

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02821507.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/025 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1290859C

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02821507.9

[30] 优先权

[32] 2001.8.31 [33] ZA [31] 2001/7226

[86] 国际申请 PCT/IB2002/003532 2002.8.30

[87] 国际公布 WO2003/018624 英 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.28

[73] 专利权人 开普敦大学

地址 南非开普敦

[72] 发明人 阿尔温德·德夫希·瓦尔萨尼

爱德华·彼得·雷比茨基

安娜-利塞·威廉森

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

关于 HPV - 11 和 HPV - 16L1 衣壳蛋白的载体,构建体,和转基因植物

[57] 摘要

载体和/或人乳头瘤病毒基因的构建体被用于转化宿主细胞,如细菌,酵母细胞,真菌细胞,昆虫细胞,哺乳动物细胞和植物细胞。在允许至少一种由载体和/或基因构建体编码的蛋白质的蛋白质片段自发装配成诱发免疫原性应答的病毒样颗粒的条件下培养宿主细胞,所述病毒样颗粒针对人乳头瘤病毒。



1. 一种载体和/或基因构建体在植物细胞中的应用, 所述载体和/或基因构建体诱发针对人乳头瘤病毒的病毒样颗粒, 其中所述载体或基因构建体选自:

- a. HPV 11 L1 NLS⁻;
- b. HPV11 L1;
- c. HPV 16 L1 NLS⁻; 和
- d. HPV16 L1。

2. 按照权利要求 1 的应用, 其中:

(i) (b)的 HPV 11 L1 载体或基因构建体或(d)的 HPV 16 L1 载体或基因构建体是 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因;

(ii) (a)的 HPV 11 L1 NLS⁻载体或基因构建体或(c)的 HPV 16 L1 NLS⁻载体或基因构建体是缺少核定位信号的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因, 将所述缺少核定位信号表示为 $\Delta 483$;

(iii) (b)的 HPV 11 L1 载体或基因构建体或(d)的 HPV 16 L1 载体或基因构建体是缺少 10 个 N-末端密码子的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因, 将缺少 10 个 N-末端密码子表示为 $\Delta N10$;

(iv) (a)的 HPV 11 L1 NLS⁻载体或基因构建体或(c)的 HPV 16 L1 NLS⁻载体或基因构建体是缺少 10 个 N-末端密码子和缺少核定位信号的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因, 将缺少 10 个 N-末端密码子和缺少核定位信号表示为 $\Delta N10 \Delta 483$;

(v) (b)的 HPV 11 L1 载体或基因构建体或(d)的 HPV 16 L1 载体或基因构建体是在氨基酸 428 位具有 C 至 G 突变的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因;

(vi) (b)的 HPV 11 L1 载体或基因构建体或(d)的 HPV 16 L1 载体或基因构建体是具有 C 至 G 突变和 $\Delta N10$ 修饰的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因;

(vii) (a)的 HPV 11 L1 NLS⁻载体或基因构建体或(c)的 HPV 16 L1 NLS⁻载体或基因构建体是具有 C 至 G 突变和 $\Delta 483$ 修饰的 HPV 11

或 HPV 16 L1 基因；和

(viii) (a)的 HPV 11 L1 NLS⁻载体或基因构建体或(c)的 HPV 16 L1 NLS⁻载体或基因构建体是具有 C 至 G 突变和 $\Delta N10 \Delta 483$ 修饰的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因。

3. 权利要求 1 或 2 的应用，其用于转化植物细胞的方法中。

4. 一种用载体和/或基因构建体转化的植物细胞，所述载体和/或基因构建体选自

- a. HPV 11 L1 NLS⁻；
- b. HPV11 L1；
- c. HPV 16 L1 NLS⁻；和
- d. HPV16 L1。

5. 按照权利要求 4 的植物细胞，其在允许至少一种由所述载体和/或基因构建体编码的蛋白质或蛋白质片段自发装配成诱发免疫原性应答的病毒样颗粒的条件下培养，所述病毒样颗粒针对人乳头瘤病毒。

6. 按照权利要求 5 的植物细胞，其中所述人乳头瘤病毒是人乳头瘤病毒-11 和/或人乳头瘤病毒-16。

7. 按照权利要求 6 的植物细胞，其中所述载体和/或基因构建体被稳定整合于宿主细胞的基因组之中。

8. 一种用于生产针对人乳头瘤病毒的病毒样颗粒的方法，所述方法包括以下步骤：将选自

- a. HPV 11 L1 NLS⁻；
- b. HPV11 L1；
- c. HPV 16 L1 NLS⁻；和
- d. HPV16 L1

的载体和/或构建体插入植物细胞；

使所述植物细胞表达所述病毒样颗粒；和

分离所述病毒样颗粒。

关于 HPV-11 和 HPV-16 L1 衣壳蛋白的载体，构建体，和转基因植物

5

发明背景

本发明涉及载体和/或构建体，和转基因生物。

在本说明书中下列术语，短语和/或子句应当理解是指：

“构建体”-如本文所用与术语如“偶联物”，“盒”，和“杂化物”同
10 义，包括直接或间接与启动子连接的核苷酸序列。构建体可包含或表达标记，其允许在宿主细胞中选择构建体。

“表达载体”-如本文所用是指能够体内或体外表达的构建体。

“表达”-应当理解是指从 DNA 模板通过转录和翻译生产蛋白质。

“遗传修饰的生物”-如本文所用是指由于以通过交配或自然重组或
15 两者天然不发生的方式作为人为干预的结果已经被导入核苷酸序列的生物。

“在硅片上(*In silico*)”-本文所述的部分测定和/或方法可以通过使用适当的计算机软件进行。如此进行的这些测定和/方法应当理解为被包含其中。

20 “核苷酸序列”-如本文所用与术语“核苷酸序列”和/或术语“多聚核酸”和/或术语“多核苷酸”同义，并包括基因组 DNA，cDNA，重组 DNA，合成 DNA，和 RNA，和上述的任何组合，此外核苷酸序列可以是双链或单链无论表示有义链或反义链。优选地，术语“核苷酸序列”是指 DNA。

25 “可操作性连接”-如本文所用是指并列，其中将与编码序列“可操作性连接”的启动子以这样方式即编码序列的表达是在与控制序列（即尤其启动子，增强子和其它表达调节信号）相适合的条件下来实现连接。

“启动子”-如本文所用是指导核苷酸序列可调型转录的核苷酸序列。

“蛋白质”-如本文所用是用来表示肽和多肽。

30 “重组生物”-如本文所用是指包含载体和/或表达核苷酸序列的构建

体的转基因生物。

“转基因生物” - 如本文所用包括遗传修饰的生物，其包含载体和/或构建体，按照本发明，其中启动子可允许在生物内表达按照本发明的载体和/或构建体的核苷酸序列，或其部分。

5 “载体” - 如本文所用包括表达载体，可复制载体，转化载体，穿梭载体，粘粒，质粒，噬菌体，病毒和酵母人工染色体或其任何组合。

“VLP” - 如本文所用是指病毒样颗粒。

乳头瘤病毒 (PVs) 属于分类科乳头瘤病毒亚科 (*Papillomaviridae*)，是小的、无包被的、双链 (ds) DNA 病毒。这些病毒感染各种各样的高等脊椎动物并且是高度种特异性的。经感染后，人乳头瘤病毒 (HPVs) 对未分化的鳞状上皮细胞具有特别的向性，除与足底疣，扁平疣，和生殖疣 (尖锐湿疣) 相关以外。HPV 感染还与称为疣状表皮发育不良的疾病有关，该疾病为一种稀见的终生疾病，其特征散在于散布的乳头状瘤。此外，已经存在某些乳头瘤病毒分离株与包括子宫颈癌，外阴癌，阴茎癌的泌尿生殖癌，和疣状表皮发育不良损害的恶性转移的流行病学和生物化学联系。在表征的各型 HPV 中，已经将大约 27 种鉴定为肛殖感染的病原体。6, 11, 16, 18, 31, 35 和 42 型 HPV 已经被鉴定是最普遍的，而 16, 18, 31, 33, 51 和 54 型已经与肛殖癌有关，被认为是高危，更特别地 HPV-16 已经在 95% 子宫颈癌中发现。

20 直到最近认为高危生殖 HPV 仅在性交期间传播，然而研究表明婴儿在出生时从他们母亲获得高危 HPV 感染。除了非性母婴传播，研究者在来源于妇女的阴道拭子中，在来源于少女的宫颈-阴道标本中，和在来源于 61 位声称无性接触历史的妇女中的 9 位的外阴拭子中检测到 HPV DNA。

25 最初的 HPV 感染导致颈上皮内肿瘤形成 (CIN)，更通常已知为癌前病变。已经发现在一些妇女中存在 CIN 的自发消退，但这并非总是如此，病变可持续多年，增加向子宫颈癌进展的可能性。

从冷冻疗法，外科切除和局部治疗范围的治疗方法经常不减轻问题，对于对治疗应答的患者，复发经常是个问题。最终破坏所有感染组织似乎不可行，因为多病灶疾病和潜伏是感染的常见特征。靶向设计和抑制病毒

30

复制的抗病毒药物似乎在 HPV 感染的情形中无效，首先因为该病毒不在保持感染的细胞中复制和其次由于病毒复制基因似乎通过整合，重排和缺失而消失的事实。

5 常规上大多数预防疫苗已由活的减毒病毒或福尔马林灭活的病毒组成。由于涉及产生大量的这些常规疫苗的困难和风险，已经很强调开发病毒蛋白亚单位疫苗和生产其的方法。

发明概述

按照本发明提供载体和/或构建体，其选自：

10 a.HPV 11 L1 NLS⁻；

b.HPV11 L1；

c.HPV 16 L1 NLS⁻；

d.HPV16 L1；

e.pART7；

15 f.pART27；

特别是：

(i) HPV 11 或 HPV 16 L1 基因 (504 氨基酸)；

(ii) 缺少核定位信号的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因 (NLS⁻, $\Delta 483$)；

(iii) 缺少 10 个 N-末端密码子的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因 ($\Delta N10$)；

20 (iv) 缺少 10 个 N-末端密码子和 NLS 的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因 ($\Delta N10 \Delta 483$)；

(v) 在氨基酸 428 位具有 C 至 G 突变 (pen) 的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因 (pen504)；

(vi) 具有 pen 和 $\Delta N10$ 修饰的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因；

25 (vii) 具有 pen 和 $\Delta 483$ 修饰的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因；和

(viii) 具有 pen 和 $\Delta N10 \Delta 483$ 修饰的 HPV 11 或 HPV 16 L1 基因。

此外，按照本发明提供载体和/或构建体在转化宿主细胞的方法中的应用。

另外，按照本发明提供用载体和/或构建体转化的宿主细胞，其中转化的宿主细胞优选为：

30

- a. 细菌;
b. 酵母细胞;
c. 真菌细胞;
d. 昆虫细胞;
5 e. 哺乳动物细胞;
f. 植物细胞,

其在允许至少一种由载体和/或构建体编码的蛋白质或蛋白质的片段自发装配成诱发免疫原性应答的病毒样颗粒的条件下培养, 所述病毒样颗粒针对人乳头瘤病毒, 更具体地人乳头瘤病毒-11 和/或人乳头瘤病毒-16, 10 最优选载体和/或构建体被稳定整合于宿主细胞的基因组中。

还有, 按照本发明提供由载体和/或构建体转化的非人多细胞转基因生物, 其在允许至少一种由载体和/或构建体编码的蛋白质或蛋白质的片段自发装配成诱发免疫原性应答的病毒样颗粒的条件下培养, 所述病毒样颗粒针对人乳头瘤病毒, 更具体地人乳头瘤病毒-11 和/或人乳头瘤病毒-16, 15 优选转基因生物选自:

1. 烟草 (*Nicotiana tabacum*) cv Xanthi;
2. 烟草 cv Soulouk;
3. 番茄 (*Lycopersicon esculentum*) cv Tiny Tom; 和
4. 拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) cv Columbia.

20

此外, 本发明提供通过转基因生物系统表达蛋白质或蛋白质的片段。

附图简述

本发明的特征将从仅通过实施例, 和参考附图的以下所述本发明某些 25 实施方案的下列描述中变得明显, 在所述附图中:

- 图 1 显示 pART7 的质粒图;
图 2 显示 pART27 的质粒图;
图 3 显示从转基因烟草中分离的、用 HPV-16-特异的 Mab 捕获的 HPV-16 VLP 的电子显微镜照片; 和
30 图 4 显示从转基因拟南芥属(*Arabidopsis*)中分离的 HPV-11 VLP 的

电子显微镜照片。

本发明优选实施方案详述

制备转基因生物的方法对于本领域的技术人员是已知的，在本说明书
5 中将不深入展开。

克隆和制备农杆菌属克隆

利用 *HIND* III 和 *EcoR* I 限制位点将 HPV-11 L1 和 HPV-16 L1 基因片段单独克隆到原始载体 pART7 的多克隆位点(MCS)中以提供构建体 HPV
10 11 L1 NLS⁺, HPV 11 L1, HPV 16 L1 NLS⁺, 和 HPV 16 L1。

通过 *Not* I 消化从 pART7 载体（图 1）中切除完整的盒，并克隆到二元载体 pART27（图 2）中。

将各个 pART27 克隆转染到根癌农杆菌菌株 C58C1 中。

15 叶盘转化和组织培养

用农杆菌属克隆转化烟草 cv Xanthi 和 Soulouk 叶盘，在卡那霉素组织培养基上选择转化体，如 Turpen 等所述（Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. J. Virol. Meth. 42: 227-240）。

20 用农杆菌属克隆转化番茄 cv Tiny Tom 子叶，如 Pfitzner 所述（Transformation of tomato. J. Mol. Biol. Meth. 81: 359-363）。

用农杆菌属克隆转化开花拟南芥菜 cv Columbia 植物，如 Clough 和 Bent 所述（在 <http://www.cropsci.uiuc.edu/~a-bent/protocol.html> 可获得的简化的拟南芥属转化方案），在卡那霉素组织培养基上选择转化体，如
25 Turpen 等所述（Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. J. Virol. Meth. 42: 227-240）。

筛选转基因植物

30 使用 Dellaporta 等所述方法（A plant DNA miniprep: Version II.

Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour) 从转化体中提取植物基因组 DNA, 通过 PCR 证实整合基因的存在。

从转基因植物中提取 VLP

- 5 在 1:2 体积 (植物材料: 缓冲液) 的缓冲液 (对于 HPV 使用含有 0.5 M NaCl 的 PBS) 中搅匀植物叶子材料, 并在漏斗上压紧通过粗棉布直至浆干燥。在 4℃ 下将提取物离心 10 分钟 (3000 rpm)。将 10% PEG (MW 8000) 加入上清液并让在 4℃ 溶解过夜。然后将这在 4℃ 下 3000 rpm 离心 10 分钟。在 4℃ 下将沉淀重悬浮在 1/10 原始体积的 PBS (0.5 M NaCl) 中。然
- 10 后在 3000 rpm 下将混合物离心 15 分钟以便去除所有变性的不溶性组分。将提取物覆盖在 40% 的蔗糖垫 (在含有 0.5 M NaCl 的 PBS 中制备) 上, 并在 100 000 x g (对于 Sorvall SW28, 24 000 rpm) 下在 10℃ 下离心 2.5 小时。将沉淀重悬浮在少量 PBS (0.5 M NaCl) 中并将悬浮液通过 18 & 26 规格的针以降低它的粘度。将该悬浮液加样到 10-40% 的线性蔗糖梯度上
- 15 并在 10℃ 下 100 000 x g (对于 SW 28, 24 000 rpm) 旋转 3 小时。用针和注射器去除在散射光下观察到的条带, 并在 4℃ 下对 PBS (0.5 M NaCl) 透析 12-24 小时。

电子显微镜分析

- 20 将 VLP 捕获于包被多克隆抗体 (对于 HPV-11 L1 特异性的) R399 的铜网上, 并用 2% 乙酸双氧铀负染。在 200CX 电子显微镜下观察网格。

在 R₀ 中 (第一转基因系) L1 基因被稳定地整合到烟草 cv Xanthi 和 Soulouk 的基因组中。对于 T₁ 代 (第一代) 的自花传粉转基因植物的 L1 基因观察到常规的 3:1 孟德尔式遗传。另外在转基因拟南芥植物的 T2

25 (第二代) 至 T5 (第五代) 中检测到 L1 基因。

在电子显微镜下观察到的 VLP (用抗体捕获或未捕获) 外表上类似于使用杆状病毒昆虫细胞系统的 L1 基因表达产生的那些。观察到颗粒的直径大小约为 50-60 nm (拟南芥), 并在检查烟草蛋白质提取物时观察到部分降解的颗粒。

在转基因植物中乳头瘤病毒基因的表达

在进一步的研究中,制备包含 HPV-16 L1 基因的转基因系,其现在至少是选择的第二代。另外,用 HPV-11 NLS- L1 基因转化拟南芥菜和烟草植物。最近还用 CRPV L1 转化烟草植物。所有这些植物系显示生产 VLP, 5 尽管浓度低。包含或缺少 NLS 序列似乎对于 HPV-16 L1 VLP 表达几乎没有区别,尽管如果定位到植物细胞核上 HPV-11 L1 可能有毒性的。通过 V5 MA b 捕获 HPV-16 L1 VLP,如图 3 所示(条=70 nm),显示它们在抗原性上适合于疫苗应用。

在图 4(条=70 nm)中显示从转基因拟南芥属中分离的 HPV-11 VLP。 10 缺少核定位信号的 HPV-11 L1 蛋白(NLS-, $\Delta 483$)和许多不同的 HPV-16 L1 和 L1 NLS-蛋白构建体已经在转基因植物中表达,已经测定这些制备 T=7 二十面体的颗粒 VLP,经注射后在兔中是免疫原性的,在形态学上似乎与在昆虫细胞的杆状病毒表达系统中制备的 VLP 相同。另外,已经测定在转基因植物中制备的 HPV-16 VLP 与构象特异的单克隆抗体 15 (MAb V5)结合,并阻止中和抗体结合。这些发现显示在植物中制备的 VLP 在功能上与在昆虫细胞中制备的 VLP 相同。另外,下列构建体已经通过重组杆状病毒在昆虫细胞中表达,其与未改变的 L1 蛋白结合的、相同的构象特异和序列特异的 Mab 结合:

- a. 缺少 10 个 N-末端密码子的 HPV 16 L1 基因($\Delta N10$),其装配成 20 T=1 和此外 T=7 的二十面体颗粒;
- b. 缺少 10 个 N-末端密码子和 NLS 的 HPV 16 L1 基因($\Delta N10 \Delta 483$),其装配成 T=1 和此外 T=7 的二十面体颗粒;
- c. 在氨基酸 428 处具有 C 至 G 突变(pen)的 HPV 16 L1 基因(pen504),其装配成五聚体;
- 25 d. 具有 pen 和 $\Delta N10$ 修饰的 HPV 16 L1 基因,其装配成五聚体;
- e. 具有 pen 和 $\Delta 483$ 修饰的 HPV 16 L1 基因,其装配成五聚体;和
- f. 具有 pen 和 $\Delta N10 \Delta 483$ 修饰的 HPV 16 L1 基因,其装配成五聚体。

对于本领域技术人员明显的是这些构建体可以在转基因植物中表达 30 并应该以完全相同的方式起作用。

对于本领域技术人员紧接着明显的是尽管本文已经只列举本发明的某些实施方案，本发明的其它修改和/或变体是可能的。这些修改和/或变体应当被认为属于本发明的范围内。

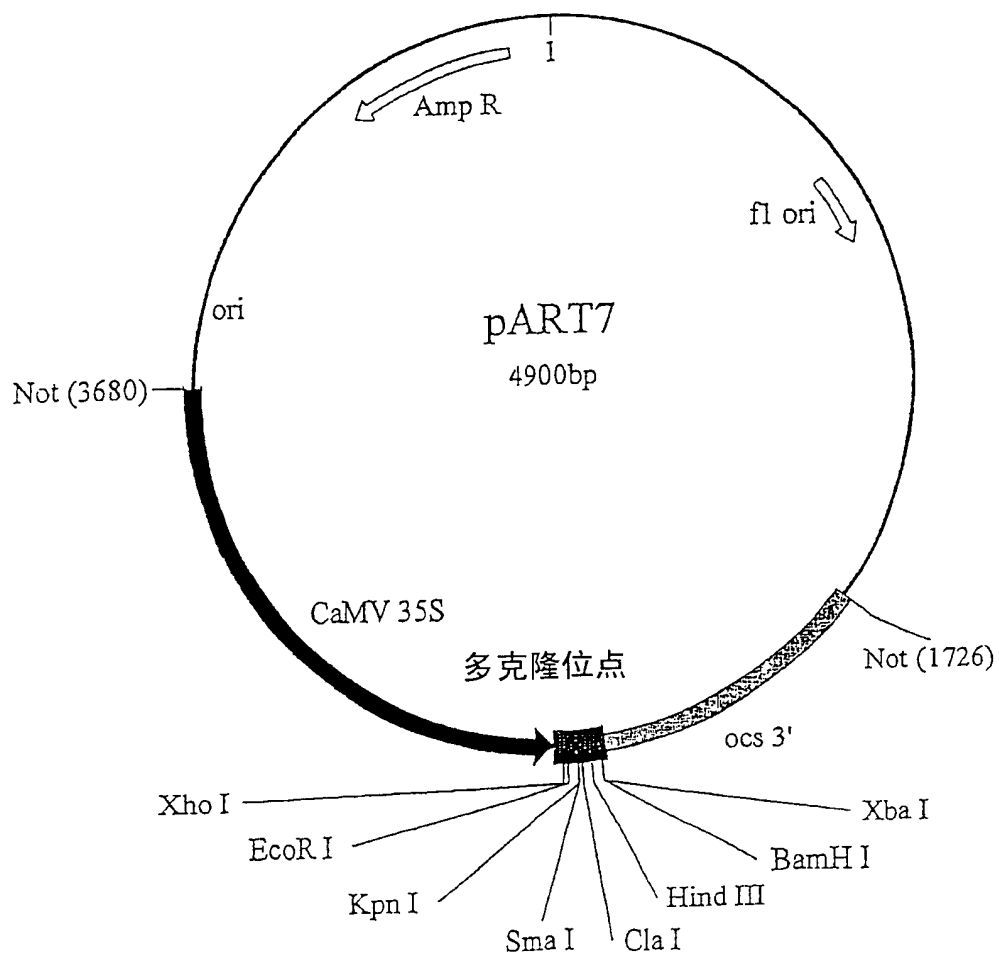


图 1

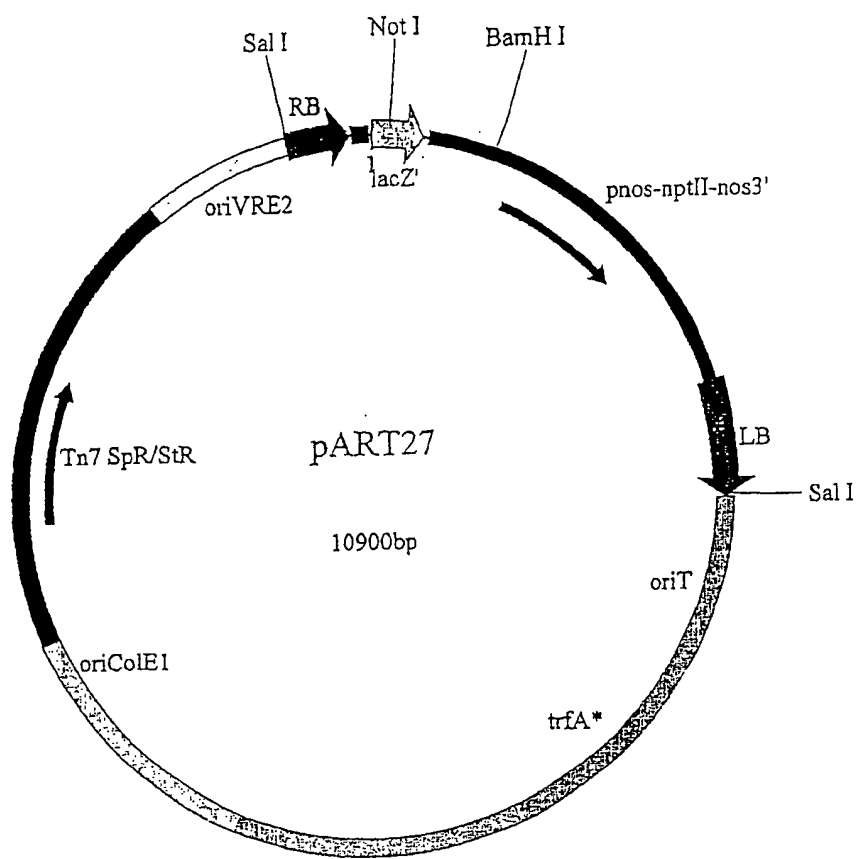


图 2

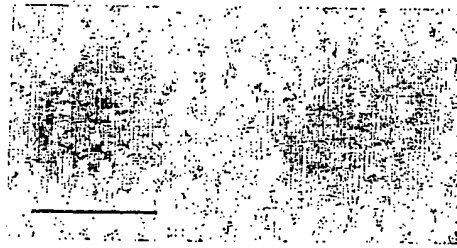


图 3

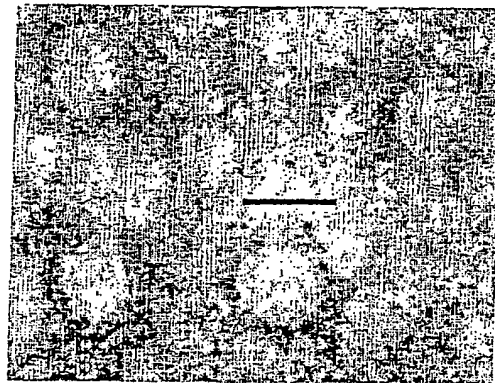


图 4