



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101343314 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200810111389. 1

C12P 21/02(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 05. 29

A61K 39/12(2006. 01)

(66) 本国优先权数据

A61P 17/12(2006. 01)

200710105763. 2 2007. 05. 29 CN

A61P 31/20(2006. 01)

(73) 专利权人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路
422 号

专利权人 北京万泰生物药业股份有限公司

(56) 对比文件

CN 1478790 A, 2004. 03. 03, 摘要, 权利要求
1-8, 说明书第 2 页第 1-2 行、第 6 段和第 5-7 页.

WO 03078455 A2, 2003. 09. 25, 权利要求

19-26, 摘要及说明书第 2-10 页.

(72) 发明人 张军 王晋 杨春燕 顾颖

李少伟 夏宁邵

Mingce, Z. . AF335603. 1. 《Genbank》. 2001, "F
EATURES", "ORIGIN" 项.

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

审查员 王航

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 14/025(2006. 01)

C12N 15/37(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 7/00(2006. 01)

C12N 7/02(2006. 01)

权利要求书2页 说明书34页 附图5页

(54) 发明名称

截短的人乳头瘤病毒 11 型 L1 蛋白

(57) 摘要

本发明涉及一种截短的人乳头瘤病毒 11 型 L1 蛋白, 及其组成的类病毒颗粒, 含该类病毒颗粒的疫苗及其在预防尖锐湿疣或 HPV 感染中的用途。

1. N 端截短了 3 个、5 个或 6 个氨基酸的 HPV11 L1 蛋白。
2. 权利要求 1 的蛋白,其氨基酸序列是序列 2、3、或 4。
3. N 端截短了 4 个氨基酸的 HPV11 L1 蛋白。
4. 权利要求 3 的蛋白,其氨基酸序列是序列 1。
5. 编码权利要求 1-4 任一项的蛋白的多核苷酸。
6. 包含权利要求 5 的多核苷酸的载体。
7. 包含权利要求 6 的载体的细胞。
8. 包含权利要求 3 或 4 的蛋白的用于预防尖锐湿疣或 HPV 感染的组合物。
9. 一种 HPV11 类病毒颗粒,其中该类病毒颗粒含有权利要求 1-2 任一项的蛋白或者由权利要求 1-2 任一项的蛋白形成。
10. 一种 HPV11 类病毒颗粒,其中该类病毒颗粒含有权利要求 3 或 4 的蛋白或者由权利要求 3 或 4 的蛋白形成。
11. 一种制备 HPV L1 蛋白的方法,其包括
 - a) 在大肠杆菌表达系统中表达编码 HPV L1 的 HPV L1 基因,
 - b) 将表达了 HPV L1 蛋白的大肠杆菌在盐浓度 100mM-600mM 中破碎,分离得到上清液,
 - c) 用水或低盐溶液将 b) 上清液中盐浓度降至 100mM 或以下,最低至 0,收集沉淀,
 - d) 将 c) 中沉淀在 150mM-2500mM 盐溶液中重新溶解,同时加入还原剂,分离得到溶液,其中含纯度至少 50%的 HPV L1 蛋白,其中所述 HPV L1 蛋白是权利要求 1-4 任一项的蛋白。
12. 一种用于预防尖锐湿疣或 HPV 感染的疫苗,其包含:权利要求 10 的 HPV11 类病毒颗粒,及疫苗用赋形剂或载体。
13. 权利要求 12 的疫苗,其中所述疫苗还包含至少一种选自 6, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 和 58 型别的 HPV 类病毒颗粒。
14. 权利要求 13 的疫苗,其中所述至少一种是 2、3、或 4 种。
15. 权利要求 13 的疫苗,其中所述至少一种选自 6, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 和 58 型别的 HPV 类病毒颗粒是 HPV L1 类病毒颗粒。
16. 权利要求 12 的疫苗,其中所述疫苗含有:HPV6 类病毒颗粒和 HPV11 类病毒颗粒。
17. 权利要求 16 的疫苗,其中所述 HPV6 类病毒颗粒和 HPV11 类病毒颗粒是含有其氨基酸序列是 SEQ ID NO :7 的蛋白质的 HPV6 类病毒颗粒和含有其氨基酸序列是 SEQ ID NO :1 的蛋白质的 HPV11 类病毒颗粒。
18. 权利要求 16 或 17 的疫苗,其中所述疫苗还含有 HPV16 类病毒颗粒和 HPV18 类病毒颗粒。
19. 权利要求 18 的疫苗,其中所述 HPV16 类病毒颗粒和 HPV18 类病毒颗粒是含有其氨基酸序列是 SRQ ID NO :8 的蛋白质的 HPV16 类病毒颗粒和含有其氨基酸序列是 SEQ ID NO : 9 的蛋白质的 HPV18 类病毒颗粒。
20. 权利要求 3 或 4 的蛋白或权利要求 10 的类病毒颗粒在制备用于预防尖锐湿疣或 HPV11 感染的疫苗中的用途。
21. 获得 HPV11 L1 蛋白类病毒颗粒的方法,其包括:
 - e) 将纯度至少 50%的权利要求 1-4 任一项的 HPV11 L1 蛋白进一步通过色谱层析纯化,

f) 将 e) 步骤中得到的 HPV11 L1 蛋白去除还原剂。

22. 制备用于预防尖锐湿疣或 HPV 感染的疫苗的方法, 其包括将权利要求 10 的类病毒颗粒与任选的一种或多种选自 HPV6, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 和 58 的 HPV 型别的类病毒颗粒及疫苗用载体或者赋形剂混合。

截短的人乳头瘤病毒 11 型 L1 蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及一种截短的人乳头瘤病毒 11 型 L1 蛋白, 及其组成的类病毒颗粒, 含该类病毒颗粒的疫苗及其在预防尖锐湿疣或 HPV (特别是 HPV11) 感染中的用途。

背景技术

[0002] 人乳头瘤病毒 HPV (Human Papillomavirus) 属乳头多瘤空泡病毒科 (Papovaviridae) 乳头瘤病毒属, 为无包膜 DNA 病毒。病毒基因组为双链闭环 DNA, 大小约为 7.2 ~ 8kb, 具有 8 个开放框。基因组按功能的不同可以分为三个区域: ①早期区 (E), 约 4.5kb, 编码 E1、E2、E4 ~ E7 6 个与病毒复制, 转录及转化有关的非结构蛋白; ②晚期区 (L), 约 2.5kb, 编码主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2; ③长调控区 (LCR), 位于 L 区末端与 E 区起始端之间, 长约 800 ~ 900bp, 不编码任何蛋白, 含 DNA 复制、表达调控元件。病毒颗粒直径为 45 ~ 55nm, 核衣壳呈 20 面体对称, 有 72 个壳微粒, 由 L1 及 L2 组成。

[0003] 目前已知的 HPV 约有 90 多种亚型, 在人群中主要引起皮肤, 粘膜的疣状病变。根据其 与肿瘤发生的关系又可分为 3 组: ①低或无致癌风险组, 包括 HPV6、11、39、41、42、43; ②中度致癌风险组, 包括 HPV31、33、35、51、52; ③高度癌风险组, 包括 HPV16、18、45、56。

[0004] 根据流行病学调查肛生殖器粘膜的 HPV 例如 HPV6, 11 的感染仅次于衣原体和滴虫病而居于第三位, 是一种常见的性传播疾病。而其中由 HPV6, 11 引起的病变占了总数的 90% 左右。在美国, 女性生殖道 HPV 感染的高峰在 15-25 岁, 并与感染者的性行为关系密切。在我国, 女性 HPV 的感染率的高峰期在 20-29 岁之间, 感染率为 1606.1/10 万。35 岁以上的妇女 HPV 感染率逐渐降低。但是由于 HPV 感染大多是亚临床感染, 感染率难以准确估计, 但美国 CDC 的估计一生中累计 HPV 感染风险大约 10%。此外由于采集大样本男性标本困难, 且男性感染 HPV 造成后果没有女性严重, 所以关于男性感染的资料较少。不过据估计, 男性的感染率应当接近女性。而在美国, 可见的尖锐湿疣见于 1% 的性活动期成年男性。因此, 开发安全有效的 HPV6, 11 疫苗是预防性传播疾病有效的有效手段。

[0005] HPV L1 蛋白为主要衣壳蛋白, 分子量为 55 ~ 60kDa, 是 HPV 疫苗主要靶蛋白。在多种表达系统中表达的 HPV L1 蛋白无需 L2 蛋白辅助即可形成在形态结构与天然病毒颗粒相似的类病毒颗粒 (Virus-Like Particle, VLP)。该种类病毒颗粒为二十面体立体对称结构, 由 72 个 L1 蛋白的五聚体组成。其保留了病毒颗粒的天然表位, 具有较强的免疫原性, 可诱导针对同型 HPV 病毒的中和抗体。(Kirnbauer, R., F. Booy, et al. 1992 Proc Natl Acad Sci USA 89(24):12180-4.) 并且, 类病毒颗粒并不带有病毒核酸, 无潜在致癌危险, 具有良好的安全性。因此, VLP 疫苗已成为 HPV 疫苗发展的主要方向。

[0006] HPV VLP 疫苗研制的关键是能够大量高效制备 VLP 样品。目前较为常用的表达系统可以分为真核表达系统及原核表达系统。

[0007] 常用的真核表达系统有痘病毒表达系统、昆虫杆状病毒表达系统、酵母表达系统。在真核表达系统中所表达的 HPV L1 蛋白天然构象破坏少, 能自发的形成 VLP, 往往只需进行简单的密度梯度离心即可得到纯化的 VLP, 为纯化工作提供极大的便利。但是由于真核表

达系统的表达量低,培养成本高,给大规模工业化生产带来了极大困难。目前已上市 HPV 疫苗 Gardasil[®]采用了酿酒酵母表达系统,其表达量低,生产成本低,因此该产品价位偏高,影响其广泛应用。

[0008] 原核表达系统中利用大肠杆菌表达系统表达 HPV L1 蛋白已有报道。例如有报道利用大肠杆菌表达 HPV16L1 蛋白 (Banks, L., G. Matlashewski, et al. (1987). J Gen Virol 68(Pt 12):3081-9)。但是由于大肠杆菌所表达的 HPV L1 蛋白大多失去其天然构象,不能产生针对 HPV 的保护抗体。或者上述蛋白虽然通过包含体纯化,复性等步骤也可得到 HPV VLP (Kelsall, S. R. and J. K. Kulski (1995). J Virol Methods 53(1):75-90),但是在复性过程中蛋白损失量大,得率低,难以在大规模生产上应用。HPV L1 蛋白虽然也可以在大肠杆菌中以正确构象可溶性地表达,溶解于菌体的裂解上清中,但是表达量较低,而且上清中杂蛋白种类多且量大,要从中纯化出目的蛋白难度相当大。虽然也有文献报道通过 GST 融合表达的方式可以增加上清中 L1 蛋白的表达量,而且有助目的蛋白的纯化 (Li, M., T. P. Cripe, et al. (1997). J Virol 71(4):2988-95.),但融和蛋白的切割往往需要价格昂贵的酶,依然无法应用于大规模生产。

[0009] 因此,本领域仍然需要具有低成本,能够诱导产生针对 HPV 保护性抗体的 HPV L1 蛋白及由其组成的类病毒颗粒,从而使大规模工业化生产尖锐湿疣疫苗成为可能。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种新的 HPV11L1 蛋白,及由其组成的类病毒颗粒及含该类病毒颗粒的疫苗。

[0011] 本发明人经研究出人意料地发现,在大肠杆菌表达系统能得到可以诱导针对 HPV11 的中和抗体的截短 HPV11L1 蛋白,该截短的 HPV11L1 蛋白经纯化后得到高产率,纯度至少 50% 的 HPV L1 蛋白。纯化后的 HPV L1 蛋白经进一步处理得到可诱导针对 HPV11 保护性抗体的类病毒颗粒,本发明基于以上发明现已完成。

[0012] 因此,本发明第一方面涉及一种(与野生型 HPV11L1 蛋白相比)N 端截短了 3 个、4 个、5 个或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白。优选该截短蛋白具有序列 1、2、3、或 4,优选序列 1。

[0013] 本发明再一方面涉及编码本发明截短蛋白的多核苷酸以及含有该多核苷酸的载体。

[0014] 本发明再一方面涉及包含上述载体的细胞。

[0015] 本发明还涉及包含上述截短蛋白或多核苷酸或载体或细胞的组合物。

[0016] 本发明再一方面涉及一种 HPV11 类病毒颗粒,其中该类病毒颗粒包含 N 端截短了 3 个、4 个、5 个或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白例如具有序列 1、2、3、或 4 的 HPV11L1 蛋白,或者由 N 端截短了 3 个、4 个、5 个或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白例如具有序列 1、2、3、或 4 的 HPV11L1 蛋白组成或形成。

[0017] 本发明再一方面涉及一种获得 HPV11L1 蛋白的方法,其包括在大肠杆菌表达系统中表达截短的 HPV11L1 基因片段,然后将含有该截短蛋白的裂解上清进行纯化处理。

[0018] 在一个优选实施方案中,获得 HPV11L1 蛋白的方法包括

[0019] a) 在大肠杆菌表达系统中表达截短的 HPV11L1 基因片段,

[0020] b) 将表达了截短 HPV11L1 蛋白的大肠杆菌在盐浓度 100mM-600mM 中破碎,分离得

到上清液，

[0021] c) 用水或低盐溶液将 b) 上清液中盐浓度降至 100mM 或以下，最低至 0，收集沉淀，

[0022] d) 将 c) 中沉淀在 150mM-2500mM 盐溶液中重新溶解，同时加入还原剂，分离得到溶液，其中含纯度至少 50% 的截短 HPV11L1 蛋白。

[0023] 更一般性地，本发明还涉及一种获得 HPV L1 蛋白例如本发明 HPV11L1 蛋白的方法，其包括

[0024] a) 在大肠杆菌表达系统中表达编码 HPV L1 蛋白的 HPV L1 基因，

[0025] b) 将表达了 HPV L1 蛋白的大肠杆菌在盐浓度 100mM-600mM 中破碎，分离得到上清液，

[0026] c) 用水或低盐溶液将 b) 上清液中盐浓度降至 100mM 或以下，最低至 0，收集沉淀，

[0027] d) 将 c) 中沉淀在 150mM-2500mM 盐溶液中重新溶解，同时加入还原剂，分离得到溶液，其中含纯度至少 50% 的 HPV L1 蛋白。

[0028] 本发明还涉及一种预防尖锐湿疣或 HPV 感染的疫苗，其包含本发明的 HPV11L1 蛋白类病毒颗粒。优选该疫苗还包含至少一种选自 HPV18L1 蛋白类病毒颗粒，HPV6L1 蛋白类病毒颗粒，HPV16L1 蛋白类病毒颗粒，HPV31L1 蛋白类病毒颗粒，HPV33L1 蛋白类病毒颗粒，HPV45L1 蛋白类病毒颗粒，HPV52L1 蛋白类病毒颗粒，HPV58L1 蛋白类病毒颗粒的类病毒颗粒。该疫苗通常还包含疫苗用赋形剂或载体。

[0029] 优选地，所述疫苗含有：HPV6 类病毒颗粒和 HPV11 类病毒颗粒，特别是，含有具有 SEQ ID NO :7 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV6 类病毒颗粒和含有具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV11 类病毒颗粒。更优选所述疫苗还含有 HPV16 类病毒颗粒和 HPV18 类病毒颗粒，特别是含有具有 SEQ ID NO :8 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV16 类病毒颗粒和含有具有 SEQ ID NO :9 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV18 类病毒颗粒。

[0030] 在一个特别优选的实施方案中，所述疫苗包含：含有具有 SEQ IDNO :7 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV6 类病毒颗粒，含有具有 SEQ IDNO :1 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV11 类病毒颗粒，含有具有 SEQ IDNO :8 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV16 类病毒颗粒和含有具有 SEQ IDNO :9 所示氨基酸序列的蛋白质的 HPV18 类病毒颗粒。

[0031] 本发明进一步涉及本发明 HPV11L1 蛋白或其类病毒颗粒在制备用于预防尖锐湿疣或 HPV 感染疫苗中的用途。

[0032] 本发明还涉及一种预防尖锐湿疣或 HPV 感染的方法，其包括将含预防有效量的本发明 HPV11L1 蛋白疫苗给予需预防尖锐湿疣或 HPV 感染的人或动物。

[0033] 本发明还涉及一种获得 HPV11L1 蛋白类病毒颗粒的方法，其包括：

[0034] e) 将纯度至少 50% 的截短 HPV11L1 蛋白进一步通过色谱层析纯化，

[0035] f) 将 e) 步骤中得到的 HPV11L1 蛋白去除还原剂。

[0036] 本发明还涉及一种制备用于预防尖锐湿疣或 HPV 感染疫苗的方法，其包括将上述类病毒颗粒与任选的一种或多种选自 HPV6, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 和 58 的 HPV 型别的类病毒颗粒及疫苗用载体或者赋形剂混合。

[0037] 本发明中相关术语的说明及解释

[0038] 根据本发明，术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌（菌株）与载体组成，其中大肠杆菌（菌株）来源于市场上可得到的，在此举例但不限于：GI698, ER2566, BL21 (DE3)，

B834(DE3), BLR(DE3)。

[0039] 根据本发明,术语“载体”一词指的是,可将某编码蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可以通过转化,转导或者转染宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。举例来说,载体包括:质粒;噬菌体;柯斯质粒等等。

[0040] 根据本发明,术语“截短的 HPV11L1 蛋白基因片段”是指在野生型 HPV11L1 蛋白基因(cDNA)的5'端或3'端去掉编码一个或者多个氨基酸的核苷酸,其中野生型 HPV11L1 蛋白基因全长序列举例但不限于 NCBI 数据库中如下序列:M14119.1, AF335603.1, AF335602.1,等。

[0041] “截短的 HPV11L1 蛋白”是指在野生型 HPV11L1 蛋白的 N 端和 / 或 C 端去掉一个或者多个氨基酸后的蛋白质,其中野生型 HPV11L1 蛋白的例子有但不限于 NCBI 数据库中 M14119.1, AF335603.1, AF335602.1, 等所编码的全长 L1 蛋白。

[0042] 根据本发明,术语“疫苗用赋形剂或载体”是指选自一种或多种,包括但不限于:pH 调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH 调节剂举例但不限于磷酸盐缓冲液,表面活性剂包括阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂。举例但不限于:Tween-80。佐剂举例但不限于氢氧化铝,氟氏完全佐剂。离子强度增强剂举例但不限于氯化钠。

[0043] 根据本发明,术语“色谱层析”包括但不限于:离子交换色谱(例如阳离子交换色谱)、疏水相互作用色谱、吸附层析法(例如羟基磷灰石色谱)、凝胶过滤(凝胶排阻)层析、亲和层析法。

[0044] 根据本发明,本发明的截短 HPV11L1 蛋白优选如下获得:将表达有截短 HPV11L1 蛋白的大肠杆菌在盐浓度为 100-600mM,优选 200-500mM 的缓冲液中进行破碎,分离破碎溶液,得到上清液,用水或低浓度盐(通常低于破碎用的盐浓度)降低所得上清液中盐浓度至盐浓度 100mM-0M,分离盐浓度低至 100mM-0 的上清液中的沉淀;将沉淀在含还原剂及盐浓度 150-2000mM 优选 200mM 以上的溶液中重新溶解,分离,得到纯度至少为 50%,优选至少 70%,更优选至少 80%的截短 HPV11L1 蛋白溶液。

[0045] 根据本发明,在本发明获得的截短 HPV11L1 蛋白的方法中,缓冲液是指可在一定范围内维持 pH 值稳定的溶液,包括但不限于,Tris 缓冲液,磷酸盐缓冲液,HEPES 缓冲液,MOPS 缓冲液等等。

[0046] 根据本发明,所述原核宿主细胞破碎包括但不限于通过匀浆器破碎、均质机破碎、超声波处理、研磨、高压挤压、溶菌酶处理中的一项或者多项方法来实现;

[0047] 根据本发明,在本发明获得的截短 HPV11L1 蛋白的方法中,所用的盐包括但不限于中性盐,特别是碱金属盐、铵盐、盐酸盐、硫酸盐,硫酸盐,碳酸氢盐,磷酸盐或磷酸氢盐,特别是 NaCl、KCl、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄中的一种或几种。优选 NaCl。所用的还原剂包括但不限于 DTT,2-巯基乙醇。所用量包括但不限于 10mM-100mM。

[0048] 根据本发明,本发明的截短 HPV11L1 蛋白类病毒颗粒如下获得:将上述纯度至少 50%的截短 HPV11L1 蛋白溶液通过例如色谱层析进一步分离,得到纯化的截短 HPV11L1 蛋白溶液。去除纯化的截短 HPV11L1 蛋白溶液中的还原剂,得到截短 HPV11L1 的类病毒颗粒。去除还原剂的方式包括但不限于本领域已知技术,例如,透析,超滤或者层析等。

[0049] 根据本发明,本发明的截短 HPV11L1 蛋白优选具有序列 1。

[0050] 根据本发明,本发明的疫苗可采用患者可接受的形式,包括但不限于口服或者注射,优选注射。

[0051] 根据本发明,本发明疫苗优选单位剂型使用,其中单位剂型中截短 HPV11L1 蛋白类病毒颗粒的量为 $5\ \mu\text{g}$ - $80\ \mu\text{g}$,优选 $20\ \mu\text{g}$ - $40\ \mu\text{g}$ 。

[0052] 有益效果

[0053] 目前 HPV 类病毒颗粒的制备所采用的表达系统可以分为真核表达系统和原核表达系统。

[0054] 在真核表达系统中所表达的 HPVL1 蛋白天然构象破坏少,能自发的形成 VLP,往往只需进行简单的纯化过程即可获得具有正确构象的 VLP。但目前真核表达系统所采用的杆状病毒表达系统及酵母表达系统均有表达量低,培养成本高等缺陷,给大规模工业化生产带来了极大困难。

[0055] 在原核表达系统中,大肠杆菌表达系统具有培养成本低,表达量大的优点。但在大肠杆菌表达系统中表达的 HPVL1 蛋白往往失去正确天然构象,以包含体形式表达于沉淀中。目前对表达于包含体中蛋白进行复性依然是一个世界性难题。复性困难,效率低下,使得从包含体中获得有正确构象的 VLP 在大规模生产中难以实施,只能局限于小规模实验室研究中。虽然 HPVL1 也可以正确构象可溶性形式表达于大肠杆菌裂解上清中,但是表达量低下,而且要从大肠杆菌裂解上清中种类繁多的可溶性蛋白纯化出 HPVL1 蛋白也相当困难,往往需要借助融合表达及亲和层析等手段进行纯化,以上手段往往需要昂贵的酶,难以进行工业化生产。

[0056] 本发明在大肠杆菌表达系统中表达 N 端截短 HPV11L1 蛋白,并且采用温和的手段选择性沉淀表达在大肠杆菌裂解上清中的 HPV11L1 蛋白,进一步采用含盐缓冲液重溶 HPV11L1 蛋白,使得在保持 HPV11L1 蛋白正确构象前提下使其纯度有了显著提高且重溶后的目的蛋白可以直接进行离子交换层析及疏水交换层析纯化获得纯蛋白。通过以上步骤获得纯化后的截短 HPV11L1 截短蛋白可以组装为类病毒颗粒,具有良好的免疫原性,可以诱导高滴度的针对 HPV11 的中和抗体,预防 HPV11 对人体的感染,是一种良好的疫苗形式。此外,本发明中采用的截短 HPV11L1 蛋白在保留全长 HPV11L1 蛋白的抗原性及颗粒组装能力的同时,易于在大肠杆菌表达系统中表达,所采用的纯化方法无需使用昂贵的酶,成本低廉。而且目的蛋白在纯化过程中构象没有经过剧烈的变性复性过程,损失小,可应用于大规模工业化生产。

[0057] 在参考下列详述和附图后,本发明的这些和其它方面将是显然的。此处公开的所有参考文献在此均完整引用作为参考。

附图说明

[0058] 图 1 显示了在本发明方法步骤 a)-d) 过程中不同阶段 HPV11N4C-L1 蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。1,裂解上清;2,经过切向流沉淀的 HPV11N4C-L1;3,经重悬液重悬的 HPV11N4C-L1。结果显示,HPV11N4C-L1 蛋白在通过沉淀,复溶的步骤之后,纯度达到了约 70%左右。

[0059] 图 2 显示了步骤 d) 中所得的 HPV11N4C-L1 进一步经本发明步骤 e) 纯化后的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。1,经本发明步骤 e) 纯化所得 HPV11N4C-L1 上样 $10\ \mu\text{l}$;2,经本

发明步骤 e) 纯化所得 HPV11N4C-L1 上样 20 μ l。结果显示,经过步骤 e) 纯化的 HPV11N4C-L1 蛋白纯度达到了 98% 左右。

[0060] 图 3 显示了步骤 f) 中所得的 HPV11N4C-L1 类病毒颗粒透射电镜观察 (50,000 倍) 结果。视野中可见大量半径为 25nm 左右的类病毒颗粒,颗粒大小与理论大小相符,均匀一致。

[0061] 图 4 显示了步骤 f) 中所得的 HPV11N4C-L1 类病毒颗粒的动态光散射观测结果。HPV11N4C-L1 类病毒颗粒的水化分子动力学半径为 27.19nm,颗粒组装百分比为 96.7%。

[0062] 图 5 显示了 HPV11N4C-L1 类病毒颗粒接种兔后不同阶段血清中和抗体滴度。图中箭头所示为免疫时间。在加强后一至二个月后,中和抗体的滴度能达到 10^5 的较高水平。

[0063] 图 6 显示了实施例 5 中 HPV6/11 二价疫苗接种小鼠后不同时间的血清中 HPV6, HPV11 中和抗体滴度变化情况。免疫程序为 0,2W(周)。第一次免疫后,HPV6, HPV11 中和抗体滴度即有明显上升,在经过一次加强免疫后,抗体的滴度即能达到 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 。

[0064] 图 7 显示了实施例 5 中 HPV6/11/16/18 四价疫苗接种小鼠后不同时间的血清中 HPV6, HPV11, HPV16, HPV18 中和抗体滴度变化情况。免疫程序为 0,2W(周)。第一次免疫后,HPV6, HPV11, HPV16, HPV18 中和抗体滴度即有明显上升,在经过一次加强免疫后,抗体的滴度即能达到 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 。

[0065] 图 8 显示了在本发明方法步骤 a)-e) 中 N 端分别截短了 3 个、5 个、或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白 HPV11N3C-L1、HPV11N5C-L1、HPV11N6C-L1 (其氨基酸序列分别见 SEQ ID NO: 2、3、4) 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。1,分子量 Marker ;2,经本发明步骤 a)-e) 纯化所得 HPV11N3C-L1 上样 10 μ l ;3,经本发明步骤 a)-e) 纯化所得 HPV11N5C-L1 上样 10 μ l ;4,经本发明步骤 e) 纯化所得 HPV11N6C-L1 上样 10 μ l ;结果显示,N 端截短了 3 个、5 个、或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白 HPV6N2C-L1、HPV11N3C-L1、HPV11N5C-L1 经过步骤 a)-e) 处理,蛋白纯度均达到了 95% 左右。

[0066] 图 9 显示了经过步骤 a)-f) 所得的 N 端分别截短了 3 个、5 个、或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白 HPV11N3C-L1、HPV11N5C-L1、HPV11N6C-L1 类病毒颗粒透射电镜观察 (50,000 倍) 结果。1,经过步骤 a)-f) 所得的 HPV11N3C-L1 类病毒颗粒 ;2,经过步骤 a)-f) 所得的 HPV11N5C-L1 类病毒颗粒 ;3 经过步骤 a)-f) 所得的 HPV11N6C-L1 类病毒颗粒 ;结果显示,视野中可见大量半径为 25nm 左右的类病毒颗粒,颗粒大小与理论大小相符,均匀一致。

[0067] 图 10 显示了经过步骤 a)-f) 所得的 N 端分别截短了 3 个、5 个、或 6 个氨基酸的 HPV11L1 蛋白 HPV11N3C-L1、HPV11N5C-L1、HPV11N6C-L1 类病毒颗粒的动态光散射观测结果。1,经过步骤 a)-f) 所得的 HPV11N3C-L1 类病毒颗粒动态光散射观测结果 ;2,经过步骤 a)-f) 所得的 HPV11N5C-L1 类病毒颗粒动态光散射观测结果 ;3,经过步骤 a)-f) 所得的 HPV11N6C-L1 类病毒颗粒动态光散射观测结果 ;结果显示,HPV11N3C-L1、HPV11N5C-L1、HPV11N6C-L1 类病毒颗粒的水化分子动力学半径 25nm 左右,颗粒组装百分比在 80% 以上。

[0068] 序列

[0069]

序列 1 (SEQ ID NO: 1):

1 MSDSTVYVPP PNPVSKVVAT DAYVKRTNIF YHASSSRLLA VGHPYYSIKK VNKTVPKVS
61 GYQYRVFKVV LPDPNKFALP DSSLFDPTTQ RLVWACTGLE VGRGQPLGVG VSGHPLLNKY
121 DDVENSAGYG GNPQDNRVN VGMDYKQTQL CMVGCAPPLG EHWGKGTQCS NTSVQNGDCP
181 PLELITSVIQ DGDMVDTGFG AMNFADLQTN KSDVPLDICG TVCKYPDYLQ MAADPYGDRL
241 FFYLRKEQMF ARHFFNRAGT VGEVPPDILL VKGGNNRSSF ASSIYVHTPS GSLVSSEAQL
301 FNKPYWLQKA QGHNNGICWG NHLFVTVVDT TRSTNMTLCA SVSKSATYTN SDYKEYMRHV
361 EFDLQFIFQ LCSITLSAEV MAYIHTMNPS VLEDWNFGLS PPPNGTLEDT YRYVQSQAIT
421 CQKPTPEKEK QDPYKDMSEW EVNLKEKFSS ELDQFPLGRK FLLQSGYRGR TSARTGIKRP
481 AVSKPSTAPK RKRTKTKK

序列 2 (SEQ ID NO: 2):

1 MPDSTVYVPP PNPVSKVVA TDAYVKRTNI FYHASSSRLA AVGHPYYSIK KVNKTVPKVS
61 SGYQYRVFKV VLPDPNKFAL PDSSLFDPTT QRLVWACTGL EVGRGQPLGV VSGHPLLNK

[0070]

121 YDDVENSGGY GGNPGQDNRV NVGMDYKQTQ LCMVGCAPPL GEHWGKGTQC SNTSVQNGDC
 181 PPLELITSVI QDGMVDTGF GAMNFADLQT NKSDVPLDIC GTVCKYPDYL QMAADPYGDR
 241 LFFYLRKEQM FARHFFNRAG TVGEPVDDL LVKGGNRRSS VASSIYVHTP SGLSVSSEAQ
 301 LFNKPYWLQK AQGHNNICW GNHLFVTVVD TTRSTNMTLC ASVSKSATYT NSDYKEYMRH
 361 VBBFDLQFIF QLCSTITLSAE VMAYIHTMNP SVLEDWNFGL SPPPNGTLED TYRYVQSQAI
 421 TCQKPTPEKE KQDPYKMSF WEVNLKEKFS SELDQFPLGR KFLQSGYRG RTSARTGIKR
 481 PAVSKPSTAP KRKRTKTK

序列 3 (SEQ ID NO: 3):

1 MDSTVYVPPP NPVSKVVATD AYVKRTNIFY HASSRLLAV GHPYYSIKKV NKTVPKVSQ
 61 YQYRVFKVVL PDPNKFALPD SSLFDPTTQR LVWACTGLEV GRGQPLGVGV SGHPLLKNDYD
 121 DVENSGGYGG NPGQDNRVNV GMDYKQTQLC MGCAPPLGE HWGKGTQCSN TSVQNGDCPP
 181 LELITSVIQD GDMVDTGFGA MNFADLQTNK SDVPLDICGT VCKYPDYLQM AADPYGDRLF
 241 FYLRKEQMFA RHFFNRAGTV GEPVDDLVLV KGGNRRSSVA SSIYVHTPSG SLVSSEAQLF
 301 NKPYWLQKAQ GHNNICWGN HLFVTVVDTT RSTNMTLCAS VSKSATYTNS DYKEYMRHVE
 361 EFDLQFIFQL CSITLSAEVM AYIHTMNPSV LEDWNFGLSP PPNGTLEDY RYVQSQAITC
 421 QKPTPEKEKQ DPYKMSFWE VNLKEKFSSE LDQFPLGRKF LLQSGYRGRT SARTGIKRPA
 481 VSKPSTAPKR KRTKTK

序列 4 (SEQ ID NO: 4):

1 MSTVYVPPP PVSKVVATDA YVKRTNIFYH ASSRLLAVG HPYYSIKKVN KTVVPKVSQY
 61 QYRVFKVVL DPNKFALPDS SLFDPTTQRL VWACTGLEVG RGQPLGVGVSG GHPLLKNDYD
 121 VENSGGYGGN PGQDNRVNVG MDYKQTQLCM VGCAPPLGBH WGKGTQCSNT SVQNGDCPPL
 181 ELITSVIQDG DMVDTGFGAM NFADLQTNKS DVPLDICGTV CKYPDYLQMA ADPYGDRLFF
 241 YLRKEQMFAR HFFNRAGTVG EPVDDLVLV KGGNRRSSVAS SIYVHTPSGS LVSSEAQLFN
 301 KPYWLQKAQG HNNICWGNH LFTVTVDTTR STNMTLCASV SKSATYTNSD YKEYMRHVEE
 361 FDLQFIFQLC SITLSAEVMA YIHTMNPSVL EDWNFGLSPP PNGTLEDYR YVQSQAITCQ
 421 KPTPEKEKQD PYKMSFWEV NLKEKFSSEL DQFPLGRKFL LQSGYRGRTS ARTGIKRPAV
 481 SKPSTAPKRK RTKTKK

序列 5 (SEQ ID NO: 5):

1 ATGTGGCGGC CTAGCGACAG CACAGTATAT GTGCCTCCTC CCAACCCTGT ATCCAAGGTT
 61 GTTGCCACGG ATGCGTATGT TAAACGCACC AACATATTTT ATCACGCCAG CAGTTCTAGA
 121 CTCCTTGCTG TGGGACATCC ATATTACTCT ATCAAAAAAG TTAACAAAAC AGTTGTACCA
 181 AAGGTGTCTG GATATCAATA TAGAGTGTIT AAGGTAGTGT TGCCAGATCC TAACAAGTTT
 241 GCATTACCTG ATTCATCTCT GTTTGACCCC ACTACACAGC GTTTAGTATG GCGGTGCACA
 301 GGGTTGGAGG TAGGCAGGGG TCAACCTTTA GCGGTGGTG TTAGTGGGCA TCCATTGCTA
 361 AACAAATATG ATGATGTAGA AAATAGTGGT GGGTATGGTG GTAATCCTGG TCAGGATAAT
 421 AGGGTTAATG TAGGTATGGA TTATAAACA ACCCAGCTAT GTATGGTGGG CTGTGCTCCA
 481 CCGTTAGGTG AACATTGGGG TAAGGGTACA CAATGTTCAA ATACCTCTGT ACAAATGGT
 541 GACTGCCCCC CGTTGGA ACT TATTACCAGT GTTATACAGG ATGGGGACAT GGTGATACA
 601 GGCTTTGGTG CTATGAATTT TGCAGACTTA CAAACCAATA AATCGGATGT TCCCCTTGAT
 661 ATTTGTGGAA CTGTCTGCAA ATATCCTGAT TATTTGCAA TGGCAGCAGA CCCTTATGGT
 721 GATAGTTGT TTTTTATTT GCGAAAGGAA CAAATGTTG CTAGACACTT TTTAATAGG
 781 GCCGCTACTG TGGGGGAACC TGTGCCTGAT GACCTGTTGG TAAAAGGGGG TAATAATAGA
 841 TCATCTGTAG CTAGTAGTAT TTATGTACAT ACACCTAGTG GCTCATTGGT GTCTCAGAG
 901 GCTCAATTAT TTAATAAACC ATATTGGCTT CAAAAGGCTC AGGGACATAA CAATGGTATT
 961 TGCTGGGGAA ACCACTTGTT TGTTACTGTG GTAGATACCA CACGCAGTAC AAATATGACA
 1021 CTATGTGCAT CTGTGTCTAA ATCTGCTACA TACACTAATT CAGATTATAA GGAATACATG
 1081 CGCCATGTGG AAGAGTTTGA TTTACAGTTT ATTTTCAAT TGTGTAGCAT TACATTATCT
 1141 GCAGAAGTCA TGGCCTATAT ACACACAATG AATCCTTCTG TTTTGGAGGA CTGGAACCTT
 1201 GGTATATCGC CTCCACCAA TGGTACACTG GAGGATACTT ATAGATATGT ACAGTCACAG
 1261 GCCATTACCT GTCAGAAACC CACACCCGAA AAAGAAAAAC AGGACCCCTA TAAGGATATG
 1321 AGTTTTTGGG AGGTTAACTT AAAAGAAAAG TTTTCTTATG AATTAGATCA GTTTCCCTT
 1381 GGACGTAAGT TTTTATTGCA AAGTGGATAT CGAGGACGGA CGTCTGCTCG TACAGGTATA
 1441 AAGCGCCAG CTGTGTCTAA GCCCTCTACA GCCCCAAAC GAAAACGTAC CAAAACCAGA
 1501 AAGTAA

[0071]

序列: 6 (SEQ ID NO: 6)

```

1      ATGAGCGACA GCACAGTATA TGTGCCTCCT CCCAACCCCTG TATCCAAGGT TGTGGCCACG
61     GATGCGTATG TTAACGCGAC CAACATATTT TATCAGCCA GCAGTTCTAG ACTCCTTGCT
121    GTGGGACATC CATATTACTC TATCAAAAAA GTTAACAAAA CAGTTGTACC AAAGGTGTCT
181    GGATATCAAT ATAGAGTGTT TAAGGTAGTG TTGCCAGATC CTAACAAGTT TGCATTACCT
241    GATTCATCTC TGTTTGACCC CACTACACAG CGTTTAGTAT GGGCGTGCAC AGGGTTGGAG
301    GTAGGCAGGG GTCAACCTTT AGGCGTTGGT GTTAGTGGG ATCCATTGCT AAACAAATAT
361    GATGATGTAG AAAATAGTGG TGGGTATGGT GGTAATCCTG GTCAGGATAA TAGGGTTAAT
421    GTAGGTATGG ATTATAAACA AACCCAGCTA TGTATGGTGG GCTGTGCTCC ACCGTTAGGT
481    GAACATTGGG GTAAGGGTAC ACAATGTTCA AATACCTCTG TACAAAATGG TGA CTGCCCC
541    CCGTTGGAAC TTATTACCAG TGT TATACAG GATGGGGACA TGGTTGATAC AGGCTTTGGT
601    GCTATGAATT TTGCAGACTT ACAAACCAAT AAATCGGATG TTCCCCTTGA TATTTGTGGA
661    ACTGTCTGCA AATATCCTGA TTATTTGCAA ATGGCAGCAG ACCCTTATGG TGATAGGTTG
721    TTTTTTTATT TGC GAAAGGA ACAAATGTTT GCTAGACACT TTTTAAATAG GGCCGGTACT
781    GTGGGGGAAC CTGTGCCTGA TGACCTGTTG GTAAAAGGGG GTAATAATAG ATCATCTGTA
841    GCTAGTAGTA TTTATGTACA TACACCTAGT GGCTCATTGG TGTCTTCAGA GGCTCAATTA
901    TTTAATAAAC CATATTGGCT TCAAAGGCT CAGGGACATA ACAATGGTAT TTGCTGGGGA
961    AACCCTTGT TTGTTACTGT GGTAGATACC ACACGCAGTA CAAATATGAC ACTATGTGCA
1021   TCTGTGTCTA AATCTGCTAC ATACACTAAT TCAGATTATA AGGAATACAT GCGCCATGTG
1081   GAAGAGTTTG ATTTACAGTT TATTTTTCAA TTGTGTAGCA TTACATTATC TGCAGAAGTC
1141   ATGGCCTATA TACACACAAT GAATCCTTCT GTTTTGGAGG ACTGGA ACTT TGGTTTATCG
1201   CCTCCACCAA ATGGTACACT GGAGGATACT TATAGATATG TACAGTCACA GGCCATTACC
1261   TGTCAGAAAC CCACACCCGA AAAAGAAAAA CAGGACCCCT ATAAGGATAT GAGTTTTTGG
1321   GAGGTTAACT TAAAAGAAAA GTTTTCTTAT GAATTAGATC AGTTTCCCCT TGGACGTAAG
1381   TTTTTATTGC AAAGTGGATA TCGAGGACGG ACGTCTGCTC GTACAGGTAT AAAGCGCCCA
1441   GCTGTGTCTA AGCCCTCTAC AGCCCCAAA CGAAAACGTA CAAAACCAG AAAGTAA

```

[0072] 下面结合实施例对本发明进一步举例描述。这些实施例是非限制性的。

[0073] 实施例 1 :具有序列 1 的截短 HPV11L1 蛋白的表达

[0074] 用做模板之 HPV11L1 基因片段的制备

[0075] HPV11L1 基因全长由上海博亚公司合成。所合成的基因片段全长为 1506bp, 其序列为序列 5。在此人工合成的 HPV11L1 基因全长片段的基础上制备本发明截短 HPV11L1 蛋白之模板。

[0076] 截短 HPV11L1 基因的非融合表达载体的构建

[0077] 以前一步骤所合成的 HPV11L1 全长基因片段用做再次 PCR 反应的模板。以 11N4F : 5' -CAT ATg AGC GAC AGC ACA GTA TAT GTG-3' (SEQ ID NO :10) 为正向引物, 其 5' 端引入限制性内切酶 NdeI 位点, Nde I 位点序列为 CAT ATG, ATG 为大肠杆菌系统中的起始密码子 ;6CR :5' -GTC GAC TTA CTT TCT GGT TTT GGT ACG TTT-3' (SEQ ID NO :11) 为反向引物, 其 5' 端引入限制型内切酶 SalI 位点。在 PCR 热循环仪 (Biometra T3) 按照如下条件进行 PCR 反应 :

[0078]

94℃变性 5min	1 个循环
94℃变性 50sec	25 个循环
57℃退火 50sec	
72℃延伸 2min	
72℃延伸 10min	1 个循环

[0079] 扩增得到 1.5kb 左右大小特异的 DNA 片段。将该 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体 (TAKARA 公司生产) 连接, 经 NdeI/SalI 酶切鉴定, 得到插入截短 HPV11L1 基因的阳性克隆 pMD 18-T-HPV11N4C-L1。

[0080] 在上海博亚生物工程公司, 利用 M13(+)/(-) 引物, 测得 pMD18-T-HPV11N4C-L1 质粒中插入的目的核苷酸序列为序列 6 (SEQ ID NO :6)。其编码的氨基酸序列即为序列 1 (SEQ ID NO :1): 该序列对应的蛋白质为为 N 端被截短 4 个氨基酸、C 端未被截短的 HPV11L1 蛋白, 命名为 HPV11N4C-L1。

[0081] 将上述的 pMD 18-T-HPV11N4C-L1 质粒, 经 NdeI/SalI 酶切, 获得截短的 HPV11N4C-L1 基因片段。再将该片段与经 NdeI/SalI 酶切的非融合表达载体 pT0-T7 (罗文新等, 生物工程学报, 2000, 16 :53-57) 相连接, NdeI/SalI 酶切鉴定得到插入 L1 蛋白基因的阳性表达克隆 pT0-T7-HPV11N4C-L1。取 1 μL 的 pT0-T7-HPV11N4C-L1 质粒 (0.15mg/ml) 转化 40 μL 的氯化钙法制备的感受态大肠杆菌 ER2566 (购自新英格兰生物实验室公司), 涂布于卡那霉素 (终浓度 25mg/mL, 下同) 抗性的固体 LB 培养基, 37℃ 静置培养 10-12 小时至单菌落清晰可辨。挑取单个菌落, 挑取单菌落至含 4mL 卡那霉素抗性的液体 LB 培养基之试管, 37℃ 220 转 / 分振荡培养 10 小时, 从中取 1mL 菌液于 -70℃ 冻干保存。

[0082] HPV11N4C-L1 的大量表达

[0083] 从 -70℃ 中取出带有重组质粒 pT0-T7-HPV11N4C-L1 的大肠杆菌冻干菌种, 用少量无菌水溶解, 接入卡那霉素抗性的 50mL LB 培养基中。200rpm、37℃ 培养大约 8 小时, 而后将其转接入 10 瓶 500mL LB 培养基中, 每瓶接入 5mL 菌液, 200rpm、30℃ 摇瓶培养过夜, 作为种子液。

[0084] LB 培养基配方:

[0085] 蛋白胨: 10g

[0086] 酵母抽提物: 5g

[0087] NaCl: 10g

[0088] 将以上成份溶解于 1000mL 去离子水中, 用 NaOH 调节 pH 值至 7.2, 121℃ 灭菌 30min, 冷却至 50℃。

[0089] 采用上海保兴生物公司 50L 发酵罐进行大规模培养。校正发酵罐 PH 电极, 配制 30L LB 培养基装入发酵罐, 原位 121℃ 灭菌 30min, 校正溶氧电极, 以灭菌后未通气前为零点, 以发酵时通气后未接种前初始搅拌速度 100rpm 时为 100%。

[0090] 补料准备: 配制浓度为 30% (20g 蛋白胨、10g 酵母膏溶至 100ml) 的蛋白胨和酵母膏混合物, 50% 葡萄糖 (50g 溶至 100ml), 121℃ 灭菌 20min。

[0091] 次日将 10 瓶种子液共 5L 接入发酵罐中,设定温度 37℃,PH 值 7.0,手动调节搅拌速度及通气量,维持溶氧在 40%以上。

[0092] 流加补料:将 50%葡萄糖和 30%蛋白胨和酵母膏混合物按溶质质量比 2:1 的比例混合。

[0093] 流加速度如下:

[0094] 100%为 25mL/min

[0095] 第一小时:5%;

[0096] 第二小时:10%;

[0097] 第三小时:20%;

[0098] 第四小时:40%;

[0099] 第五小时以后 60%。

[0100] 当菌浓度达到 OD_{600nm}大约 10 左右时将培养温度降至 25℃,加入 4g IPTG 诱导培养 4 小时。终浓度大约为 60 左右 (OD_{600nm}) 下罐,离心收集菌体,获得表达有 HPV16N30C-L1 蛋白的菌体重大约 2.7kg。

[0101] 实施例 2:纯度约 70%的 HPV11N4C-L1 的获得

[0102] 按 1g 菌体对应 10mL 裂解液 (20mM Tris 缓冲液 pH7.2,300mMNaCl) 的比例重悬菌体,采用 APV 均质机 (An Invensys Group 产品) 以 600bar 压力破碎菌体 5 次。JA-14 转头 13500rpm(30000g),离心 15min,留取上清,通过 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,此时上清中 HPV11N4C-L1 的纯度约为 10%。采用 CENTRASETTE 5 切向流装置 (PALL 产品) 对上清进行透析,所用膜包截留分子量为 30kDa,透析液为 10mM 磷酸缓冲液 pH 6.0 缓冲液,透析体积为三倍上清体积,运行时压力为 0.5psi,流速为 500mL/min,切向流速为 200mL/min。透析充分后,JA-10 转头 (Beckman J25 高速离心机)9500rpm(12000g),20min 离心收获沉淀,用 1/10 上清体积的 10mM 磷酸缓冲液 pH8.0,10mM DTT,300mM NaCl 重悬沉淀,搅拌 30min。JA-14 转头 (Beckman J25 高速离心机),13500rpm(30000g),离心 20min,离心得上清,使用 0.22 μm 孔径滤膜过滤样品,以该样品进行下一步的阳离子交换色谱纯化。取 150 μL 过滤后样品,加入 6X Loading Buffer 30 μL。混匀,于 80℃水浴 10min 后取 10 μL 于 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶中以 120V 电压电泳 120min。随后以考马斯亮兰染色显示电泳条带,电泳结果见图 1。通过 SDS-PAGE 分析可知 HPV11N4C-L1 蛋白在通过沉淀、复溶的步骤之后,目的蛋白得到了纯化和富集,纯度达到了约 70%左右。

[0103] 实施例 3:HPV11N4C-L1 的色谱纯化

[0104] HPV11N4C-L1 的阳离子交换色谱纯化

[0105] 仪器系统:GE Healthcare 原 Amershan Pharmacia 公司生产的 AKTA explorer 100 型制备型液相色谱系统。

[0106] 层析介质:SP Sepharose 4 Fast Flow。

[0107] 柱体积:5.5cm×20cm。

[0108] 缓冲液:20mM 磷酸缓冲液 pH8.0,10mM DTT

[0109] 20mM 磷酸缓冲液 pH8.0 10mM DTT 2M NaCl。

[0110] 流速:25mL/min

[0111] 检测器波长:280nm

- [0112] 样品为 3L 纯度约为 70% HPV11N4C-L1 溶液
- [0113] 洗脱程序为 :200mM NaCl 洗脱杂蛋白,800mM NaCl 洗脱目的蛋白,收集 500mM NaCl 洗脱产物,共获得 HPV11N4C-L1 纯化样品 700mL。
- [0114] HPV11N4C-L1 的 CHT-II(羟基磷灰石色谱)纯化
- [0115] 仪器系统 :GE Healthcare 原 Amersham Pharmacia 公司生产的 AKTA explorer 100 型制备型液相色谱系统。
- [0116] 层析介质 :CHT-II(购自 Bio-RAD)
- [0117] 柱体积 :5.5cm×20cm
- [0118] 缓冲液 :10mM 磷酸缓冲液 pH7.0,10mM DTT,0.5M NaCl。
- [0119] 流速 :20mL/min。
- [0120] 检测器波长 :280nm。
- [0121] 样品为 :SP Sepharose 4 Fast Flow 500mM NaCl 洗脱产物
- [0122] 洗脱程序为 :直接收取含目的蛋白的穿透
- [0123] 收集穿透产物,获得纯化的 HPV11N4C-L1 样品 300mL。取经本实施例方法纯化的 HPV11N4C-L1 样品 150 μ L,加入 6X Loading Buffer30 μ L 混匀,于 80℃ 水浴 10min 后取 10 μ L 于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中以 120V 电压电泳 120min。随后以考马斯亮兰染色显示电泳条带,电泳结果见图 2。由电泳结果可知,目的蛋白浓度约为 0.3mg/ml,SDS-PAGE 考染纯度大于 98%。
- [0124] 实施例 4 :HPV11N4C-L1 类病毒颗粒的组装
- [0125] 仪器系统为 PALL 生产的 CENTRASETTE 5 切向流系统 ;膜包截留分子量为 30kDa ;样品为实施例 3 所得 HPV11N4C-L1 300ml。
- [0126] 样品的浓缩 :调节系统切向流速为 50mL/min,浓缩样品至总体积为 800mL。
- [0127] 样品的复性 :以 10L 复性缓冲液 (20mM PB pH 6.0,2mM CaCl₂,2mM MgCl₂,0.5M NaCl,0.003% Tween-80) 充分交换样品缓冲液。切向流装置运行时压力为 0.5psi,切向流速为 10mL/min,待复性缓冲液交换完后,改为储存缓冲液 (20L PBS :20mM PB pH 6.5,0.5M NaCl) 进行交换,交换体积为 20L。运行时压力为 0.5psi,切向流速为 25mL/min。待所有液体交换完毕后,使用 PALL 0.20 μ m 滤器无菌过滤样品,即得 HPV11N4C-L1 类病毒颗粒,将其置于 4℃ 保存备用。
- [0128] 实施例 5 :HPV11N4C-L1 类病毒颗粒的形态学检测
- [0129] HPV11N4C-L1 类病毒颗粒透射电镜观察
- [0130] 仪器为日本电子公司生产的 100kV 透射电镜,放大倍数为 100,000 倍。HPV11N4C-L1 类病毒颗粒经 2% 磷钨酸 pH7.0 负染,固定于喷炭的铜网上进行观察。结果如图 3,可见实施例 4 所得样品大量半径为 25nm 左右的类病毒颗粒,大小均匀,呈现为空心形态。
- [0131] HPV11N4C-L1 类病毒颗粒动态光散射观察
- [0132] 仪器为美国 Protein Solutions 公司生产的 DynaPro MS/X 型动态光散射仪 (含温度控制器),使用算法为 Regulation 算法。样品为实施例 4 所得样品。样品经 0.22 μ m 滤膜过滤后进行测量。测量结果见图 4。结果显示 HPV11N4C-L1 VLP 的水化分子动力学半径为 27.19nm。颗粒组装百分比为 96.7%。

[0133] HPV11 假病毒中和细胞模型的建立

[0134] 由于 HPV 难以在体外进行培养,而且 HPV 宿主特异性强,难以在人以外的宿主上繁殖,缺乏合适的动物模型。因此,为了能对 HPV 疫苗的免疫保护性进行快速评估,需要建立有效体外中和实验模型。

[0135] 假病毒 (pseudovirions) 体外感染模型:利用了 HPV VLP 可非特异包装核酸的特性,通过在细胞内表达 HPV 的 L1 和 L2 蛋白,通过包裹细胞内的游离体病毒 DNA 或外源导入的报告质粒组成 HPV 假病毒。(Yeager, M. D, Aste-Amezaga, M. et al (2000) Virology (278) 570-7) 具体方法有重组病毒表达系统法及多质粒共转染方法。

[0136] 本发明采用的多质粒共转染方法,并且针对 HPV 系统采取了如下的改进:建立了对 293FT 细胞的优化的磷酸钙转染方法,可获得高达 90% 以上的转染效率,有利于进行较大规模的生产。获得了密码子优化的 HPV 结构蛋白的表达质粒,其可在哺乳动物细胞中高效表达 HPV L1 和 L2 基因,有利于高效组装假病毒。

[0137] HPV 假病毒的构建

[0138] 用 CsCl 密度梯度离心方法分别纯化带有 HPV11L1 基因的质粒 p11L1h、带有 HPV11L2 基因的质粒 p11L2h、及带有绿色荧光蛋白基因的质粒 pN31-EGFP (以上质粒由 NIH 的 John T. Schiller 教授馈赠)。CsCl 密度梯度离心纯化质粒的方法参照《分子克隆:第三版》。简言之:将质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单菌落接种到 500mL LB 培养基中,37°C 摇瓶培养 16 小时。9000g 离 5min,收集菌体。每 1000mL 菌液收获的菌体,依次加入 40mL 溶液 I (50mM 葡萄糖,25mM Tris-Cl (pH8.0),10mM EDTA (pH = 8.0)) 和 2mL RNase A (1 μ g/ μ L),40mL 溶液 II (0.2M NaOH,1% SDS),48mL 溶液 III (5M 乙酸钾 60.0mL,冰乙酸 11.5mL,去离子水 28.5mL)。在冰上放置 10min 后,15000g,4°C 离 20min,取上清与 0.6 倍体积的异丙醇混合,15000g 离心 30min,弃去上清,用 70% 乙醇洗沉淀 1 次,用 TE 溶解沉淀,测定 DNA 含量。在 DNA 溶液中溶入 CsCl (每克 DNA 对应 1.01g CsCl),再溶入 100 μ L 10mg/mL 的溴化乙锭溶液,用 Beckman NVT65 转子,62000rpm,20°C 离心 10hr。用注射器针头收集闭环 DNA 区带,用等体积的异戊醇重复抽提 4 次。加入 3 倍体积的水和 8 倍体积的无水乙醇,20000g,4°C 离心 30min,收集 DNA 沉淀。75% 酒精洗涤 1 次,用 1mL TE 溶解 DNA 沉淀。测定 DNA 溶液的浓度,分装成小份储存于 -20°C。

[0139] 纯化后的 p11L1h、p11L2h、pN31-EGFP 用磷酸钙方法共转染培育于 10cm 细胞培养皿中的 293FT 细胞 (Invitrogen)。磷酸钙转染方法:将 p11L1h、p11L2h、pN31-EGFP 各 40 μ g 加入 1mL 的 HEPES 溶液 (每 50mL 去离子水含有 pH = 7.3 的 1M Hepes 125 μ L,4°C 储存) 和 1mL 的 0.5mol/L CaCl₂ 溶液的混合溶液,混合后逐滴加入 2mL 2 \times HeBS 溶液 (0.28M NaCl (16.36g),0.05M HEPES (11.9g),1.5mM Na₂HPO₄ (0.213g),溶解于 1000mL 去离子水, pH = 6.96,-70°C 储存) 中,室温下静置 1min 后将混合液加入培养有 293FT 细胞的 10cm 细胞培养皿中,6hr 后弃去原培养液,加入 10mL 完全培养液 (invitrogen 公司产品)。转染 48hr 后,弃去培养基,用 PBS 洗 2 次,将细胞刮下收集细胞,细胞计数,每 10⁸ 个细胞用 1mL 裂解液 (0.25% Brij58,9.5mM MgCl₂) 重悬。裂解完成后,5000g 离心 10min,收集上清,加入 5M NaCl (终浓度为 850mM),即为假病毒液,分装为小份后置于 -20°C 保存。

[0140] 将 293FT 细胞 (Invitrogen) 铺于 96 孔细胞培养板中 (1.5 \times 10⁴/孔)。5hr 后进行中和实验,将待测的血清样品分别用 10% DMEM 进行连续倍比稀释,然后取 50 μ L 分别与

50 μ L 稀释于 10% DMEM 的上文制备的假病毒液 (moi = 0.1) 混合。4 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中, 37 $^{\circ}$ C 培养 72h 后先用荧光观察确定各样品大概的中和滴度, 再用流式细胞仪 (EPICS XL, 美国 Beckman Coulter 公司) 检测各孔细胞的感染率, 计算单抗或多抗血清的准确中和滴度。感染率为细胞样品在阳性区中的细胞数量百分率减去未感染的对照细胞样品在阳性区的数量百分率。

[0141] 感染抑制率 = (1 - 阻断孔的感染率 / 未阻断孔的感染率) \times 100%。

[0142] 抗体中和滴度的定义为: 达到高于 50% 感染抑制率的最大稀释倍数。经 50 倍稀释后能达到 50% 以上感染抑制率的单抗或多抗被视为具有中和能力。

[0143] HPV11 VLP 疫苗免疫动物的免疫保护性评价

[0144] 兔: 普通级, 雌性, 6 ~ 8 周龄, 购自广西省疾病预防控制中心, 并在该中心饲养。实施例 4 所制备的 HPV11N4C-L1 类病毒颗粒初免与等量福氏完全佐剂混合, 加强免疫则与等量福氏不完全佐剂混合进行制备, 免疫方式为肌肉注射, 初次免疫剂量为 100 μ g/ 只, 此后分别于 4, 10 周各加强一次, 加强免疫剂量为 50 μ g/ 只。自免疫后, 每周抽取外周静脉血, 分离血清, 保存待检。

[0145] 以上述假病毒中和细胞模型实验评估上述抗血清的中和效价, 如图 5 所示。结果表明, 本发明实施例 4 获得的 HPV11N4C-L1 类病毒颗粒混合配制成为疫苗, 具有良好的免疫原性, 可在动物体内诱导高滴度的中和抗体, 可作为预防 HPV 感染的疫苗。

[0146] HPV6/11 二价疫苗免疫小鼠的免疫保护性评价

[0147] 免疫动物: 4-5 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 4 只, 按本发明实施例 1-4 所述类似方法制备 HPV6N5C-L1 类病毒颗粒。将上述 2 种类病毒颗粒: HPV6N5C-L1 和 HPV11N4C-L1 按 1 : 2 (重量比) 的比例混合, 使得混合后的上述两种病毒颗粒的浓度为 40, 80 μ g/ml。之后, 对于初免, 再加入等体积的福氏完全佐剂与之混合均匀。加强免疫则与等体积福氏不完全佐剂混合进行制备。免疫方式为肌肉注射, 初次免疫剂量为 HPV6N5C-L1 类病毒颗粒 10 μ g/ 只, HPV11N4C-L1 类病毒颗粒 20 μ g/ 只。此后分别于 2 周加强一次, 加强免疫剂量为 HPV6N5C-L1 类病毒颗粒 20 μ g/ 只, HPV11N4C-L1, 类病毒颗粒 40 μ g/ 只。自免疫后, 每周抽取外周静脉血, 分离血清, 按实施例 5 所述方法分别检测免疫小鼠中针对 HPV6, HPV11 假病毒颗粒的中和抗体滴度。检测结果如图 6 所示, 结果表明, 由本发明实施例 1-4 所述方法获得的 HPV6N5C-L1, HPV11N4C-L1 两种类病毒颗粒混合而制备的 HPV6、HPV11 二价疫苗具有良好的免疫原性, 可在动物体内诱导高滴度的针对 HPV6, HPV11 的中和抗体, 可作为预防 HPV6/HPV11 感染的有效疫苗 (除了实施例中所采用的福氏佐剂外, 该疫苗也可由本发明所制备的 HPV16N5C-L1, HPV11N4C-L1 两种类病毒颗粒与商用或自制的氢氧化铝或磷酸铝佐剂混合而成)。

[0148] 上述的 HPV6N5C-L1 类病毒颗粒的 L1 氨基酸序列为 (SEQ IDNO :7) :

[0149]

65	70	75	80
Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Thr			
	85	90	95
Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val Gly Val Ser Gly			
	100	105	110
His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn Ser Gly Ser Gly			
	115	120	125
Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly Met Asp Tyr Lys			
	130	135	140
Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro Leu Gly Glu His			
	145	150	155
Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val Gln Ala Gly Asp			
	165	170	175
Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln Asp Gly Asp Met			
	180	185	190
Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp Leu Gln Thr Asn			
	195	200	205
Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr Cys Lys Tyr Pro			
	210	215	220
Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp Arg Leu Phe Phe			
	225	230	235
Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe Phe Asn Arg Ala			
	245	250	255
Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile Ile Lys Gly Ser			
	260	265	270
Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val Asn Thr Pro Ser			
	275	280	285
Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr Trp			
	290	295	300
Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln			
	305	310	315
Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met Thr Leu			
	325	330	335
Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn Ser Asp Tyr Lys			
	340	345	350
Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln			
	355	360	365
Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Val Ala Tyr Ile His Thr			
	370	375	380
Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Ser Pro Pro			
	385	390	395
Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Gln Ser Gln Ala			
	405	410	415
Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Gln Lys Pro Asp Pro Tyr			
	420	425	430
Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ser			

[0151]

435	440	445	
Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Gly			
450	455	460	
Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys Arg Pro Ala Val			
465	470	475	480
Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala Lys Thr Lys Arg			
485	490	495	

[0152] HPV6/11/16/18 四价疫苗免疫小鼠的免疫保护性评价

[0153] 免疫动物:4-5 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 4 只。按本发明实施例 1-4 所述类似方法制备 HPV6N5C-L1, HPV11N4C-L1, HPV16N30C-L1, 和 HPV18N65C-L1 类病毒颗粒。将上述 4 种类病毒颗粒:HPV6N5C-L1, HPV11N4C-L1, HPV16N30C-L1, HPV18N65C-L1 按 1 : 2 : 2 : 1 (重量比) 的比例混合, 使得混合后的上述四种类病毒颗粒的浓度为 40, 80, 80, 40 $\mu\text{g/ml}$ 。之后, 对于初免, 再加入等体积的福氏完全佐剂与之混合均匀。加强免疫则与等体积福氏不完全佐剂混合进行制备。免疫方式为肌肉注射, 初次免疫剂量为 HPV6N5C-L1, HPV18N65C-L1 类病毒颗粒各 10 $\mu\text{g/}$ 只, HPV11N4C-L1, HPV16N30C-L1 类病毒颗粒各 20 $\mu\text{g/}$ 只。此后分别于 2 周加强一次, 加强免疫剂量为 HPV6N5C-L1, HPV18N65C-L1 类病毒颗粒各 20 $\mu\text{g/}$ 只, HPV11N4C-L1, HPV16N30C-L1 类病毒颗粒各 40 $\mu\text{g/}$ 只。自免疫后, 每周抽取外周静脉血, 分离血清, 按实施例 5 所述方法分别检测免疫小鼠中针对 HPV6, HPV11, HPV16, HPV18 假病毒颗粒的中和抗体滴度。检测结果如图 7 所示, 结果表明, 由本发明实施例 1-4 所述方法获得的 HPV6N5C-L1, HPV11N4C-L1, HPV16N30C-L1, HPV18N65C-L1 四种类病毒颗粒混合而制备的 HPV6、HPV11、HPV16、HPV18 四价疫苗具有良好的免疫原性, 可在动物体内诱导高滴度的针对 HPV6, HPV11, HPV16, HPV18 的中和抗体, 可作为预防 HPV6/HPV11/HPV16/HPV18 感染的有效疫苗 (除了实施例中所采用的福氏佐剂外, 该疫苗也可由本发明所制备的 HPV6N5C-L1, HPV11N4C-L1, HPV16N30C-L1, HPV18N65C-L1 四种类病毒颗粒与商用或自制的氢氧化铝或磷酸铝佐剂混合而成)。

[0154] 上述的 HPV16N30C-L1 类病毒颗粒的 L1 氨基酸序列为 (SEQ IDNO :8) :

[0155]

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

[0156]

	340		345		350										
Lys	Asn	Thr	Asn	Phe	Lys	Glu	Tyr	Leu	Arg	His	Gly	Glu	Glu	Tyr	Asp
	355		360		365										
Leu	Gln	Phe	Ile	Phe	Gln	Leu	Cys	Lys	Ile	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Ile
	370		375		380										
Met	Thr	Tyr	Ile	His	Ser	Met	Asn	Ser	Thr	Ile	Leu	Glu	Asp	Trp	Asn
	385		390		395										400
Phe	Gly	Leu	Gln	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	Tyr	Arg
	405		410		415										
Phe	Val	Thr	Ser	Gln	Ala	Ile	Ala	Cys	Gln	Lys	His	Thr	Pro	Pro	Ala
	420		425		430										
Pro	Lys	Glu	Asp	Pro	Leu	Lys	Lys	Tyr	Thr	Phe	Trp	Glu	Val	Asn	Leu
	435		440		445										
Lys	Glu	Lys	Phe	Ser	Ala	Asp	Leu	Asp	Gln	Phe	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys
	450		455		460										
Phe	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Glu	Ala	Lys	Pro	Lys	Phe	Thr	Leu	Gly
	465		470		475										480
Lys	Arg	Lys	Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Ala	Lys
	485		490		495										
Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Leu										

500

[0157] 上述的 HPV18N65C-L1 类病毒颗粒的 L1 氨基酸序列为 (SEQ IDNO :9) :

[0158]

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

[0159]

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

[0160] 上述的 HPV6N5C-L1 类病毒颗粒的 L1 氨基酸序列显示如上 (SEQ IDNO :7)。

[0161] 实施例 6 :

[0162] 依据本发明实施例 1-5 所采用的技术,制备具有序列 2,3,4 的截短 HPV11L1 蛋白,以上截短蛋白均可纯化得到纯度达到 98% 以上的蛋白,组装为半径 25nm 左右的类病毒颗粒。结果见图 8、图 9 和图 10。

[0163] 序列表

[0164]

Gly Gly Asn Asn Arg Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Tyr Val His Thr
 275 280 285
 Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn Lys Pro
 290 295 300
 Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly
 305 310 315 320
 Asn His Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met
 325 330 335
 Thr Leu Cys Ala Ser Val Ser Lys Ser Ala Thr Tyr Thr Asn Ser Asp
 340 345 350
 Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Phe Asp Leu Gln Phe Ile
 355 360 365
 Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala Tyr Ile
 370 375 380
 His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Ser
 385 390 395 400
 Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Gln Ser
 405 410 415
 Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys Gln Asp
 420 425 430
 Pro Tyr Lys Asp Met Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe
 435 440 445
 Ser Ser Glu Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln
 450 455 460
 Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Thr Ser Ala Arg Thr Gly Ile Lys Arg Pro
 465 470 475 480
 Ala Val Ser Lys Pro Ser Thr Ala Pro Lys Arg Lys Arg Thr Lys Thr
 485 490 495
 Lys Lys

<210> 2

<211> 499

<212> PRT

<213> 人工

<400> 2

Met Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Lys Arg Thr Asn Ile Phe Tyr
 20 25 30
 His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Tyr Ser
 35 40 45
 Ile Lys Lys Val Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly Tyr Gln
 50 55 60
 Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Ala Leu
 65 70 75 80

[0166]

Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu
 450 455 460
 Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Thr Ser Ala Arg Thr Gly Ile Lys Arg
 465 470 475 480
 Pro Ala Val Ser Lys Pro Ser Thr Ala Pro Lys Arg Lys Arg Thr Lys
 485 490 495
 Thr Lys Lys

<210> 3
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> 人工
 <400> 3

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

[0168]

Ala Gly Thr Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Asp Leu Leu Val Lys Gly
 260 265 270
 Gly Asn Asn Arg Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Tyr Val His Thr Pro
 275 280 285
 Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr
 290 295 300
 Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn
 305 310 315 320
 His Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met Thr
 325 330 335
 Leu Cys Ala Ser Val Ser Lys Ser Ala Thr Tyr Thr Asn Ser Asp Tyr
 340 345 350
 Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Phe Asp Leu Gln Phe Ile Phe
 355 360 365
 Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala Tyr Ile His
 370 375 380
 Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Ser Pro
 385 390 395 400
 Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Gln Ser Gln
 405 410 415
 Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys Gln Asp Pro
 420 425 430
 Tyr Lys Asp Met Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser
 435 440 445
 Ser Glu Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser
 450 455 460
 Gly Tyr Arg Gly Arg Thr Ser Ala Arg Thr Gly Ile Lys Arg Pro Ala
 465 470 475 480
 Val Ser Lys Pro Ser Thr Ala Pro Lys Arg Lys Arg Thr Lys Thr Lys
 485 490 495
 Lys

- <210> 4
- <211> 496
- <212> PRT
- <213> 人工
- <400> 4

Met Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro Val Ser Lys Val Val
 1 5 10 15
 Ala Thr Asp Ala Tyr Val Lys Arg Thr Asn Ile Phe Tyr His Ala Ser
 20 25 30
 Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Tyr Ser Ile Lys Lys
 35 40 45
 Val Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly Tyr Gln Tyr Arg Val
 50 55 60

[0169]

Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Ala Leu Pro Asp Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Thr Gly
 85 90 95
 Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val Gly Val Ser Gly His
 100 105 110
 Pro Leu Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn Ser Gly Gly Tyr Gly
 115 120 125
 Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly Met Asp Tyr Lys
 130 135 140
 Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro Leu Gly Glu His
 145 150 155 160
 Trp Gly Lys Gly Thr Gln Cys Ser Asn Thr Ser Val Gln Asn Gly Asp
 165 170 175
 Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln Asp Gly Asp Met
 180 185 190
 Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp Leu Gln Thr Asn
 195 200 205
 Lys Ser Asp Val Pro Leu Asp Ile Cys Gly Thr Val Cys Lys Tyr Pro
 210 215 220
 Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp Arg Leu Phe Phe
 225 230 235 240
 Tyr Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe Phe Asn Arg Ala
 245 250 255
 Gly Thr Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Asp Leu Leu Val Lys Gly Gly
 260 265 270
 Asn Asn Arg Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Tyr Val His Thr Pro Ser
 275 280 285
 Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr Trp
 290 295 300
 Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn His
 305 310 315 320
 Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met Thr Leu
 325 330 335
 Cys Ala Ser Val Ser Lys Ser Ala Thr Tyr Thr Asn Ser Asp Tyr Lys
 340 345 350
 Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Phe Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln
 355 360 365
 Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala Tyr Ile His Thr
 370 375 380
 Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Ser Pro Pro
 385 390 395 400
 Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Gln Ser Gln Ala
 405 410 415
 Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys Gln Asp Pro Tyr
 420 425 430

[0170]

atgagcgaca gcacagtata tgtgectcct occaacctg tatccaaggt tgttgccacg 60
 gatgcgtagt ttaaaccgac caacatattt tatcacgcca gcagttctag actccttgct 120
 gtgggacatc catattactc tatcaaaaaa gttaacaaaa cagttgtacc aaaggtgtct 180
 ggatatcaat atagagtgtt taaggtagtg ttgccagatc ctaacaagtt tgcattacct 240
 gattcatctc tgtttgacc cactacacag cgtttagtat gggcgtgcac agggttggag 300
 gtaggcaggg gtcaaccttt aggcgttggg gttagtgggc atccattgct aaacaaatat 360
 gatgatgtag aaaatagtggt tgggtatggt ggtaatcctg gtcaggataa tagggttaat 420
 gtaggtatgg attataaaca aaccagceta tgtatggtgg gctgtgctcc accgttaggt 480
 gaacattggg gtaaggttac acaatgttca aatacctctg tacaaaatgg tgactgcccc 540
 ccgttggaac ttattaccag tgttatacag gatggggaca tggttgatac aggctttggg 600
 gctatgaatt ttgcagactt acaaaccaat aaatcggatg ttccccttga tatttgtgga 660
 actgtctgca aatatcctga ttatttgcaa atggcagcag acccttatgg tgataggttg 720
 tttttttatt tgcgaaagga acaaatgttt gctagacact tttttaatag ggccgggact 780
 gtgggggaac ctgtgctga tgacctgttg gtaaaagggg gtaataatag atcatctgta 840
 gctagtagta tttatgtaca tacacctagt ggctcattgg tgtcttcaga ggctcaatta 900
 ttttaataac catattggct tcaaaaggct caggacata acaatggtat ttgctgggga 960
 aaccacttgt ttgttactgt ggtagatacc acacgcagta caaatatgac actatgtgca 1020
 tctgtgtcta aatctgctac atacactaat tcagattata aggaatacat gcgccatgtg 1080
 gaagagtttg atttacagtt tatttttcaa ttgtgtagca ttacattatc tgcagaagtc 1140
 atggcctata tacacacaaat gaatccttct gttttggagg actggaactt tggtttatcg 1200
 cctccaccaa atggtacact ggaggatact tatagatatg tacagtcaca ggccattacc 1260
 tgtcagaaac ccacaccga aaaagaaaaa caggaccctc ataaggatat gagtttttgg 1320
 gaggttaact taaaagaaaa gttttcttat gaattagatc agtttcccct tggacgtaag 1380
 tttttattgc aaagtggata tcgaggacgg acgtctgctc gtacaggtat aaagcgcca 1440
 gctgtgtcta agccctctac agccccaaa cgaaaacgta ccaaaaccag aaagtaa 1497

- <210> 7
- <211> 496
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <400> 7

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

[0172]

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

[0173]

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

[0176]

	485	490	495
Arg Val Arg Val Arg Ala Arg Lys			
500			
<210> 10			
<211> 27			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<400> 10			
catatgagcg acagcacagt atatgtg			27
<210> 11			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<400> 11			
gtcgacttac tttctggttt tggtagttt			30

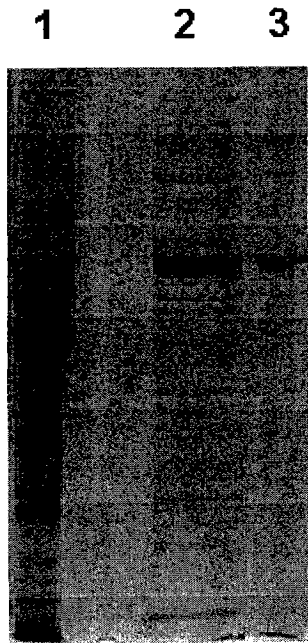


图 1

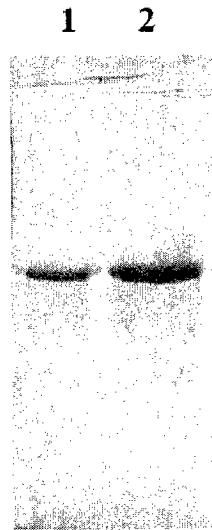


图 2

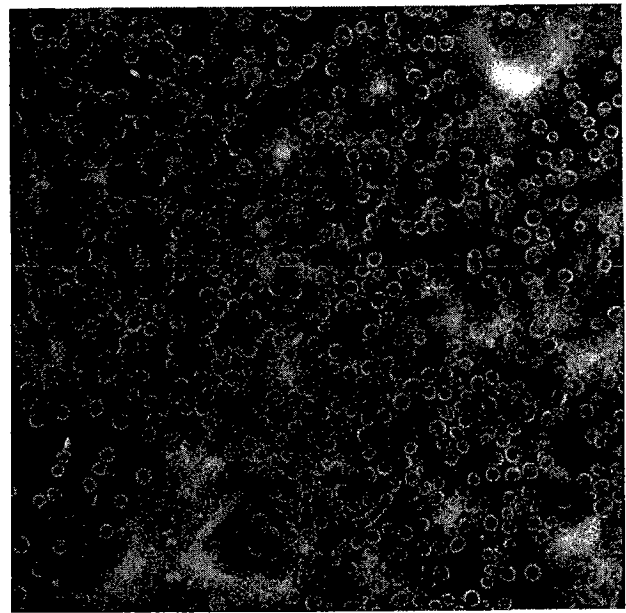


图 3

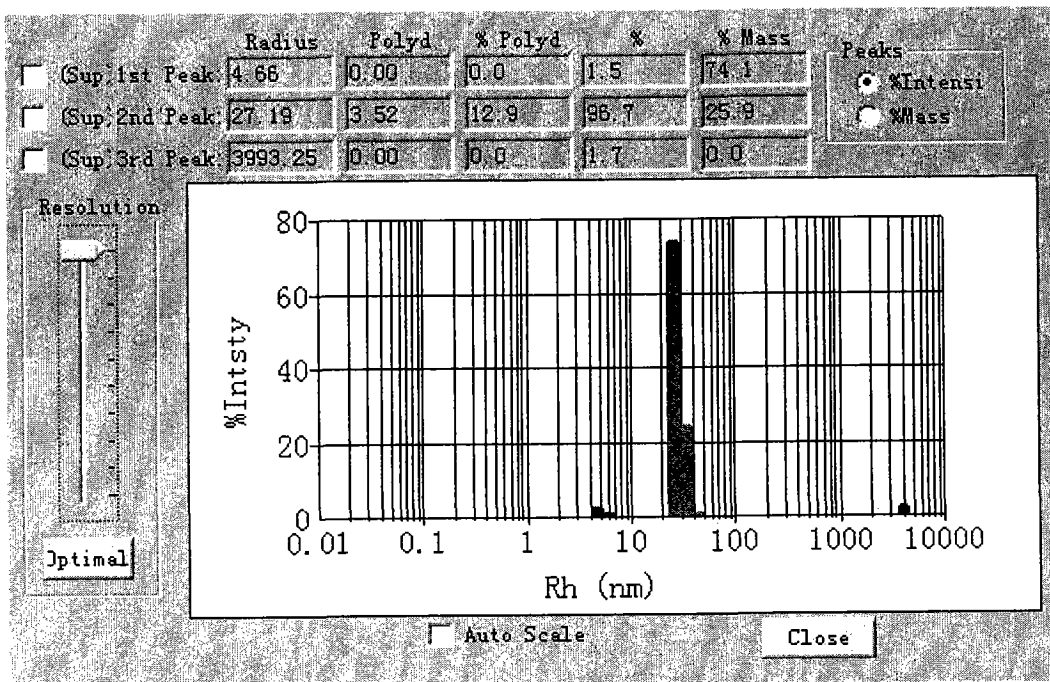


图 4

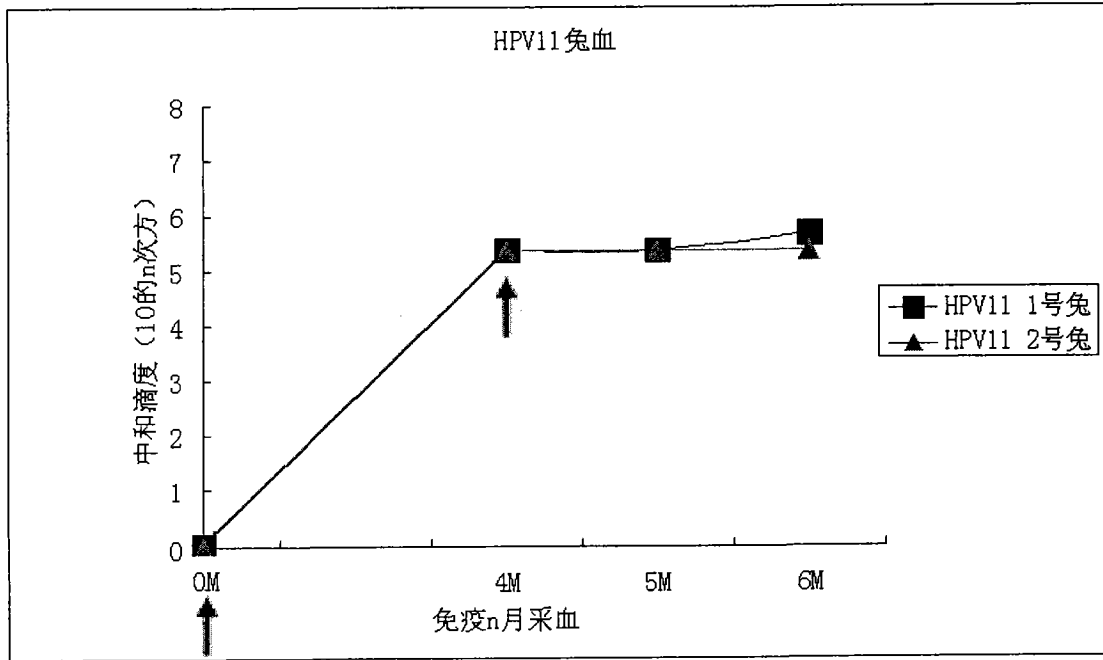


图 5

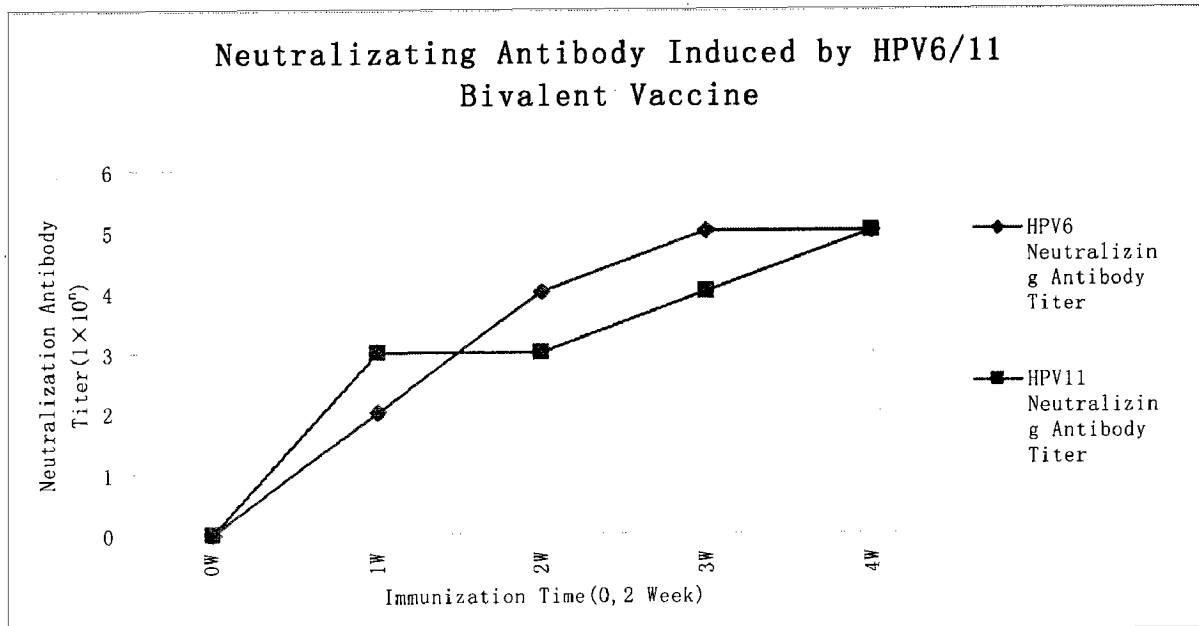


图 6

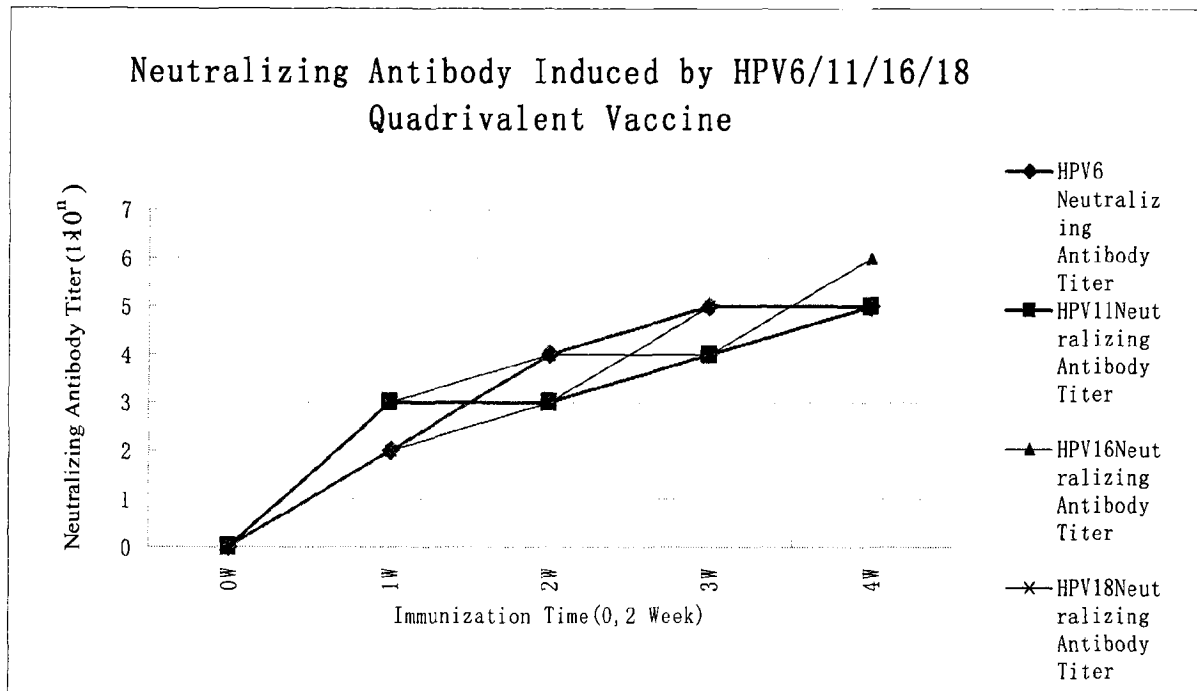


图 7

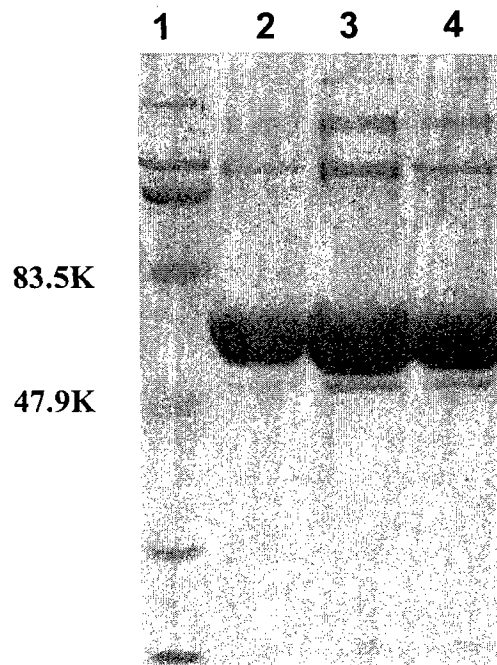


图 8

图 9

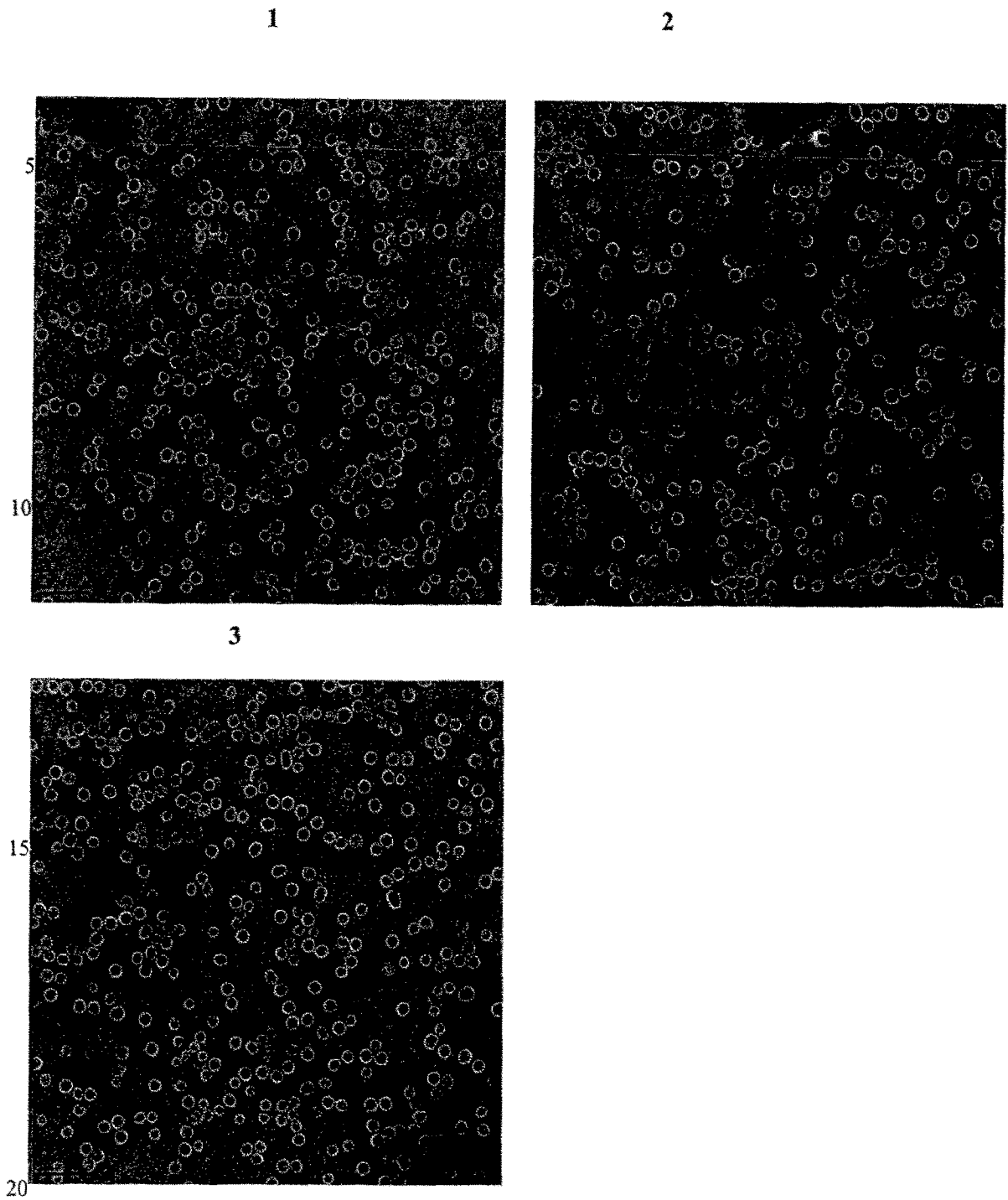
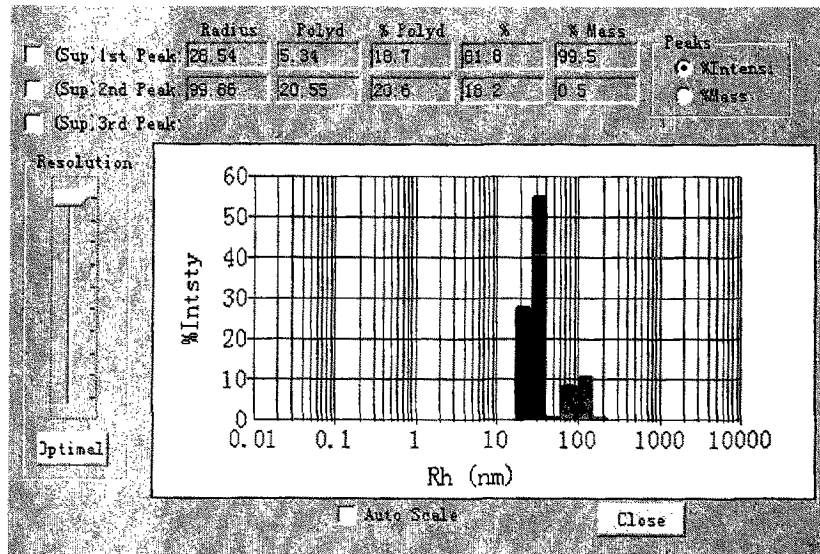
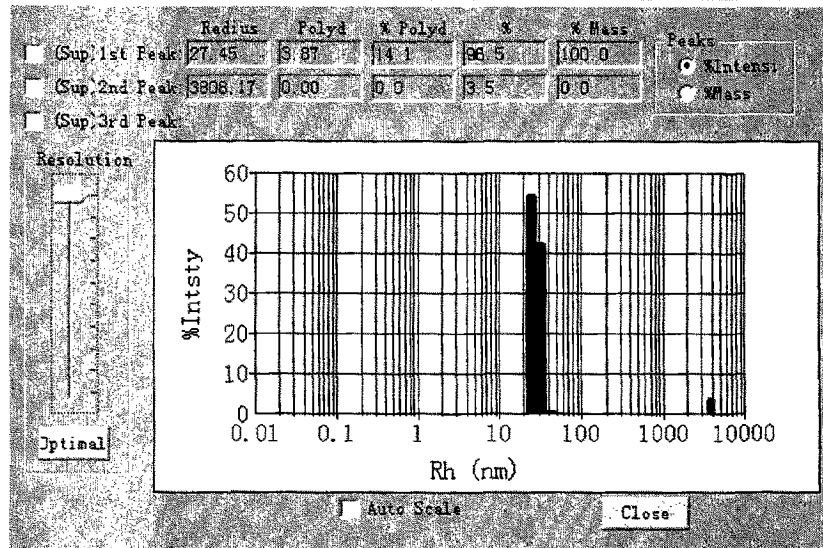


图 10

1



2



3

