 编码的蛋白 SEQ ID NO. 4 的 112-606 氨基酸。
3. 根据权利要求 1 所述的疫苗组合物,其中所述异源 HPV L2 表位被融合在沿所述 HEV ORF2 蛋白的任何位置,优选地在例如由 SEQ ID NO. 5 编码的 SEQ ID NO. 6 的 N 末端。
4. 根据权利要求 1 所述的疫苗组合物,其中所述异源 HPV L2 表位被融合在沿所述 HEV 蛋白的任何位置,优选地在例如由 SEQ ID NO. 7 编码的 SEQ ID NO. 8 的 C 末端。
5. 根据权利要求 1 所述的疫苗组合物,其中所述重组抗原 HEV 和嵌合 HEV-L2 抗原由核苷酸序列 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 9 和 SEQ ID NO. 11 编码,所述核苷酸序列 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 9 和 SEQ ID NO. 11 被密码子优化以增强在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的表达并分别编码蛋白 SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10 和 SEQ ID NO. 12。
6. 根据权利要求 5 所述的疫苗组合物,其中所述重组抗原在酵母细胞,优选毕赤酵母中克隆、表达和纯化。
7. 根据权利要求 1 所述的疫苗组合物,还包含佐剂。
8. 根据权利要求 7 所述的疫苗组合物,其中所述佐剂为选自氢氧化铝或磷酸铝的矾,以及 γ 菊粉和阿伽目林。
9. 一种用于对人类施用的疫苗组合物,所述疫苗组合物包含:
 - (a) 包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分 ;以及
 - (b) 包含 Tdap 的第二组分。
10. 一种组合如权利要求 9 中所述的疫苗抗原以用于相伴施用的方法,所述方法包含以下步骤:
 - (a) 提供包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分 ;
 - (b) 提供包含 Tdap 抗原的第二组分 ;和
 - (c) 混合所述第一组分和第二组分以提供所述疫苗。
11. 根据权利要求 9 所述的疫苗组合物,其中 Tdap 可被配制在氢氧化铝中并用作单组分疫苗。
12. 一种在酵母细胞中制备权利要求 5 和 6 的重组抗原的方法,其中编码所述重组蛋白的基因被克隆到酵母表达载体中并在酵母细胞中被表达为细胞内蛋白并被从中纯化。
13. 一种用于引发并测量针对一种或更多种权利要求 1 的抗原的免疫应答的方法,所述方法通过肠胃外施用疫苗剂量,并通过 ELISA 测量抗体效价进行。

疫苗组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及组合疫苗及其用途。

背景技术

[0002] 人乳头瘤病毒 (HPV) 感染的发病率在发展中国家是高的。根据 2010 年 6 月 WHO/ICO HPV 信息中心的报告,在印度,每年报告超过 134,000 个新增病例和接近 74,000 例由宫颈癌引起的死亡。

[0003] 在印度,在女性中的癌症病例中,特别是在 15-44 岁的年龄组中,宫颈癌和乳腺癌是最常见的。一般人群中约 7.9% 的女性患 HPV 感染,且浸润性宫颈癌的大部分发病率是由 HPV16 和 HPV18 引起的。与其他 HPV 基因型的混合感染是普遍的。针对多种基因型提供广谱保护效力的候选疫苗是有效的 HPV 疫苗接种的前行之路。使用 L1 衣壳蛋白的 HPV 疫苗对 HPV16、HPV18、HPV6 和 HPV11 是类型特异性的,而不能向由也与 HPV 感染向宫颈癌的演变相关的其他基因型,例如 HPV31、HPV35、HPV52、HPV58 等引起的感染提供完全的保护。至今还没有针对多种 HPV 基因型的感染提供交叉保护的市售可得的 HPV 疫苗。包括重组 HPV L1 病毒样颗粒 (VLP) 的两种预防性疫苗已被许可。它们仅针对约 15 种已知致癌 HPV 类型中的两种。接近 70% 的宫颈癌病例是由 HPV16 和 HPV18 引起的,并且存在对于针对其他密切相关的 HPV 基因型的一定程度的交叉保护的证据。开发广谱保护性 HPV 疫苗的其他途径包括使用至少九种 HPV 致癌病毒的 L1 衣壳蛋白的多价疫苗,该方法具有无附加成本的优势,且因此这些疫苗的成本会妨碍其持续的全球运送,特别是在 HPV 感染的发病率高的第三世界国家中。其他途径已使用与 HPV L2 衣壳蛋白组合的 HPV L1 抗原,这些抗原具有广谱中和表位 (broadly neutralizing epitope)。然而, L2 衣壳蛋白自身免疫性差,使将来源于 L2 蛋白的表位结合 HPV L1 衣壳蛋白,或结合其他具有装配成病毒样颗粒 (VLP) 的能力的病毒抗原的替代策略成为必需。该嵌合体的设计原理是用于增加 VLP 骨架上异源肽的表位密度,从而增加其免疫原性。PCT/IN2009/000333 已经描述了装配成病毒样颗粒 (VLP) 的 HPV16 L2 表位与 HbsAg (乙肝表面抗原) 的嵌合构建体。

[0004] 戊型肝炎病毒 (HEV) 是引起地方性肝炎以及分散性急性肝炎的肠道传播病毒。感染 HEV 的人表现出广泛的临床特征谱 (clinical spectrum),从无症状感染到爆发性肝炎变化。伴随黄疸、高烧、肝肿大和瘙痒戊型肝炎病毒的临床特征与其他嗜肝病毒引起的急性病毒性肝炎的临床特征相似。病毒感染通常通过实验室发现升高的血清胆红素、肝脏酶的增加和碱性磷酸酶活性的轻度增加来诊断。在发展中国家 HEV 的发病率是高的 (Emerson 和 Purcell, 2007 ;Chandra 等, 2008)。在发展中国家 HEV 是分散性爆发性肝衰竭 (FHF) 的重要发病原因 (Nanda 等, 1994)。HEV 感染占急性病毒性肝炎病例的大于 50%,在一般人群中具有 0.2% 至 4% 的致死率 (case fatality) 并且在孕妇中,尤其是在怀孕的晚期妊娠 (third trimester) 期间具有高达 20% 的致死率 (Guu 等, 2009)。爆发性肝衰竭之后的高死亡率是孕妇的 HEV 感染特有的,特别是在怀孕的晚期妊娠期间 (Khuroo 等, 1981),并且可能与怀孕时的激素变化有关 (Lindemann 等, 2010)。在涉及孕妇的研究中表明,HEV 占急性病毒

性肝炎感染的接近 37% 和爆发性肝炎病例的 81% (Beniwal 等, 2003)。产科并发症, 例如胎膜早破和胎儿宫内生长受限常见于怀孕中的 HEV 感染期间 (Kumar 等, 2004)。在怀孕的晚期妊娠期间的 HEV 感染中, 爆发性肝炎或产科并发症经常会引起死亡 (Tsega 等, 1993)。伴随婴儿发病率和死亡率的病毒的垂直传播也常见于晚期妊娠的戊型肝炎感染 (Khuroo 等, 1995)。孕妇中的高死亡率的原因未被清楚地理解。HEV 感染可能与先前患肝脏疾病的人的严重疾病相关 [Kumar Acharya 等, 2007]。虽然 HEV 慢性感染是罕见的, 但在感染 HIV 的人中更为常见 [Dalton 等, 2009]。发展中国家的肝炎爆发主要由 HEV 基因型 1 引起。墨西哥和西非的流行病爆发是由基因型 2 引起的。亚洲的分散性病例是由基因型 4 引起的。迄今为止仅基因型 1 和 2 发生于人类, 而基因型 3 和 4 则还未在动物中分离到。HEV 仅有一种血清型 (Mushahwar, 2008), 这意味着一种血清型的候选疫苗可以交叉保护由 HEV 的其他基因型引起的感染。戊型肝炎病毒抗原, 包括 ORF2 (全长蛋白或截短的蛋白) 的用途是现有技术中已知的 (Amini-Bavil-Olyaei 等, 2009)。已经公开了 HEV 病毒抗原作为用于预防 HEV 感染的疫苗的用途。还已发现在大肠杆菌 (*E. coli*) 中制备的 HEV ORF2 的重组疫苗对于向人类施用是安全的 (Zhu 等, 2010)。现有技术中未公开戊型肝炎和 HPV 疫苗的组合用于女性的综合医疗保健。因此, 需要通过实验证明开发组合疫苗的可行性, 其中肝炎病毒和 HPV 抗原作为临时混合的混合物或者作为嵌合抗原被相伴施用时没有抗原干扰, 所述嵌合抗原在表达为病毒样颗粒 (VLP) 的单个多肽上携带这两种疫苗表位。这些组合物的制备和用途在现有技术中是未知的。

[0005] 带有其他病毒抗原的嵌合疫苗的开发中遇到的常见问题是支架抗原 (scaffold antigen) 在不影响两种疫苗的免疫原性所必需的天然结构构象下容纳异源蛋白序列受到限制, 尤其是如果其待被组装成病毒样颗粒的话。除了支架抗原, 用于制备嵌合抗原的异源蛋白的序列和结构构象是重要的。还至关重要是异源序列待被添加到支架抗原上的位置。因此, 这些因素在制备和测试嵌合构建体之前不能被预先确定。简而言之, 一对抗原的工作原理与另一对抗原的不同, 且因此该信息不能从描述了嵌合抗原的类似设计的现有技术推测得到。戊型肝炎的全长 ORF2 蛋白由 660 个氨基酸组成。病毒的中和表位不主要存在于蛋白的 N 末端和 C 末端。位于 N-末端和 C-末端的大多数氨基酸缺失不减弱蛋白组装成 VLP 的能力。HPV-HEV 嵌合体的合理设计包括在 HEV ORF2 蛋白的任何的区域中插入异源 HPV L2 广谱中和表位, 所述插入不影响蛋白的天然结构, 并且不影响这两种病毒抗原的免疫原性。将具有期望序列的 HPV L2 表位插入 HEV ORF2 蛋白的任意区域中 (所述插入不减弱 HEV 抗原组装成 VLP 的能力, 并且同时将异源 HPV L2 表位展示在嵌合 VLP 的表面上), 对于抗 HPV 和 HEV 二者的疫苗将是理想的选择。作为这两种抗原的混合物的 HEV 抗原与 HEV-HPV L2 嵌合抗原和 / 或与 HPV 16 和 HPV18 L1 衣壳抗原的组合也是非常有效的疫苗组合。将 HbsAg 或嵌合 HbsAg-HPV L2 (PCT/IN2009/000333 中描述了其制备方法) 添加至 HEV 和 / 或 HEV-L2 抗原在现有技术中也是未知的。也是免疫原性结构蛋白的 HEV 的 ORF3 是良好的疫苗候选物, 其可作为抗原被包括在该疫苗组合中。将 Tdap 或 DTap (白喉类毒素、破伤风类毒素和无细胞百日咳抗原) 或 DTwP (其中无细胞百日咳抗原被全细胞百日咳抗原替代) 添加到前述疫苗抗原中也是新的且未被现有技术描述。由于以下提及的原因, 该疫苗组合的发现和开发也是非常重要的。

[0006] 在全球, 初生儿破伤风引起的死亡率是高的并且在发展中国家尤其是这样。其可

容易地预防,因为针对破伤风毒素的抗体通过胎盘从被免疫的母亲被主动运输至其胎儿。这在初生阶段以及对于出生后的几个月提供了针对破伤风的被动保护。通过对孕妇或生育年龄的女性免疫可降低初生儿破伤风引起的死亡率。已证明在怀孕期间使用两个或更多个剂量的破伤风类毒素可预防初生儿破伤风 (Schofield 等,1961)。孕妇的破伤风类毒素接种已经被纳入 WHO 的免疫扩展项目。类似地,还向孕妇推荐了接种 Tdap (破伤风类毒素,减少的白喉类毒素 (reduced diphtheria toxoid) 和无细胞百日咳) 疫苗。推荐在晚期妊娠期间或在中期妊娠 (second trimester) 晚期 (妊娠 20 周后) 施用一个剂量的 Tdap。如果不在怀孕期间施用,Tdap 应在产后立即施用。当在怀孕期间施用 Tdap 时,在分娩时母亲将被保护,使得她不太可能将百日咳传给其婴儿,并且跨胎盘的母体抗体可能会在生命早期防止婴儿免受百日咳感染。在孕妇中,优选的日程安排是间隔 4 周两个剂量的 Td,和在第二个剂量六个月后 (产后) 一个剂量 Tdap。推荐青少年和 / 或正值育龄的女性应优选在怀孕前给予一个剂量的 Tdap。全细胞百日咳疫苗还可替代无细胞百日咳疫苗施用。因此,Tdap 和 / 或破伤风类毒素疫苗是与 HPV 和 HEV 抗原一起被包括在针对女性的组合疫苗中的良好选择。

[0007] 含或不含 HPV 抗原的针对戊型肝炎与破伤风类毒素的组合疫苗是新的,且不是市售可得的,或者其未在任何现有技术中被公开。在本发明中,公开了关于开发 HEV 和 HPV 组合疫苗的方法。将前述抗原组合在作为混合物的单一制剂,或将其相伴施用的原理是为了提高女性的整体健康状况,因为宫颈癌作为印度女性中癌症的最常见原因排名前列,而且还由于该事实:戊型肝炎感染在孕妇中,特别是在怀孕的晚期妊娠中导致高死亡率。HPV-HEV 疫苗组合被预期为降低 HPV 和 HEV 感染引起的死亡率和发病率,并提高这部分人口的整体健康,而且如所推荐的,对孕妇接种 Tdap 降低了由破伤风和百日咳引起的婴儿死亡率。这些组合疫苗不仅对提供针对多种疾病的保护有用,而且是非常期望的,因为其减少所需要的免疫次数。组合疫苗还帮助降低制造和分销成本,使得疫苗具有成本效益并且可负担得起。疫苗的可负担性提高了接受度和覆盖率。在疫苗制剂中使用合适的佐剂也减少了所需抗原的量,并有助于低成本疫苗的制备,因此提供了独特的经济上的优势。对于所有前述抗原的共同施用没有观察到抗原干扰,且因此可制备不同抗原的组合物。对于重组抗原的制备,毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为重组表达宿主在工业化规模中是有优势的,因为对于大规模制造,其与其他真核表达系统相比具有成本效益。来源于毕赤酵母的重组蛋白已被成功商业化并被发现对于人类使用是安全的。因此,对于针对 HPV 和 HEV 的疫苗的生产,使用该表达系统制造 HPV 和 HEV 两个抗原是安全的和极具成本效益的。

[0008] 发明目的

[0009] 本发明的首要目的是提供用于预防和治疗病毒和细菌感染的疫苗组合物。

[0010] 本发明的另一目的是提供针对 HPV、HEV 和乙型肝炎感染的组合疫苗。

[0011] 本发明的另一目的是提供另外包含破伤风类毒素和 / 或三价破伤风类毒素和 / 或减少的白喉类毒素和 / 或百日咳疫苗的 HPV-HEV- 乙型肝炎抗原的组合疫苗。

[0012] 本发明的另一目的是提供 HPV 和 HEV 的重组抗原和嵌合 HPV-HEV 抗原的序列。

[0013] 本发明的另一目的是提供开发这些组合疫苗的方法。

[0014] 本发明另外的目的是提供在哺乳动物中测试这些组合疫苗的方法。

[0015] 本发明的另一个目的是提供前述抗原的有佐剂的疫苗组合物。

[0016] 本发明另外的目的是提供用于诊断 HPV 和 HEV 病毒感染的 HPV 和 HEV 抗体。

[0017] 发明概述

[0018] 相应地,提供了若干种变化的 DTap-HEV-HepB-HPV 抗原的疫苗组合物,所述若干种变化在这些抗原与破伤风类毒素和 / 或三价破伤风类毒素和 / 或减少的白喉类毒素和 / 或百日咳抗原的组合方面。

[0019] 本发明提供了人类乳头瘤病毒 (HPV) 和戊型肝炎 (HEV) 的抗原的组合物,用于预防、治疗和诊断哺乳动物,特别是人类的 HPV 和戊型肝炎病毒感染。另外,将乙型肝炎抗原、破伤风类毒素和 / 或 Tdap (破伤风类毒素,减少的白喉类毒素和无细胞百日咳) 疫苗组合至前述疫苗组合物也在本发明的范围内。

[0020] 前述病毒抗原的有佐剂的疫苗组合物提供了高的保护效力。该疫苗组合物可以以适合注射的单一组合制剂被提供在一个容器中或不同的这类容器中 (小瓶)。这些疫苗组合物在作为注射液施用至宿主之前,通过在单独的容器中临时混合所需量的抗原施用。前述疫苗与其他病毒和细菌抗原的组合也在本发明的范围内。

[0021] 在一个实施方案中,本发明提供了纯化的 HPV16 和 HPV18 L1 抗原与纯化的 HEV ORF2 抗原的组合疫苗。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明提供了 HPV16、HPV18 L1 蛋白和 HPV16L2-HBsAg 嵌合抗原与 HEV 抗原组合的组合物。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明提供了对预防 HEV 和 HPV 两种病毒感染有用的嵌合 HEV-HPV L2 抗原、以及 HPV16 抗原和 HPV18 L1 抗原。

[0024] 在一个示例性的实施方案中,本发明的疫苗组合物包括:白喉类毒素,'D';破伤风类毒素,'T';百日咳抗原;重组乙型肝炎病毒表面抗原,HBsAg;HPV16 和 HPV18 的重组人乳头瘤病毒 L1 抗原;重组戊型肝炎 (HEV) ORF2 抗原;与 HBsAg 或戊型肝炎 (HEV) 蛋白嵌合融合的重组 HPV L2 表位。对于前述抗原的组合没有观察到抗原干扰。

[0025] 本发明的疫苗可通过在使用时将两种组分:(a) 包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分;和 (b) 包含 Tdap 的第二组分混合在一起临时制备。

[0026] 这两种组分被分开装填,且因此通常,本发明提供了包含 (a) 包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分;和 (b) 包含 Tdap 的第二组分的试剂盒。

[0027] 可选择地,Tdap 可被配制在氢氧化铝中并用作单组分疫苗。

[0028] 如果分开包装的话,混合步骤将一般发生在使用时。因此,本发明提供了用于制备本发明疫苗组合物的方法,包括以下步骤:(a) 提供包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分;和 (b) 提供包含 Tdap 抗原的第二组分;(c) 混合第一组分和第二组分以提供疫苗。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1:通过使用实施例 1 中描述的基因特异性引物的 PCR,PCR 扩增 (1A) 约 1.494 Kb 的 HEV ORF2 基因;(1B) 约 110 bp (其包括基因序列、限制性内切酶序列和 5' 突出末端) 的对应于 HPV16 L2 的氨基酸 SATQLYKTCQAGTCPPDIIPKVEG,和约 60 bp (其包括基因序列,限制性序列和 5' 突出末端) 的对应于 HPV L2 表位的氨基酸序列 LVEETSFIDAGAP。所扩增的基因片段的大小,对于 HEV ORF2 相对于 1Kb 阶梯 (ladder) 展示,而对于 HPV L2 片段相对于 100 bp 阶梯展示。

[0031] 图 2:2A 呈现了在用甲醇诱导 (I) 后 24 小时和 120 小时 SEQ ID NO. 4 的 HEV ORF2 在毕赤酵母中的表达, 示出了 54kDa 蛋白的表达; UI- 未诱导的细胞; 2B 呈现了在用甲醇诱导 (I) 后 48 小时和 120 小时 SEQ ID NO. 6 的 HEV-HPV L2 在毕赤酵母中的表达 (I), 示出了 56kD 蛋白的表达; UI- 未诱导的细胞; M- 为中等范围的分子大小标志物 (Genei, Bangalore)。

[0032] 图 3:3A 呈现了通过粗箭头指示的纯化的 SEQ ID NO. 4 的重组 54kD HEV ORF2 蛋白; 且 3B 呈现了通过粗箭头指示的纯化的重组嵌合 56kD HEV-HPV16 L2 蛋白。显示了分子大小标志物的大小。

[0033] 图 4: 呈现了使用醋酸铀染色的嵌合 HEV-HPV16 L2 蛋白的透射电子显微术 (TEM), 展示了蛋白自发地组装成病毒样颗粒。如该图底部所示, 尺的大小是 200nm。

[0034] 发明详述

[0035] 本文以下公开了本发明的详细实施方案。但是, 应当理解所公开的实施方案仅例示了本发明, 本发明能够以多种方式呈现。本发明的范围不限于所公开的实施方案, 并且本文所用的术语和短语不意在是限制性的, 而是为了提供对本发明的可理解的描述。本发明由所附的权利要求书限定。

[0036] 本发明涉及疫苗组合物, 其包括人乳头状瘤病毒 (HPV) 和戊型肝炎病毒 (HEV) 的抗原的组合, 用于预防和诊断哺乳动物特别是人类的 HPV 和戊型肝炎感染。向上述组合加入乙型肝炎抗原在本发明的范围内。而且, 将破伤风类毒素和 / 或 Tdap (破伤风类毒素, 减少的白喉类毒素, 以及无细胞百日咳) 疫苗组合至前述疫苗组合物也在本发明的范围内。这些疫苗组合物在作为注射液施用至宿主之前, 通过在一个单独的容器中临时混合所述抗原施用, 或可以以两种或更多种单独的制剂相伴施用于人类, 所述制剂可以在不同部位肠胃外注射以引发免疫应答。前述抗原的组合疫苗被提供在单独的容器中, 例如疫苗小瓶, 或被提供在待用于注射的预填充的注射器中。前述疫苗与其他病毒和细菌抗原的组合也在本发明的范围内。

[0037] 本发明还提供了用于制备组合疫苗的方法, 所述组合疫苗包括: (i) 戊型肝炎 (HEV) 病毒样颗粒, (ii) 乙型肝炎病毒表面抗原 HbsAg 与 HPV L2 蛋白的嵌合蛋白 ('HbsAg-HPV L2'), 和 / 或嵌合的 HEV-HPV L2 嵌合蛋白, (iii) HPV16 L1 和 HPV18 L1 抗原, (iv) 破伤风类毒素 ('T'), (v) 无细胞百日咳抗原 ('aP'), (vi) 白喉类毒素 ('D') 并且所述方法包括以下步骤: (a) 将 HEV 组分与嵌合 HEV-HPV L2 组分组合以得到二价组分; (b) 将 HEV 抗原与嵌合 HbsAg-HPV L2 组合以得到二价组分; (a) 将 HEV 组分与 HPV16 L1 和 HPV18 L1 组分组合, 以得到三价的 HEV-HPV16L1-HPV18L1 组分; (a) 将三价的 HEV-HPV16L1-HPV18L1 组分与单价的嵌合 HEV-L2 组分组合以得到四价的 HEV-HPV16L1-HPV18L1-HEV-L2 组分; (b) 将三价的 HEV-HPV16L1-HPV18L1 组分与嵌合 HbsAg-HPV L2 组合以得到四价的 HEV-HPV16L1-HPV18L1-HbsAg-L2 组分; 和 (c) 将所述的 D-T-aP 组分与所述二价 / 三价 / 四价组分中的任意一种混合以得到组合疫苗 / 或将 D-T-aP 疫苗连同所述病毒疫苗一起肠胃外相伴施用至哺乳动物宿主。

[0038] 当组合疫苗的 HPV 衣壳抗原作为重组蛋白在真核表达系统中表达并从中纯化时, 其是极具免疫原性的。HPV 抗原是来源于被表达为病毒样颗粒 (VLP) 的主要衣壳蛋白 L1。HPV 抗原包括选自“致癌的” HPV 类型的列表的两种或更多种抗原, 所述列表包括 HPV16、

HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68 等且可包括来自上述 HPV 类型的任意一种的 HPV L2 衣壳蛋白。HPV L2 衣壳和 HbsAg 的嵌合蛋白是用于具有 HEV 和其他 HPV 抗原的组合疫苗的良好疫苗候选物。被融合至前述疫苗抗原的异源病毒和细菌表位的加入也增大了 HPV 疫苗的免疫原性。

[0039] 戊型肝炎疫苗抗原是包括蛋白的开放阅读框 2(ORF2) 的全长或截短序列的抗原, 所述 ORF2 是戊型肝炎病毒的结构蛋白。对 HEV 全长 ORF2 蛋白进行截短以产生伴随增加的稳定性的更好表达, 而并不损害装配至 VPL 中的候选抗原的免疫原性。HEV ORF2 的截短序列, 例如 112-608 氨基酸区域和可选地 368-606 氨基酸被这样设计来容纳异源病毒序列, 而不损害引发强烈的免疫应答所必需的结构符合性 (structural conformity)。来自例如 SEQ ID NO. 1 中的 HEV ORF2 蛋白的全长序列, 和例如 SEQ ID NO. 2 中的 HPV16 L2 的全长蛋白的不同的截短的基因片段通过 PCR 产生, 所述基因片段包括这两个抗原的主要中和表位, 并通过将这些片段连接在一起制备了数个嵌合构建体。HEV 基因序列可来源于任何 HEV 基因型, 例如基因型 1-4。嵌合抗原的不同序列在本发明的范围内。这些构建体编码具有不同分子大小的嵌合蛋白。对于前述抗原的组合未观察到抗原干扰。发现可通过在使用时临时将两种组分 (a) 包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分; 和 (b) 包含 Tdap 的第二组分混合在一起来制备本发明的疫苗。所述两种组分为分开加入的, 且因此通常, 本发明提供了包括: (a) 包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分; 和 (b) 包含 Tdap 的第二组分的试剂盒。可选择地, Tdap 可被配制在氢氧化铝中并用作单组分疫苗。如果分开包装的话, 混合步骤一般发生在使用时。因此, 本发明提供了用于制备本发明的疫苗组合物的方法, 包括以下步骤: (a) 提供包含 HEV、HPV 和嵌合 HEV 或 HBsAg 抗原的第一组分; 和 (b) 提供包含 Tdap 抗原的第二组分; (c) 混合第一和第二组分以提供疫苗。

[0040] 对于前述组合疫苗, 获得接近或等于或超过在将抗原单独施用至动物时获得的效价的 100% 的针对 HPV 和 HEV 病毒的抗体效价是可能的。所述组合疫苗针对 HPV 和 HEV 感染诱发稳固的抗体水平, 且未观察到抗原干扰。本发明描述的所有方法可适用于 HPV 和戊型肝炎病毒的任意基因型或基因变体 / 血清型 / 毒株。制备和使用具有有所限定的序列的 HPV 和 HEV 抗原的组合物和方法在本发明的范围内, 所述抗原在任意原核或真核表达系统中被表达为重组蛋白或重组病毒样颗粒。所述基因序列为天然的病毒序列或为了在宿主细胞中表达被密码子优化的合成基因。所选择的真核表达系统包括哺乳动物细胞; 昆虫细胞中杆状病毒介导的表达, 和任意种的酵母细胞, 最优选毕赤酵母或酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。发现毕赤酵母高水平表达前述抗原。用于真核表达的序列优化包括存在 Kozak 共有序列, 例如位于基因 5' 末端的 (gcc) gccRccATGG, 其中 ATG 为起始密码子, 或使用酵母共有序列 (5' -[A/T] TTTAT[A/G] TTT[A/T] -3')。为在毕赤酵母中表达, 合成基因序列被密码子优化以进一步提高表达水平。前述的蛋白可作为细胞内蛋白表达并被从中纯化。可选择地, 其可被表达为分泌性蛋白并被纯化。用于在酵母细胞中表达的任何合适的表达载体选自包括但不限于下列的列表: pPIC3. 5、pPIC3. 5K、pA018、pPIC9、pPIC9K、PHIL D2 等。使用了适合在酿酒酵母或其他酵母种中表达的质粒载体。酵母细胞包括但不限于下列: 毕赤酵母、酵母属 (*Saccharomyces* spp)、*Hansenula polymorpha*、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces* spp)、酵母菌 (*Kluyveromyces* spp)。毕赤酵母如 GS115、KM71 和蛋白酶缺陷株, 例如 SMD1168 或 SMD1163 被用于重组表达。前述基因被以单拷贝或以多于一

个拷贝克隆。使用针对 HPV 和 HEV 病毒抗原的抗体用于开发通过 ELISA 评估抗原含量的方法,并还在评估疫苗抗体效价时用作参考标准。还发现了它们在诊断方面的应用。

[0041] 通过物理或化学方法且优选地通过两者的组合实现病毒的纯化。物理方法利用病毒类颗粒的物理性质,例如密度、尺寸、质量、沉降系数等,且包括但不限于下列技术中的任何一种:超速离心、密度梯度离心、超滤等。通过化学方法的纯化是指采用例如通过化学或物理化学反应例如离子交换层析、亲和层析、疏水作用层析、凝胶过滤层析、羟基磷灰石基质、用无机盐(该无机盐的一个实例是硫酸铵)盐析和通过使用拥有专利权的 Himax 技术、有机盐、有机溶剂、磷酸铝、氢氧化铝和有机化合物,如聚乙二醇的吸附/解吸的方法。所述病毒的重组抗原的纯化通过一种或两种或更多种上述方法的组合实现。

[0042] 上述 HPV-HEV 疫苗以及 HPV-HEV 和破伤风类毒素和 Tdap 疫苗的抗原组合物被配制在适于对人类免疫的药理学上可接受的载体中。此外,对于有佐剂的疫苗制剂,合适的佐剂选自如下列表,所述列表包括但不限于:氢氧化铝、磷酸铝;磷酸钙;任何多晶型的菊粉,优选 γ 菊粉;包含菊粉与其他有机和无机化合物例如氢氧化铝、磷酸铝、磷酸硫酸铝(aluminum sulphate phosphate)和磷酸钙;脂质体、壳聚糖和复合碳水化合物例如葡聚糖、糊精、淀粉、甘露聚糖和葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖、 β -葡聚糖、肝素、纤维素、果胶和果胶酸盐(pectinate)、植物凝集素和合成的或来源于任意来源的任意其他碳水化合物,任意生物可降解的和生物相容性的聚合物,例如聚交酯和聚(丙交酯共乙交酯;PLG)或 PLGA;任意乳剂,包括但不限于水包油乳剂、其他基于鲨烯的佐剂、包含胆钙化醇的水包油乳剂、胆钙化醇本身作为佐剂、任意油包水乳剂;用胆钙化醇作为组分之一与其他脂溶性的组合物一同制备的脂质体;具有其他组成的脂质体;RIBI 佐剂系统,皂苷,包括但不限于 QS-21、QuilA、番茄苷、ISCOM、ISCOMATRIX 等,脂肽、糖肽、脂多糖、胞壁酰二肽和任意基于肽的佐剂,寡核苷酸、任意 TLR 配基作为佐剂、任意细胞因子、维生素和无毒性的细菌毒素等。除了上述以外,具有良好的免疫增强活性(immunopotentiating activity)的任何其他有机或无机物质可单独地或组合地用作佐剂以增强 HPV-HEV 组合疫苗的免疫原性。具有矾的疫苗组合物当在哺乳动物中肠胃外施用时引发强烈的免疫应答。包含疫苗佐剂的方法和疫苗组合物在本发明的范围内。

[0043] 对于疫苗的效力测试,在小鼠和豚鼠中测试疫苗制剂。通过经由 ELISA 评估抗体效价体外测定所得的血清。通过文献中充分描述的程序使用毒素中和测试评估破伤风类毒素和白喉类毒素的效力。在用本发明描述的疫苗制剂免疫的动物中观察到血清转化。没有观察到由于不同抗原组合或佐剂引起的抗原干扰。所述制剂中使用缓冲液是磷酸盐缓冲液、磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液,或可使用具有合适 pH 的任何其他药理学上可接受的缓冲液。2-苯氧基乙醇用作疫苗防腐剂;可使用硫柳汞或任何其他疫苗防腐剂。可选择地,疫苗组合物可被配制为不含任何疫苗防腐剂。疫苗任选地包含稳定剂等。赋形剂选自包括但不限于下列的列表:非还原糖、糖醇例如山梨糖醇及甘露糖醇,甘油、氨基酸、人血清白蛋白或从前述佐剂列表中选择佐剂。液体形式的稳定剂或冻干形式的稳定剂在重构于药理学上可接受的缓冲液或水中之后适合于对人类宿主肠胃外施用。更具体地,对于本发明的抗原,提供了对检测感染具有高的灵敏性和特异性的诊断测定。本发明范围内的方法可适用于 HPV 和戊型肝炎病毒的任何基因型/基因型变体/血清型/毒株。

实施例

[0044] 下面的实施例进一步描述了本发明。

[0045] 实施例-1:戊型肝炎病毒(HEV)抗原和嵌合 HEV-HPV L2 抗原的克隆和重组表达

[0046] 具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 1 的戊型肝炎 ORF2 基因的合成基因通过用分别含有 EcoRI 和 NotI 限制性位点的 5' 引物和 3' 引物 PCR 扩增以获得约 1494bp 的 PCR 片段 SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 3 编码 SEQ ID NO. 4 的蛋白(参见图 1)。用于 HEV 基因的 PCR 扩增的引物是 5'-CATTTGAATTCACCATGGCCGTTGCACCTGCTCATGATAC-3' 和 5'-TATCGCGGCCGCTCATTAAGCCAATGCAGAATGAGGAGC-3'。

[0047] 用于 PCR 扩增的条件为在 94℃ 下变性 45 秒,在 60℃ 下退火 40 秒和在 72℃ 下延伸 2.5 分钟,持续 30 个循环,随后在 72℃ 下最后延伸 10 分钟。所述反应混合物由 1×Taq DNA 聚合酶缓冲液、0.25mM dNTP、20 皮摩尔的各个引物和 1U 的 Taq DNA 聚合酶(Genei)以及 1U 的 Pfu DNA 聚合酶(New England Biolabs)组成。所述 PCR 片段用 EcoRI 和 NotI 消化、凝胶纯化并被用于连接到 EcoRI 和 NotI 消化的酵母载体 pPIC3.5K(Invitrogen, 卡尔斯巴德, 美国)。1494bp 的 PCR 片段被用于与针对 HPV16L2 表位的基因序列嵌合融合,所述表位由 SEQ ID NO. 2 的 HPV16 L2 蛋白的第 14-37 位氨基酸,序列为 SATQLYKTCKQAGTCCPDIIIPKVEG, 和/或其第 108-120 位氨基酸,序列为 LVEETSFIDAGAP 组成。针对 HPV16 L2 表位的第 14-37 位氨基酸的基因序列当被连接至 HEV 基因的 5' 末端时的嵌合融合产生编码 SEQ ID NO. 6 的 SEQ ID NO. 5,且当其被连接至 HEV ORF2 PCR 片段的 3' 末端时,产生编码 SEQ ID NO. 8 的 SEQ ID NO. 7。所述连接通过位于针对 HEV 或 HPV L2 序列的引物的任一末端的 BamHI 位点实现。使用了下面的引物扩增 HPV16 L2 序列的第 14-37 位氨基酸用于融合至 HEV ORF2 片段的 N 末端:5'-ATGTCGAATTCACCATGGCTGCAACTCAGTTGTATAAAAC-3' 和 5'-ATCGAGGATCCTTGAACCTTTGGGATAATGTC-3'。对于在 HEV ORF2 片段 C 末端的扩增和融合,下面的引物被用于上述区域的 HPV 16 L2 PCR:5'-ATGTCGGATCCTCTGCAACTCAGTTGTATAAAAC-3' 和 5'-ATCGAGCGGCCGCTCATTAACCTTCAACCTTTGGGATAATGTC-3'。被设计成扩增 HPV16 L2 基因的 5'TTGTTGAAGAAACCTCCTTTATTGACGCTGGTGCTCCA-3' 区域,其对应蛋白序列 LVEETSFIDAGAP,的 PCR 引物还包含用于连接两个基因片段的 BamHI 位点。编码 LVEETSFIDAGAP 的基因片段与 HEV ORF2 的 C 末端的嵌合融合产生编码 SEQ ID NO. 10 的 SEQ ID NO. 9。SEQ ID NO. 11 是在 N 末端带有 HPV L2 的第 14-37 位氨基酸区域并在 C 末端带有 HPV 16L2 的第 108-120 位氨基酸的 HEV ORF2 的核苷酸序列。对应的蛋白序列是 SEQ ID NO. 12。类似地,为了产生 HEV ORF2 与前述 HPV L2 序列的嵌合构建体,用于扩增 1494 bp 片段的 PCR 引物还包括位于所述基因片段的 5' 区域的末端或位于 3' 末端的 BamHI 位点,以方便连接到 HPV L2 表位。可选择地,戊型肝炎与 HPV L2 蛋白的嵌合构建体的构建,ORF2 的 714bp 片段(从 368-606 氨基酸)通过 PCR 进行了扩增,并在 HEV PCR 片段的 N 末端或 C 末端连接 HPV16 L2 表位(第 14-37 位氨基酸和/或第 108-120 位氨基酸的区域)。对于 N 末端处的连接,所述 HEV 片段用引物 5'-ACGTCGGATCCATCGCCCTTACATTGTTTAATTTG-3' 和 5'-TATCGCGGCCGCTCATTAAGCCAATGCAAGATGAGGAGC-3' 扩增,而对于在 HEV 片段 C 末端处的连接,HEV 基因使用 5'-AGCTCGAATTCACCATGGCCCTTACATTGTTTAATTTG-3' 和 5'-ACTCAGGATCCTTATCAAGCCAATGCAGAATGAGGAGC-3' 扩增。PCR 扩增的条件是在 94℃ 下变性 45 秒,对于不同的引物组合在 56℃ -62℃ 下退火 40 秒,和在 72℃ 下延伸 2 分钟持续 30 个循环,随后在 72℃ 下最终延伸 10 分钟,使用如上所述

的用于 1494 bp HEV ORF2 扩增的相同浓度的试剂。为了产生 HPV L2 和 HEV 的嵌合基因, 将 PCR 扩增的基因在 BamH1 消化后连接, 进一步用 EcoR1 和 Not1 消化, 并连接到 EcoR1 和 Not1 消化的 pPIC3.5K 酵母载体中并转化到大肠杆菌 DH5 α 中。从在 50 μ g/ml 氨苄青霉素上筛选的转化的大肠杆菌中分离重组质粒 DNA。包含 HEV-HPV L2 嵌合基因的重组质粒用 BglIII 线性化, 并按照标准的酵母转化操作说明 (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 美国) 转化到毕赤酵母 GS115 细胞中。

[0048] 实施例 -2 :HEV 和 HEV-HPV L2 嵌合蛋白的纯化 :

[0049] 使表达 HEV 和 HEV-HPV L2 嵌合蛋白的重组蛋白的毕赤酵母 GS115 克隆在 28 $^{\circ}$ C 生长 96 小时, 并每 24 小时用 1% 甲醇诱导, 并在 120 小时结束后收集 (图 2)。所述细胞用 50mM pH 8.0 的含 2mM EDTA、10mM NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤一次, 并在含 0.05% Triton X-100 的相同缓冲液中裂解。细胞裂解物在 4000rpm 下离心 20 分钟, 并在用相同的缓冲液平衡 Q- 琼脂糖柱上纯化包含所述蛋白的细胞上清液。用在相同的缓冲液中包含 50mM 至 750mM NaCl 的盐梯度洗脱所述蛋白, 并收集包含蛋白的级分, 并在 SDS-PAGE 凝胶上检验代表 HEV 蛋白的 54kDa 条带和代表嵌合 HEV-HPV L2 蛋白的 56kDa 条带的存在。使用 TFF 系统浓缩含 HEV 蛋白的级分, 并将浓缩物上样到 50mM pH 7.2 的含 154mM NaCl 的磷酸盐缓冲液平衡的 Captocore700 凝胶过滤柱中。在流出物 (flow through) 中收集病毒样颗粒。在 SDS-PAGE 凝胶上检验蛋白纯度并发现大于 95% 纯 (图 3)。所纯化的蛋白被进一步表征。

[0050] 实施例 -3 :透射电子显微术 :

[0051] 在用 2% 醋酸铀负染后, 通过透射电子显微术 (TEM) 可视化纯化的病毒样颗粒 (VLP), 并被描绘在图 4 中。

[0052] 实施例 -4 :用于效力测试的疫苗制剂 :

[0053] 对于效力测试, 制备了各自由下面提到的浓度的纯化的疫苗抗原和佐剂组成的疫苗组合物以对小鼠免疫 :1) 均吸附在 1.5mg 氢氧化铝上的 30 μ g HEV ORF254kDa 蛋白、40 μ g HPV16 L1 蛋白、20 μ g HPV18 L1 蛋白以及 30 μ g HbsAg-HPV L2/HEV-HPV L2 嵌合抗原和包含均被单独地吸附在氢氧化铝上的甲醛去毒的 2.5Lf 单位白喉毒素 (DT)、5Lf 单位破伤风类毒素 (TT) 和 8 μ g 去毒的百日咳毒素 (PT)、8 μ g 丝状血凝素 (FHA) 和 2.5 μ g 百日咳杆菌粘附素 (PRN) 的 Tdap (破伤风类毒素, 减少的白喉毒素和无细胞百日咳)。可选择地, 1.5mg 的磷酸铝可用于吸附除了破伤风类毒素以外的所有上述抗原, 破伤风类毒素被吸附在氢氧化铝中。破伤风类毒素 (TT) 和去毒的百日咳毒素 (PT) 是获自 Bharat Biotech 国际有限公司的生产设施的 GMP 产品。无细胞百日咳抗原是从百日咳博代氏杆菌 (*Bordetella pertussis*) 培养物的上清液中通过包括下列的步骤纯化的 :离心培养物上清液、盐分级分离、透析过滤、柱层析和将缓冲液交换成 pH 7.2 的 1X PBS。HPV16 和 HPV18 L1 抗原是从毕赤酵母细胞中表达和纯化的重组蛋白。制备重组 HPV 蛋白和 HbsAg-HPV16 L2 的方法之前被描述于 W02010/001409 中。其他佐剂的加入进一步增强了所述疫苗制品的效力。多晶型形式的菊粉, 特别是 γ 菊粉的加入增强了疫苗制品的效力。 γ 菊粉包含具有超过 8000 道尔顿的分子量的颗粒, 并且在 37 $^{\circ}$ C 几乎不溶于水。高分子量菊粉 **Orafti®HPX** 从比利时的 Beneo Orafti 获得。 γ 菊粉级分通过现有技术中概述的方法制备 (US 4,954,622 ; PCT/AU86/00311), 且阿伽目林 (algammulin) 的制备按照 Cooper 和 Steele, 1991 描述的方法进行。2mg/ml 浓度的 γ 菊粉和阿伽目林制品被用于疫苗制剂中。在环境温度下将疫

苗抗原与佐剂混合两小时并立即用于注射。类似的制剂还用对稳定性没有不利的影响的 pH 6.8 - 7.2 的磷酸盐 - 柠檬酸盐缓冲液测试。通过离心测试矾对疫苗抗原的吸附,并通过 SDS-PAGE 检验上清液中具有预期大小的针对不同抗原的蛋白条带。所有前述抗原被高效地吸附至矾。在小鼠中测试疫苗制剂的效力。

[0054] 实施例 -5 :疫苗制剂的效力测试 :

[0055] 使用每组六只 Balb/c 小鼠测试实施例 4 中描述的不同病毒抗原组合物。实施例 4 中描述了最高的疫苗抗原浓度。对 18-20g 体重的 6-8 周龄的小鼠肌肉内注射四种疫苗制剂的两倍稀释液。所述稀释液在 1X PBS(50mM pH 7.2 的包含 150mM NaCl 磷酸盐缓冲液)中制备,并且所述稀释液包含适量的佐剂以维持恒定的佐剂浓度。使用 2- 苯氧基乙醇作为疫苗防腐剂。对于对照动物,注射等体积的包含相同量的佐剂而不包含病毒抗原的缓冲液。在施用第一次疫苗剂量后的第 14 天给予加强注射。施用加强剂量 7 天后从后眼窝窦 (retro-orbital sinus) 收集血液,分离血清,在 56℃ 灭活 30 分钟,并在 -80℃ 下冷冻储藏直至被用于血清学测定。对于测试白喉毒素的效力,使用如以下实施例 6 中描述的豚鼠。

[0056] 实施例 -6 :通过 ELISA 和毒素中和测定确定抗体效价 :

[0057] 为了测定针对 HEV 和具有 HPV16 L2 的 HEV 嵌合抗原的抗体效价,通过间接 ELISA 评价 HEV 抗体。将溶于 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液的约 1 μ g 的 54kD 疫苗抗原包被到 96 孔平板上,并在 2-8℃ 下过夜孵育。类似地对于评价针对 HPV16 和 HPV18 L1 抗原以及 HPV16 L2 表位的抗体效价,将溶于 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液的 1 μ g 纯化的 HPV16 L1 和 HPV18 L1 以及 HPV16 L2 抗原分别包被在 96 孔平板上,2-8℃ 下过夜孵育。用于前述 HEV 和 HPV 抗原的其余程序与以下描述的相同。在丢弃平板内容物后,孔用 3% 溶于 pH 7.4 的磷酸缓冲盐水的脱脂奶粉封闭。在 37℃ 孵育平板一小时,并用包含 0.05% 溶于 PBS 的吐温 -20 (PBST) 的漂洗缓冲液洗涤五次。加入受试血清的两倍系列稀释液,在 37℃ 孵育平板一个半小时。用漂洗缓冲液洗涤平板 8 次。添加 1:2500 稀释的小鼠抗 IgG HRP0 偶联物,并在 37℃ 孵育 1 小时。用漂洗缓冲液洗涤孔五次并用 PBS 洗涤三次,并通过加入 OPD (邻苯二胺, Sigma Aldrich, USA) 和 H₂O₂ 显色。在加入 1N 硫酸后 10 分钟读取读数。作为对动物的血清转化的量度的抗体效价被评价为高出对照动物的血清稀释度的血清稀释度 +3 $\times$ 对照值的标准差的倒数 (the reciprocal of the serum dilution that is above that of control animal+3 x standard deviation of the control value)。使用 AxSYM Ausab 试剂盒 (Abbot Laboratories) 按照制造商提供的试剂盒操作说明评价针对 HbsAg 的抗体效价。10mIU/mL 的效价被认为是血清转化的截断值 (cut-off)。抗体浓度以 mIU/mL 表示。在豚鼠中通过毒素中和实验 (TNT) 测试白喉抗毒素。每个测试组、对照组和标准参考组中使用 6 只动物。参考标准获自 NIBSC。将病毒稀释液和参考标准皮下注射豚鼠,而对照组接受等体积的包含氢氧化铝的介质。四周后,用 100LD50 的白喉毒素攻击疫苗接种的动物。对照组用 1LD50 的毒素攻击。观察不同稀释组中动物的死亡率,并相对于参考标准组评分。效力的截断值是 30IU/ 剂量。所有动物针对白喉毒素进行血清转化。在 Balb/c 小鼠中测定破伤风类毒素的效力。每个测试组、参考标准和对照组包括 6 只动物。对每只小鼠皮下注射 0.5ml 的四种破伤风类毒素 (TT) 的两倍系列稀释液。四周后,用 0.5ml 体积的 100LD50 的破伤风类毒素攻击疫苗接种的动物 (疫苗测试组和参考标准组)。用 1/50 至 1/200 稀释的破伤风毒素刺激对照组。观察动物的死亡率。效力结果用 IU/ml 表示 (表 1)。效力的截

断值是 60IU/ 剂量。被相伴施用疫苗的所有动物进行血清转化, 并且没有观察到疫苗抗原或矾的抗原干扰。通过 ELISA 使用来自 NIBSC 的参考标准针对去毒百日咳毒素产生的抗体效价测定无细胞百日咳组分的效力。还确定了针对百日咳杆菌粘附素蛋白的抗体效价。

[0058] 表 1: 相伴施用的疫苗抗原的效力测试

[0059]

疫苗抗原	测试的动物	%血清转化	抗体效价(6 只动物的平均值)	用于抗体测定的方法
HEV+HbsAg-HPVL2(或 HEV-HPVL2)@ +HPV16 L1+HPV18 L1+ Tdap Tdap 组分: 破伤风 白喉 无细胞百日咳抗原: 去毒百日咳毒素 百日咳杆菌粘附素 FHA	Balb/c 小鼠	100 %	抗 HbsAg (作为 HbsAg-L2) = 32 mIU/ml	ELISA(Axsym Ausab, Abbot Laboratories)
			抗 HEV = 128,000* (测量了针对 HEV 抗原和 HEV-L2 抗原的 HEV 抗体)	内部间接 ELISA (in-house indirect ELISA)
			抗 HPV16L1=64,000*	内部间接 ELISA
	Balb/c 小鼠		抗 HPV18L1=128,000*	内部间接 ELISA
	豚鼠		抗 HPV16 L2= 12,800*(测量 了针对 HEV-L2 和 / 或 HbsAg-L2 抗原的 L2 抗体)	内部间接 ELISA
			破伤风毒素= 75 IU/ml	毒素中和测试
			白喉抗毒素= 45 IU/ml	毒素中和测试
			去毒的百日咳抗毒素 = 12800*	内部 ELISA
			抗百日咳杆菌粘附素= 6400*	内部 ELISA
			抗 FHA	未确定

[0060] * 抗体效价被评价为高出对照动物的血清稀释度的血清稀释度 +3× 对照值的标准差的倒数。

[0061] @- 施用 HbsAg-L2 或 HEV-L2 中的任一种引发针对 L2 表位的免疫应答, 而没有来自其他抗原的干扰。

[0062] 参考文献

[0063] 1. Emerson UE, Purcell RH. (2007): in Fields Virology, 编者 Knipe D, Howley P (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 第 1 卷, 第 3047-3058 页。

[0064] 2. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. (2008): Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. J. Biosci 33, 451-464.

[0065] 3. Guu TS, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, Yin C, Zhang J, Tao YJ. (2009): Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 12992-12997.

[0066] 4. Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S 等 (1981): Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. Am J Med 70:252-255.

[0067] 5. Tsega E, Krawzyski K, Hansson L 等 1993: Hepatitis E virus infection in pregnancy in Ethiopia. Ethiop Med J 1993;31:173-181.

[0068] 6. Lindemann MLM, Morales JG, Fernandez-Barrado S 等 (2010): Case report: fulminant hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication. Am J Trop Med Hyg, 82, 12-15.

[0069] 7. Schofield FD, Tucker VM, Westbrook GR. (1961): Neonatal tetanus in New

Guinea. Effect of active immunization in pregnancy. Br Med J 2, 785-789.

[0070] 8. Nanda S. K, Yalcinkaya K, Panigrahi A. K, Acharya S. K, Jameel S 和 Panda S. K. (1994): "Etiological role of hepatitis E virus in sporadic fulminant hepatitis," Journal of Medical Virology, 42, 133-137.

[0071] 9. Beniwal M, Kumar A, Kar P, (2003): Prevalence and severity of acute viral hepatitis and fulminant hepatitis during pregnancy: a prospective study from North India. Indian J Med Microbiol. 21, 184-185.

[0072] 10. Kumar A, Beniwal B, Kar P 等 (2004): Hepatitis E in pregnancy. Int J Gynaecol Obstet. 85, 240-244.

[0073] 11. Khuroo MS, Salimi K, Jameel S. (1995): Vertical transmission of hepatitis E virus. Lancet. 345, 1025-1026.

[0074] 12. Amini-Bavil-Olyaei S, Trautwein C, Tacke F. (2009): Hepatitis E Vaccine: Current Status and Future Prospects. Future Virology. 4, 143-154.

[0075] 13. Zhu 等, (2010): Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet, 376, 895 - 902.

[0076] 14. Mushahwar IK. (2008): Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. J Med Virol. 80, 646-658.

[0001]

序列表

<110> 巴拉特生物技术国际有限公司

<120> 疫苗组合物

<130> BBIL/HPV-HEV

<140> INPCT/IN2013/000306

<150> IN486/CHE/2012

<151> 2012-05-09

<160> 23

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 660

<212> PRT

<213> HEV ORF2

<400> 1

```

Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Phe Leu Met Phe Leu Pro Met
1           5           10           15
Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg
20           25           30
Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg Val Asp Ser
35           40           45
Gln Pro Phe Ala Ile Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn Pro Phe Ala Pro
50           55           60
Asp Val Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Arg Val Arg Gln Pro Ala
65           70           75           80
Arg Pro Leu Gly Ser Ala Trp Arg Asp Gln Ala Gln Arg Pro Ala Ala
85           90           95
Ala Ser Arg Arg Arg Pro Thr Thr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Thr Ala
100          105          110
Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg
115          120          125
Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr
130          135          140
Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu
145          150          155          160
Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala
165          170          175
Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr Ile
180          185          190
Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser
195          200          205
Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met
210          215          220
Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile
225          230          235          240
Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn Gln
245          250          255
Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr
260          265          270
Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser Tyr
275          280          285

```

[0002]

Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala Leu		
290	295	300
Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg Val		
305	310	315 320
Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala Asp		
325	330	335
Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp		
340	345	350
Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly Ile		
355	360	365
Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro		
370	375	380
Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro		
385	390	395 400
Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val		
405	410	415
Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp		
420	425	430
Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu		
435	440	445
Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val		
450	455	460
Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr		
465	470	475 480
Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp		
485	490	495
Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg		
500	505	510
Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr		
515	520	525
Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys		
530	535	540
Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn		
545	550	555 560
Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly		
565	570	575
His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro		
580	585	590
Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu Ala		
595	600	605
Leu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe Asp		
610	615	620
Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe		
625	630	635 640
Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly Lys		
645	650	655
Thr Arg Glu Leu		
660		

<210> 2

<211> 473

[0003]

```

<212> PRT
<213> HPV16 L2
<400> 2
Met Arg His Lys Arg Ser Ala Lys Arg Thr Lys Arg Ala Ser Ala Thr
1           5           10          15
Gln Leu Tyr Lys Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys Pro Pro Asp Ile
20          25          30
Ile Pro Lys Val Glu Gly Lys Thr Ile Ala Asp Gln Ile Leu Gln Tyr
35          40          45
Gly Ser Met Gly Val Phe Phe Gly Gly Leu Gly Ile Gly Thr Gly Ser
50          55          60
Gly Thr Gly Gly Arg Thr Gly Tyr Ile Pro Leu Gly Thr Arg Pro Pro
65          70          75          80
Thr Ala Thr Asp Thr Leu Ala Pro Val Arg Pro Pro Leu Thr Val Asp
85          90          95
Pro Val Gly Pro Ser Asp Pro Ser Ile Val Ser Leu Val Glu Thr
100         105         110
Ser Phe Ile Asp Ala Gly Ala Pro Thr Pro Val Pro Ser Ile Pro Pro
115         120         125
Asp Val Ser Gly Phe Ser Ile Thr Thr Ser Thr Asp Thr Thr Pro Ala
130         135         140
Ile Leu Asp Ile Asn Asn Thr Val Thr Thr Val Thr Thr His Asn Asn
145         150         155         160
Pro Thr Phe Thr Asp Pro Ser Val Leu Gln Pro Pro Thr Pro Ala Glu
165         170         175
Thr Gly Gly His Phe Thr Leu Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr His Asn
180         185         190
Tyr Glu Glu Ile Pro Met Asp Thr Phe Ile Val Ser Thr Asn Pro Asn
195         200         205
Thr Val Thr Ser Ser Thr Pro Ile Pro Gly Ser Arg Pro Val Ala Arg
210         215         220
Leu Gly Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Gln Gln Val Lys Val Val Asp Pro
225         230         235         240
Ala Phe Val Thr Thr Pro Thr Lys Leu Ile Thr Tyr Asp Asn Pro Ala
245         250         255
Tyr Glu Gly Ile Asp Val Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ser Ser Asn Asp
260         265         270
Asn Ser Ile Asn Ile Ala Pro Asp Pro Asp Phe Leu Asp Ile Val Ala
275         280         285
Leu His Arg Pro Ala Leu Thr Ser Arg Arg Thr Gly Ile Arg Tyr Ser
290         295         300
Arg Ile Gly Asn Lys Gln Thr Leu Arg Thr Arg Ser Gly Lys Ser Ile
305         310         315         320
Gly Ala Lys Val His Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ser Thr Ile Asp Pro Ala
325         330         335
Glu Glu Ile Glu Leu Gln Thr Ile Thr Pro Ser Thr Tyr Thr Thr Thr
340         345         350
Ser His Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ile Asn Asn Gly Leu Tyr Asp Ile
355         360         365
Tyr Ala Asp Asp Phe Ile Thr Asp Thr Ser Thr Thr Pro Val Pro Ser
370         375         380

```

[0004]

```

Val Pro Ser Thr Ser Leu Ser Gly Tyr Ile Pro Ala Asn Thr Thr Ile
385                390                395                400
Pro Phe Gly Gly Ala Tyr Asn Ile Pro Leu Val Ser Gly Pro Asp Ile
                405                410                415
Pro Ile Asn Ile Thr Asp Gln Ala Pro Ser Leu Ile Pro Ile Val Pro
                420                425                430
Gly Ser Pro Gln Tyr Thr Ile Ile Ala Asp Ala Gly Asp Phe Tyr Leu
                435                440                445
His Pro Ser Tyr Tyr Met Leu Arg Lys Arg Arg Lys Arg Leu Pro Tyr
                450                455                460
Phe Phe Ser Asp Val Ser Leu Ala Ala
465                470

```

<210> 3

<211> 1494

<212> DNA

<213> HEV ORF2

<220>

<221> source

<222> 1..1494

<223> /分子_类型="未指定的 DNA"

/注解="合成的基因"

/生物体="HEV ORF2"

<400> 3

```

atggccgttg caccitgctca igataactcct ccagttccag atgttgatgc tagagggtget      60
atcttgagaa gacaatacaa ccttagtacc tctcctttga cttcttcctg tgctaetgggt      120
acaaatcttg tcttgtaggc agctccactt tcacctcttt tgcatttgea agacggaaac      180
aacactcaca tcatggctac agaagccagt aattatgctc agtacagagt tgccagagca      240
aciatltagat atagaccitt ggttccaaac gcagtcggag gttacgclat ttccatctca      300
ttctggccac aaaccaactac aaccctactt tctgttgata tgaactctat cacatcaacc      360
gacgttagaa ttitggctca accaggtatc gcttctgagc ttgttattec ttccgaaaga      420
ttgcattata gaaaccaggg ttggagatcc gttgaaacat caggagtcgc agaagaggaa      480
gctacctctg gtcttggtat gttgtgtatt cacggaagtc cagtcaacte ttatactaat      540
acaccttaca ctggagcatt gggctctttg gattttgctc ttgagttgga gtttagaaat      600
ttgactcctg gtaacaccaa cactagagtt tctagatact caagtactgc tagacataga      660
ttgagaagag gagecgatgg tactgcagag ttgactacaa ccgcgcgaac aagattcatg      720
aaagacttgt acttcacatc caccaacgga gttggtgaaa ttggaagagg tategccctt      780
acattgttta atttggcaga tacccttttg ggaggtcttc caactgagtt gatttcttcc      840
gtctggaggtc aattgttcta ttctagacca gtgtctcccg cttaacggaga gcttacagtt      900
aaattgtaca cctcagtcga aaatgetcaa caggataagg gtattgceat cctcatgat      960
atcgacttgg gagagtctag agttgtcatt caggattacg acaaccaaca cgaacaggac      1020
agacctactc cctcccttgc cccatctaga ccattttctg ttttgagage aaatgatgtc      1080
ctttggttgt cacttactgc tgccgaatat gaccaaagta cttacggttc aagtacagga      1140
ccigtltatg tcagtgatc tgttaccttg gttaacgtcg ctactgggtc tcaggccgtt      1200
gcaagatcct tggattggac taaggtcaca cttgacggaa gaccattgtc aacaattcaa      1260
cagtacagta agaccttttt cgttttgccct ctctgttgta aattgtcttt ctgggaagcc      1320
ggtactacaa aggcaggata cccatataac tacaatacca ctgcttccga tcaacttttg      1380
gttgagaatg cagcttggtc cagagtcgct atctcaactt atacaaccag tttagggagcc      1440
ggctcagttt ccatttcage tgttgcctgc cttgctctct attctgcatt ggct      1494

```

<210> 4

[0005]

<211> 498
 <212> PRT
 <213> HEV ORF2
 <220>
 <223> 112-608 AA
 <400> 4
 Met Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp
 1 5 10 15
 Ser Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro
 20 25 30
 Leu Thr Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala
 35 40 45
 Pro Leu Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile
 50 55 60
 Met Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala
 85 90 95
 Ile Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val
 100 105 110
 Asp Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro
 115 120 125
 Gly Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg
 130 135 140
 Asn Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu
 145 150 155 160
 Ala Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn
 165 170 175
 Ser Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe
 180 185 190
 Ala Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr
 195 200 205
 Arg Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly
 210 215 220
 Ala Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met
 225 230 235 240
 Lys Asp Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg
 245 250 255
 Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly
 260 265 270
 Leu Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Val Glu Asn Ala Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
 305 310 315 320
 Ile Asp Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
 325 330 335
 His Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 340 345 350
 Ser Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala

[0006]

```

          355          360          365
Glu Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
          370          375          380
Ser Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
          385          390          395          400
Ala Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
          405          410          415
Ser Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
          420          425          430
Gly Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
          435          440          445
Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
          450          455          460
Ala Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
          465          470          475          480
Gly Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala
          485          490          495
Leu Ala

```

<210> 5

<211> 1572

<212> DNA

<213> HEV-HPV16L2

<220>

<221> source

<222> 1..1572

<223> /分子_类型="未指定的DNA"
 /注解="嵌合基因(1572 bp)"
 /生物体="HEV-HPV16L2"

<400> 5

```

atgtctgcaa ctcagttgta taaaacttgc aagcaagctg gtacttgcce accagacatt      60
atcccaagg ttgaaggatc cgccgttgca cctgctcatg atactcctcc agttccagat      120
gttgattcta gaggtgctat cttgagaaga caatacaacc ttagtacctc tccittgact      180
tcctccgttg ctactggtac aaatcttgtc ttgtacgcag ctccactttc acctcttttg      240
ccattgcaag acggaacca cactcacatc atggtctacag aagccagtaa ttatgctcag      300
tacagagttg ccagagcaac tattagatat agaccttttg ttccaaacgc agtcggaggt      360
tacgtatatt ccatctcatt ctggccaaca accactacaa cccctacttc tgttgatatg      420
aacctctatc catcaaccga cgttagaatt ttggtccaac caggtatcgc ttctgagett      480
gttatctctt cegaaagatt gcattataga aaccaggggt ggagatccgt tgaaacatca      540
ggagtcgcag aagaggaage tacctctggt cttgttatgt tgtgtattca cggaagtcca      600
gtcaactctt atactaatac accttacact ggagcattgg gtcttttgga ttttgccttt      660
gagttggagt ttagaaattt gactcctggt aacaccaaca ctagagtttc tagatactca      720
agtactgcta gacatagatt gagaagagga gccgatggta ctgcagagtt gactacaacc      780
gccgaacaa gattcatgaa agacttgtac ttcacatcca ccaacggagt tggtgaaatt      840
ggaagaggta tcgcccttac attgtttaat ttggcagata cccitttggg aggtcttcca      900
actgagittg tttcttccgc tggaggtc aa ttgtctatt ctagaccagt tgtctccgct      960
aacggagagc ctacagttaa attgtacacc tcagtcgaaa atgctcaaca ggataagggt      1020
attgccatcc ctcattgatg egacttggga gagtctagag ttgtcattca ggattacgac      1080
aaccaaacag aacaggacag acctactcca tcccctgccc catctagacc attttctgtt      1140
ttgagagcaa atgatgtcct ttggttgtea cttaactgctg cegaatatga ccaaagtact      1200

```

[0007]

```

tacggttcaa gtacaggacc tgtttatgtc agtgattctg ttacettggt taacgtegct 1260
actgggtgctc aggccgttgc aagatccttg gattggacta aggtcacact tgacggaaga 1320
ccattgtcaa caattcaaca gtacagtaag acctttttcg ttttgccctc tegtggtaaa 1380
ttgtctttct gggaagccgg tactacaaag gcaggatacc catataacta caataccact 1440
gtcttcgata aacitttggg tgagaatgca gctggtcaca gagtcgctat ctcaacitat 1500
acaaccagtt tgggagccgg tccagtttcc atttcagctg ttgcgcctct tgetctcat 1560
tctgcattgg ct 1572

```

<210> 6

<211> 524

<212> PRT

<213> HEV-HPV16L2

<220>

<223> 嵌合体(524 AA)

<400> 6

```

Met Ser Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys
1          5          10          15
Pro Pro Asp Ile Ile Pro Lys Val Glu Gly Ser Ala Val Ala Pro Ala
20          25          30
His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg Gly Ala Ile Leu
35          40          45
Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr Ser Ser Val Ala
50          55          60
Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu Ser Pro Leu Leu
65          70          75          80
Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala Thr Glu Ala Ser
85          90          95
Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr Ile Arg Tyr Arg Pro
100         105         110
Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser Ile Ser Phe Trp
115         120         125
Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met Asn Ser Ile Thr
130         135         140
Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile Ala Ser Glu Leu
145         150         155         160
Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn Gln Gly Trp Arg Ser
165         170         175
Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Ser Gly Leu Val
180         185         190
Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser Tyr Thr Asn Thr Pro
195         200         205
Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala Leu Glu Leu Glu Phe
210         215         220
Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg Val Ser Arg Tyr Ser
225         230         235         240
Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala Asp Gly Thr Ala Glu
245         250         255
Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp Leu Tyr Phe Thr
260         265         270
Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly Ile Ala Leu Thr Leu
275         280         285

```

[0008]

```

Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro Thr Glu Leu Ile
290                295                300
Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro Val Val Ser Ala
305                310                315                320
Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val Glu Asn Ala Gln
                325                330                335
Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp Leu Gly Glu Ser
                340                345                350
Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu Gln Asp Arg Pro
                355                360                365
Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val Leu Arg Ala Asn
                370                375                380
Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr Asp Gln Ser Thr
385                390                395                400
Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Ser Val Thr Leu
                405                410                415
Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg Ser Leu Asp Trp
                420                425                430
Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr Ile Gln Gln Tyr
                435                440                445
Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp
                450                455                460
Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr
465                470                475                480
Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly His Arg Val Ala
                485                490                495
Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Val Ser Ile Ser
                500                505                510
Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu Ala
                515                520

```

<210> 7

<211> 1572

<212> DNA

<213> HEV-HPV16L2

<220>

<221> source

<222> 1..1572

<223> /分子_类型="未指定的DNA"

/注解="嵌合基因(1572 bp)"

/生物体="HEV-HPV16L2"

<400> 7

```

atggccgttg cacctgctca tgatactcct ccagttccag atggtgattc tagaggtgct      60
atcttgagaa gacaatacaa ccttagtacc tctccttga cttcttccgt tgctactggc      120
acaaatcttg tcttgtaagc agctccactt tcacctctt tgccattgca agacggaacc      180
aacactcaca tcatggctac agaagccagt aattatgctc agtacagagt tgccagagca      240
actattagat atagaccttt ggttccaaac gcagtcggag gttacgetat ttccatctca      300
ttctggccac aaaccactac aacctctact tctgttgata tgaactctat cacatcaacc      360
gacgttagaa ttctggctca accaggtatc gcttctgagc ttgttatctc ttccgaaaga      420
ttgcattata gaaaccaggg ttggagatcc gttgaaacat caggagtcgc agaagaggaa      480
gtacacctctg gtcttggtat gttgtgtatt caccgaagtc cagtcactc ttatacta      540

```

[0009]

```

acaccttaca ctggagcatt gggctctttg gattttgctc ttgagttgga gtttagaaat    600
ttgactcctg gtaacaccaa cactagagtt tctagatact caagtactgc tagacataga    660
ttgagaagag gagccgatgg tactgcagag ttgactacaa ccgcgcgaac aagattcatg    720
aaagacttgt acttcacatc caccacggga gttggtgaaa ttggaagagg tategccctt    780
acattgttta atttggcaga tacccttttg ggaggtcttc caactgagtt gatttcttcc    840
gtcggaggtc aattgttcta ttctagacca gttgtcttcg ctaacggaga gcctacagtt    900
aaattgtaca cctcagtcga aaatgtcaca caggataagg gtattgccat ccctcatgat    960
atcgacttgg gagagtctag agttgtcatt caggattacg acaaccaaca cgaacaggac   1020
agacctactc cateccctgc cccatctaga ccattttctg ttttgagagc aaatgatgtc   1080
ctttggttgt cacttactgc tgcgaatat gaccaaagta cttacggttc aagtacagga   1140
ccgttttatg tcagtgttcc tglaccttg gttaacgtcg ctactgggtc tcaggccggt   1200
gcaagatcct tggattggac taaggtcaca cttgaeggaa gaccattgtc aacaattcaa   1260
cagtacagta agaccttttt cgttttgcct cttcgttgta aattgtcttt ctgggaagcc   1320
ggtactacaa aggcaggata cccatataac tacaatacea ctgcttcoga tcaacttttg   1380
gttgagaatg cagctgggtc cagagtcgct atctcaactt atacaaccag tttgggagcc   1440
ggctccagttt ccatttcagc tgttgccgtc cttgctcttc attctgcatt ggetggatct   1500
gcaactcagt tgtataaaac ttgcaagcaa gctggtactt gccaccaga cattatecca   1560
aaggttgaag ga                                     1572

```

<210> 8

<211> 524

<212> PRT

<213> HEV-HPV16L2

<220>

<223> 嵌合蛋白(524 AA)

<400> 8

```

Met Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp
1          5          10          15
Ser Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro
          20          25          30
Leu Thr Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala
          35          40          45
Pro Leu Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile
          50          55          60
Met Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala
65          70          75          80
Thr Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala
          85          90          95
Ile Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val
          100          105          110
Asp Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro
          115          120          125
Gly Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg
          130          135          140
Asn Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu
145          150          155          160
Ala Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn
          165          170          175
Ser Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe
          180          185          190
Ala Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr

```

[0010]

195	200	205
Arg Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly		
210	215	220
Ala Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met		
225	230	235
Lys Asp Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg		
245	250	255
Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly		
260	265	270
Leu Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser		
275	280	285
Arg Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr		
290	295	300
Ser Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp		
305	310	315
Ile Asp Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln		
325	330	335
His Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe		
340	345	350
Ser Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala		
355	360	365
Glu Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val		
370	375	380
Ser Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val		
385	390	395
Ala Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu		
405	410	415
Ser Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg		
420	425	430
Gly Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro		
435	440	445
Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala		
450	455	460
Ala Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala		
465	470	475
Gly Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala		
485	490	495
Leu Ala Gly Ser Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Thr Cys Lys Gln Ala Gly		
500	505	510
Thr Cys Pro Pro Asp Ile Ile Pro Lys Val Glu Gly		
515	520	

<210> 9

<211> 1539

<212> DNA

<213> HEV-HPV16L2

<220>

<221> source

<222> J. 1539

<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/注解="嵌合基因(1539 bp)"

[0011]

/生物体="HEV-HPV16L2"

<400> 9

```

atggccttg cacctgctca tgatactcct ccagttccag atgttgatgc tagagggtgct    60
atcttgagaa gacaatacaa ccttagtacc tctcctttga cttcttccgt tgctactggt    120
acaaatcttg tcttgtaggc agctccactt tcacctcttt tgccattgca agacggaaacc    180
aacactcaca tcatggctac agaagccagt aattatgctc agtacagagt tgccagagca    240
actattagat atagaccttt ggttccaaac gcagtcggag gttacgctat ttccatctca    300
ttctggccac aaaccactac aaccctact tctgttgata tgaactctat cacatcaacc    360
gacgttagaa ttitgggtcca accaggtatc gcttctgagc ttgttattcc ttccgaaaga    420
ttgcattata gaaaccaggg ttggagatcc gttgaaacat caggagtcgc agaaggaggaa    480
gctacctctg gcttggttat gttgtgtatt caggaagtc cagtcaactc ttatactaata    540
acaccttaca ctggagcatt ggtctttttg gattttgctc ttgagttgga gtttagaaat    600
ttgactcctg gtaacaccaa cactagagtt tctagatact caagtactgc tagacataga    660
ttgagaagag gaggcgtatg tactgcagag ttgactacaa ccgccgcaac aagattcatg    720
aaagacttgt acttcacatc caccacggga gttggtgaaa ttggaagagg tatcgccctt    780
acattgttta atttggcaga tacccttttg ggaggtcttc caactgagtt gatttcttcc    840
gctggaggtc aattgttctc ttctagacca gttgtctccg ctaacggaga gcttacagtt    900
aaattgtaca cctcagtcga aaatgctcaa caggataagg gtattgccat ccttcattgat    960
atcgacttgg gagagcttag agttgtcatt caggattacg acaaccaaca cgaacaggac    1020
agacctactc cctcccttgc cccatctaga ccattttctg ttttgagagc aaatgatgtc    1080
ctttggttgt cacttactgc tgcgaatat gaccaaagta cttacgggtc aagtacagga    1140
cctgtttatg tcagtgttgc tgttaccttg gttaacgtcg ctactggtgc tcaggccgtt    1200
gcaagatcct tggattggac taaggtcaca cttgacggaa gaccattgtc aacaattcaa    1260
cagtacagta agaccttttt cgttttgcct cttcgttggt aattgtcttt ctgggaagcc    1320
ggtaactaca aggcaggata cccatataac tacaatacea ctgcttccga tcaacttttg    1380
gttgagaatg cagctgggtc cagagtcgct atctcaactt atacaaccag ttitgggagcc    1440
ggctcagttt ccatttcagc tgttgccgtc cttgctcttc attctgcatt ggetggatcc    1500
ttggttgaag aaacctcctt tattgacgct ggtgtctcca    1539

```

<210> 10

<211> 513

<212> PRI

<213> HEV-HPV16L2

<220>

<223> 嵌合蛋白(513 AA)

<400> 10

```

Met Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp
1           5           10          15
Ser Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro
20          25          30
Leu Thr Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala
35          40          45
Pro Leu Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile
50          55          60
Met Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala
65          70          75          80
Thr Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala
85          90          95
Ile Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val
100         105         110
Asp Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro

```

[0012]

	115					120					125				
Gly	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Ser	Glu	Arg	Leu	His	Tyr	Arg
130					135					140					
Asn	Gln	Gly	Trp	Arg	Ser	Val	Glu	Thr	Ser	Gly	Val	Ala	Glu	Glu	Glu
145	150					155					160				
Ala	Thr	Ser	Gly	Leu	Val	Met	Leu	Cys	Ile	His	Gly	Ser	Pro	Val	Asn
165					170					175					
Ser	Tyr	Thr	Asn	Thr	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Asp	Phe
180					185					190					
Ala	Leu	Glu	Leu	Glu	Phe	Arg	Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Asn	Thr	Asn	Thr
195					200					205					
Arg	Val	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Thr	Ala	Arg	His	Arg	Leu	Arg	Arg	Gly
210					215					220					
Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Arg	Phe	Met
225	230					235					240				
Lys	Asp	Leu	Tyr	Phe	Thr	Ser	Thr	Asn	Gly	Val	Gly	Glu	Ile	Gly	Arg
245					250					255					
Gly	Ile	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Leu	Ala	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Gly
260					265					270					
Leu	Pro	Thr	Glu	Leu	Ile	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Leu	Phe	Tyr	Ser
275					280					285					
Arg	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Asn	Gly	Glu	Pro	Thr	Val	Lys	Leu	Tyr	Thr
290					295					300					
Ser	Val	Glu	Asn	Ala	Gln	Gln	Asp	Lys	Gly	Ile	Ala	Ile	Pro	His	Asp
305	310					315					320				
Ile	Asp	Leu	Gly	Glu	Ser	Arg	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Tyr	Asp	Asn	Gln
325					330					335					
His	Glu	Gln	Asp	Arg	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	Pro	Phe
340					345					350					
Ser	Val	Leu	Arg	Ala	Asn	Asp	Val	Leu	Trp	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala
355					360					365					
Glu	Tyr	Asp	Gln	Ser	Thr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Pro	Val	Tyr	Val
370					375					380					
Ser	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Val	Asn	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Val
385	390					395					400				
Ala	Arg	Ser	Leu	Asp	Trp	Thr	Lys	Val	Thr	Leu	Asp	Gly	Arg	Pro	Leu
405					410					415					
Ser	Thr	Ile	Gln	Gln	Tyr	Ser	Lys	Thr	Phe	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Arg
420					425					430					
Gly	Lys	Leu	Ser	Phe	Trp	Glu	Ala	Gly	Thr	Thr	Lys	Ala	Gly	Tyr	Pro
435					440					445					
Tyr	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Ala	Ser	Asp	Gln	Leu	Leu	Val	Glu	Asn	Ala
450					455					460					
Ala	Gly	His	Arg	Val	Ala	Ile	Ser	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala
465	470					475					480				
Gly	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	His	Ser	Ala
485					490					495					
Leu	Ala	Gly	Ser	Leu	Val	Glu	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Asp	Ala	Gly	Ala
500					505					510					
Pro															

[0013]

```

<210> 11
<211> 1617
<212> DNA
<213> HEV-HPV16L2
<220>
<221> source
<222> 1..1617
<223> /分子_类型="未指定的DNA"
      /注解="嵌合基因(1617 bp)"
      /生物体="HEV-HPV16L2"
<400> 11
atgtctgcaa ctcagttgta taaaacttgc aagcaagctg gtacttgccc accagacatt      60
atcccaaagg ttgaaggatc cgccgttgca cctgctcatg ataactctcc agttccagat      120
gttgattcta gaggtgctat cttgagaaga caatacaacc ttagtacctc tccittgact      180
tcttcggttg ctactggtag aaatcttgtc ttgtacgcag ctccacttcc acctcttttg      240
ccattgcaag acggaacca aactcacatc atggctacag aagccagtaa ttatgctcag      300
tacagagttg ccagagcaac tattagatat agacctttgg ttccaaacgc agtcggaggt      360
tacgtatatt ccattctatt ctggccacaa accactacaa cccctacttc tgttgatatg      420
aactctatca catcaaccga cgttagaatt ttgtccaac caggtatcgc ttctgagctt      480
gttatctcct ccgaaagatt gcattataga aaccagggtt ggagatccgt tgaaacatca      540
ggagtgcag aagaggaagc tacctctggt cttgttatgt tgtgtattca cggaagtcca      600
gtcaactctt atactaatac acctacact ggagcattgg gtcttttggg ttttgctctt      660
gagttggagt ttagaaattt gactctggt aacaccaaca ctagagttc tagatactca      720
agtactgcta gacatagatt gagaagagga gccgatggt ctcagaggt gactacaacc      780
gcgcacaaca gattcatgaa agacttgtag ttacatcca ccaacggagt tggtgaaatt      840
ggaagaggta tcgccttac attgtttaat ttggcagata cccttttggg aggtcttcca      900
actgagttga tttcttccgc tggaggtcaa ttgtctatt ctagaccagt tgtctccgct      960
aacggagagc ctacagttaa attgtacacc tcagtcgaaa atgctcaaca ggataagggt      1020
attgccatcc ctcatgatat cgacttggga gactctagag ttgtcattca ggattacgac      1080
aaccaacacg aacaggacag acctactcca tccctgccc catctagacc attttctggt      1140
ttgagagcaa atgatgtcct ttggttgta cttactgctg ccgaatatga ccaaagtact      1200
tacggttcaa gtacaggacc tgtttatgtc agtgattctg ttaccttggg taacgtcgt      1260
actggtgctc aggcgttgc aagatccttg gatggacta aggtcacact tgacggaaga      1320
ccattgcaa caattcaaca gtacagtaag accttttctg ttttgctctc tcgtggtaaa      1380
ttgtctttct gggaagccgg tactacaaag gcaggatacc catataacta caataccact      1440
gcttcggatc aacttttggg tgagaatgca gctggteaca gagtcgctat ctcaacttat      1500
acaaccagtt tgggagccgg tccagtttcc atttcagctg ttgccgtcct tgctcctcat      1560
tetgcattgg ctggatcctt gggtgaagaa acctccttta ttgaagctgg tgcacca      1617

```

```

<210> 12
<211> 539
<212> PRT
<213> HEV-HPV16L2
<220>
<223> 嵌合蛋白(539 AA)
<400> 12
Met Ser Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys
1          5          10          15
Pro Pro Asp Ile Ile Pro Lys Val Glu Gly Ser Ala Val Ala Pro Ala
20          25          30

```

[0014]

[0015]

435 440 445
 Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp
 450 455 460
 Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr
 465 470 475 480
 Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly His Arg Val Ala
 485 490 495
 Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Val Ser Ile Ser
 500 505 510
 Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu Ala Gly Ser Leu Val
 515 520 525
 Glu Glu Thr Ser Phe Ile Asp Ala Gly Ala Pro
 530 535

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> HEVFP PCR 引物

<220>

<221> source

<222> 1..40

<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="HEVFP PCR 引物"

<400> 13

catttgaatt caccatggee gttgcacctg ctcatgatac

40

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> HEVRP PCR 引物

<220>

<221> source

<222> 1..39

<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="HEVRP PCR 引物"

<400> 14

tatcgcggcc gtcattaag ccaatgcaga atgaggagc

39

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> L2NTFP

<220>

<221> source

<222> 1..40

<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="L2NTFP"

<400> 15

atgtogaatt caccatggct gcaactcagt tgtataaaac

40

<210> 16

[0016]

<211> 32
<212> DNA
<213> L2NTRP
<220>
<221> source
<222> 1..32
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="L2NTRP"
<400> 16
atcgaggatc cttgaacctt tgggataatg tc 32

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> L2CTFP PCR 引物
<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="L2CTFP PCR 引物"
<400> 17
atgtcggatc etctgcaact cagttgtata aaac 34

<210> 18
<211> 43
<212> DNA
<213> L2CTRP PCR 引物
<220>
<221> source
<222> 1..43
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="L2CTRP PCR 引物"
<400> 18
atcgagcggc cgctcattaa cttcaacct ttgggataat gtc 43

<210> 19
<211> 39
<212> DNA
<213> L2CTRP1 PCR 引物
<220>
<221> source
<222> 1..39
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"
/生物体="L2CTRP1 PCR 引物"
<400> 19
ttggttgaag aaacctcett tattgacget ggtgetcca 39

<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> HEVNTFP PCR 引物

[0017]

<220>	
<221> source	
<222> 1..35	
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"	
/生物体="HEVNTRP PCR 引物"	
<400> 20	
acgtcggatc catcgccctt acatigttta atttg	35
<210> 21	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> HEVNTRP PCR 引物	
<220>	
<221> source	
<222> 1..39	
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"	
/生物体="HEVNTRP PCR 引物"	
<400> 21	
tatcgcggcc gctcattaag ccaatgcaga atgaggagc	39
<210> 22	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> HEVCTFP PCR 引物	
<220>	
<221> source	
<222> 1..38	
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"	
/生物体="HEVCTFP PCR 引物"	
<400> 22	
agctcgaatt caccatggcc cttacattgt ttaatttg	38
<210> 23	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> HEVCTRP PCR 引物	
<220>	
<221> source	
<222> 1..38	
<223> /分子_类型="未指定的 DNA"	
/生物体="HEVCTRP PCR 引物"	
<400> 23	
actcaggatc cttatcaagc caatgcagaa tgaggagc	38

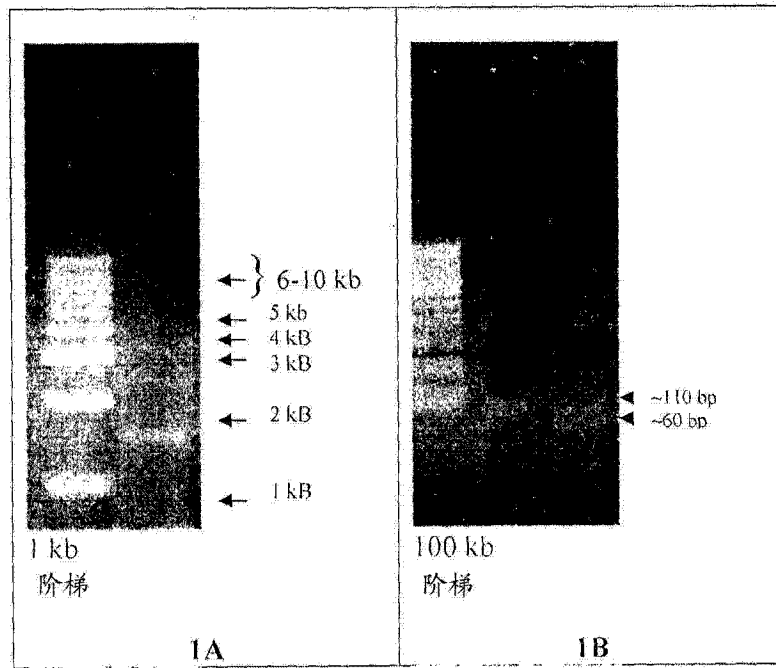


图 1

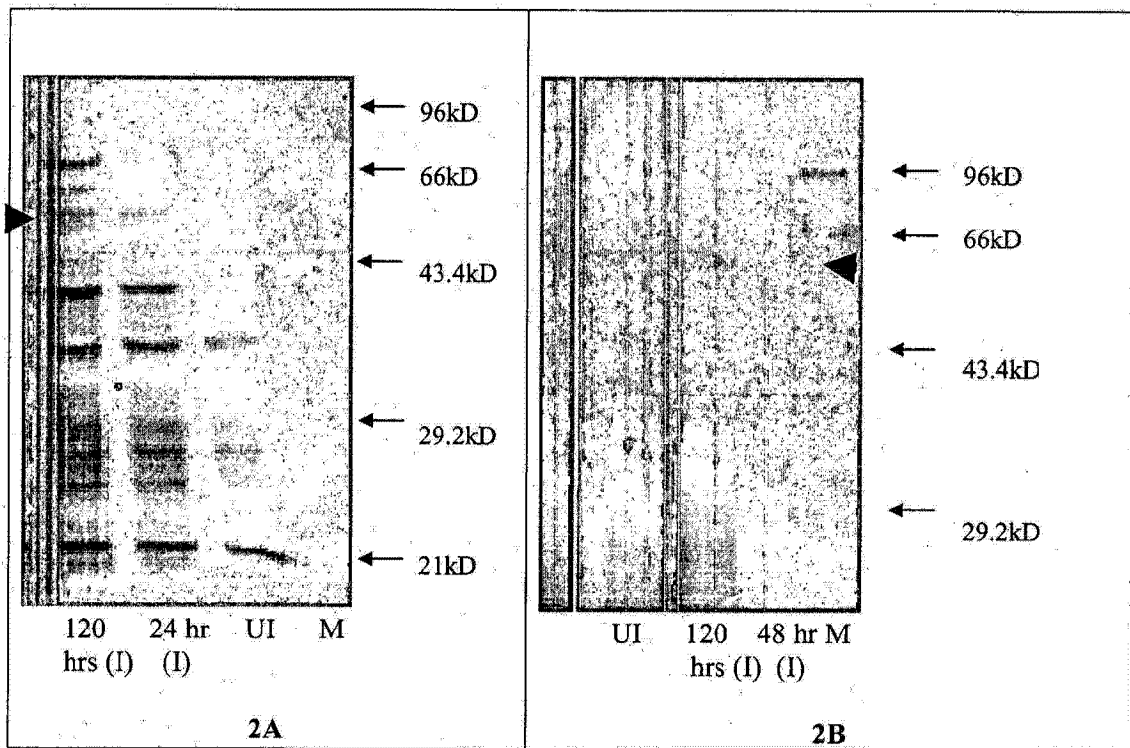


图 2

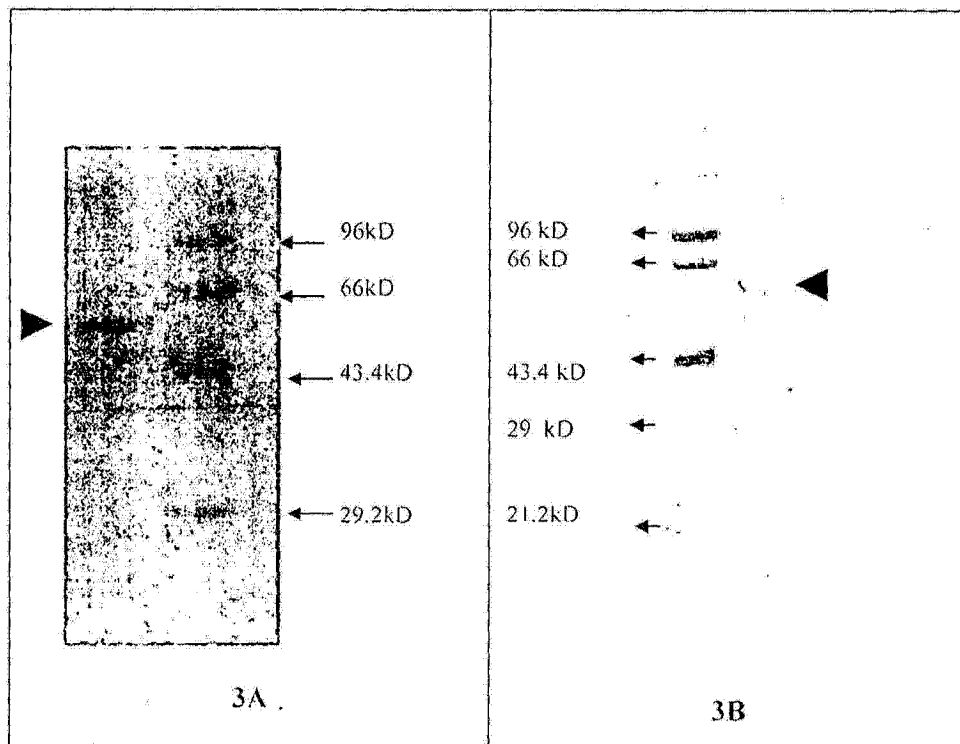


图 3

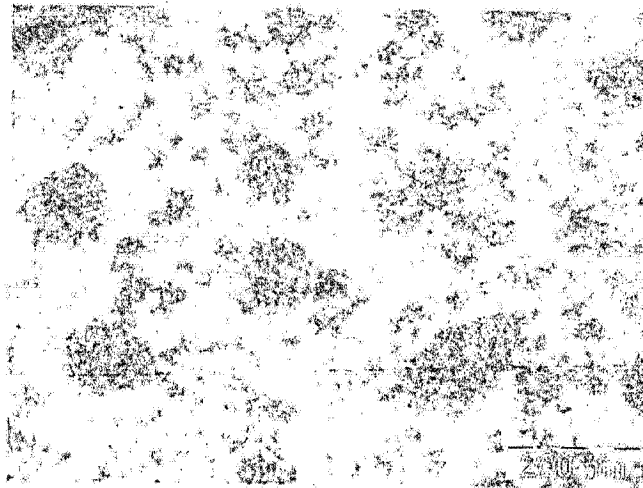


图 4