

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年1月28日 (28.01.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/013062 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/025 (2006.01) *A61P 31/20* (2006.01)

C12N 15/37 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/102557

(22) 国际申请日: 2020年7月17日 (17.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910656297.X 2019年7月19日 (19.07.2019) CN

(71) 申请人: 神州细胞工程有限公司(SINOCELLTECH LTD) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。

(72) 发明人: 罗春霞(LUO, Chunxia); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。张伟(ZHANG, Wei); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。索晓燕(SUO, Xiaoyan); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。庞琳(PANG, Lin); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。胡萍(HU, Ping); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京市金杜律师事务所(KING & WOOD MALLESONS); 中国北京市朝阳区东三环中路1号环球金融中心办公楼东楼20层, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: CHIMERIC HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 31 L1 PROTEIN

(54) 发明名称: 嵌合的人乳头瘤病毒31型L1蛋白

(57) Abstract: Disclosed are a chimeric human papillomavirus type 31 L1 protein and a polynucleotide encoding same, and an HPV type 31 virus-like particle and a preparation method therefor. The chimeric human papillomavirus type 31 L1 protein contains an N-terminus fragment derived from the HPV type 31 L1 protein, the N-terminus fragment having immunogenicity for the HPV type 31 L1 protein; and a C-terminus fragment derived from an L1 protein of a second type of papillomavirus, the L1 protein of the second type of papillomavirus having better expression and solubility characteristics compared to other types of L1 proteins. The chimeric HPV type 31 L1 protein has immunogenicity for the HPV type 31 L1 protein.

(57) 摘要: 本发明公开了嵌合的人乳头瘤病毒31型L1蛋白和编码其的多核苷酸, 还公开了HPV 31型病毒样颗粒和其制备方法。所述嵌合的人乳头瘤病毒31型L1蛋白包含衍生于HPV 31型L1蛋白的N端片段, 所述N端片段保持HPV 31型L1蛋白的免疫原性; 和衍生于第二型别乳头瘤病毒L1蛋白的C端片段, 所述第二型别乳头状瘤病毒L1蛋白具有相较于其他型别的L1蛋白表达量和可溶性较好的特性; 其中所述嵌合的HPV 31型L1蛋白具有HPV 31型L1蛋白的免疫原性。

WO 2021/013062 A1

嵌合的人乳头瘤病毒 31 型 L1 蛋白

技术领域

本发明涉及人乳头瘤病毒 (HPV) L1 蛋白和编码该蛋白的多核苷酸，还涉及 HPV 病毒样颗粒及其制备方法。

背景技术

乳头瘤病毒 (papilloma virus, PV) 属于乳头瘤病毒科 (Papillomaviridae)，能引起人、牛、狗、兔等的乳头瘤。其成员人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 为无包膜 DNA 病毒。该病毒的基因组为双链闭环 DNA，大小约 7.2-8kb，具有 8 个开放阅读框，按照功能可分为三个区域：(1) 早期区 (E)，约 4.5kb，编码 E1、E2、E4-E7 共 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)，其位于 L 区末端与 E 区起始端之间，长约 800-900bp，不编码任何蛋白，但具有 DNA 复制和表达调控元件。

L1 和 L2 蛋白在 HPV 感染周期的中晚期合成。L1 蛋白是主要衣壳蛋白并且具有 55-60 kDa 的分子量。L2 蛋白是次要衣壳蛋白。72 个 L1 蛋白五聚体构成二十面体 HPV 病毒粒子的外壳 (直径为 45-55 nm)，其包裹闭环双链 DNA。L2 蛋白质位于 L1 蛋白质内侧 (Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16 Chen, X.S., R. L.Garcea, Mol.Cell.5(3):557-567, 2000)。

L1 蛋白的 ORF 是 PV 基因组中最保守的基因，可以用于鉴别新的 PV 型。如果克隆了完整的基因组，并且 L1 ORF 的 DNA 序列与最接近的已知 PV 型相差超过 10%，则被认定为分离出新的 PV 型。差异在 2%和 10%同源性被定义为不同的亚型，差异小于 2%被定义为同一亚型的不同变种 (E.-M. de Villiers et al. / Virology 324 (2004)

17-27)。

在 HPV 感染的后期，细胞质中新合成的 L1 蛋白被输送到终端分化的角蛋白细胞核中，与 L2 蛋白一起，包装复制的 HPV 基因组 DNA 形成传染性病毒 (Nelson, L.M, et al. 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. J. Biol. Chem. 277: 23958-23964)。这表明 L1 蛋白的核导入在 HPV 感染和生产中起着非常重要的作用。病毒进入细胞核的能力由 HPV L1 蛋白 C 端的核定位信号(NLS)决定，核定位信号的一个特征是富含碱性氨基酸 (Garcia-Bustos, J., et al. 1991. Nuclear protein localization. Biochimica et Biophysica Acta 1071: 83-101)。

15 种高风险(HR) HPV 型可导致宫颈、肛门、阴茎、阴道、外阴和口咽癌。其中，HPV-16 和 HPV-18 型是迄今最为常见的癌症起因，约占宫颈癌的 70%，其余为其他 HR-HPV 型(31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 和 82)引起。HPV-16 约占 HPV 阳性口咽癌(OPCs)的 95%。持续低风险基因型 HPV-6 和 HPV-11 导致大多数肛门生殖器疣和呼吸道乳头状瘤，但很少与癌症相关 (Human Papillomavirus in Cervical Cancer and Oropharyngeal Cancer: One Cause, Two Diseases Tara A. Berman and John T. Schiller, PhD2 Cancer 2017;123:2219-29)。

20 使用痘苗病毒、杆状病毒或酵母系统重组表达 L1 蛋白，L1 蛋白可自我装配形成病毒样颗粒 (VLP)，大约含有 72 个 L1 蛋白，与病毒体外壳相似。VLP 没有适应症。VLP 可以在接种动物中诱导中和抗体，保护实验动物免受感染性病毒的随后攻击。因此，VLP 似乎是乳头瘤病毒疫苗的优秀候选者 (Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16 Chen, X.S., R. L.Garcea, Mol.Cell.5(3):557-567, 2000)。

25 葛兰素公司的 CERVARIX[®]是双价重组 HPV 疫苗。其中含有由重组杆状病毒表达载体系统在夜蛾(*Trichoplusia ni*)昆虫细胞中表达获得的 HPV 16 型重组 L1 蛋白和 HPV 18 型重组 L1 蛋白。L1 蛋白

自组装成病毒样颗粒,用于预防 9-25 岁的妇女由 16 和 18 型 HPV 引起的宫颈癌,2 级或 3 级宫颈上皮内瘤样变和原位腺癌,和 1 级宫颈上皮内瘤样病变 (致癌)(<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM186981.pdf>)。

GARDASIL®是默克公司生产的人乳头状瘤病毒四价 (6、11、16 和 18 型) 重组疫苗,用于 9-26 岁的女孩和妇女用于预防宫颈癌生殖器疣(尖锐湿疣)和由 HPV 6、11、16、18 型引起癌前或增生异常病变; 以及 9-26 岁的男孩和男人用于预防肛门癌、生殖器疣 (尖锐湿疣) 和由 HPV 6、11、16、18 型引起的癌前期或发育异常病变 (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/gardasil>)。

GARDASIL®9 是默克公司生产的人乳头状瘤病毒九价重组疫苗,包含 HPV 6、11、16、18、31、33、45、52 和 58 型 L1 蛋白的病毒样颗粒,该 L1 蛋白由酿酒酵母发酵生产,自组装为 VLP。用于 9-45 岁的女孩和妇女用于预防 HPV16、18、31、33、45、52 和 58 型引起的宫颈癌、外阴癌、阴道癌和肛门癌,HPV6 和 11 引起的生殖器疣 (尖锐湿疣)和由 HPV 6、11、16、18、31、33、45、52 和 58 型引起癌前或或增生异常病变; 以及 9-45 岁的男孩和男人用于预防 16、18、31、33、45、52 和 58 型引起的肛门癌,HPV 6 和 11 引起的生殖器疣 (尖锐湿疣) 和由 HPV 6、11、16、18、31、33、45、52 和 58 型引起的癌前期或发育异常病变 (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/gardasil-9>)。

GARDASIL®9 的说明书中声称 HPV16 和 18 型是约 70%的宫颈癌的发病缘由,其余的 20%病例归责于 31、33、45、52 和 58 型,由是 GARDASIL®9 可以预防 90%的宫颈癌的发生 (<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm426445.htm>)。

HPV 疫苗研制的关键因素是病毒样颗粒可进行大量生产。目前较为普遍的生产病毒样颗粒的系统主要分为真核表达系统和原核表

达系统。

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。在真核表达系统中表达的 HPV L1 蛋白的天然构像破坏较少，可自发装配形成病毒样颗粒，但产量较低。原核表达系统主要大肠杆菌表达系统，产量高但大多以包涵体形式存在，不利于纯化，生产工艺复杂。

因此，在本领域仍然存在获得高产量的 HPV 病毒样颗粒的需求。

发明内容

10 在一个方面，本发明提供一种嵌合的人乳头瘤病毒（HPV）31 型 L1 蛋白，自其 N 末端至 C 末端方向包含 a. 衍生于 HPV 31 型 L1 蛋白的 N 端片段，所述 N 端片段保持 HPV 31 型 L1 蛋白的免疫原性；和 b. 衍生于第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白的 C 端片段，所述第二型别乳头状瘤病毒 L1 蛋白具有相较于其他型别的 L1 蛋白表达量和可溶性较好的特性；其中所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白具有 HPV 31 型 L1 蛋白的免疫原性。

在另一个方面，本发明提供一种 HPV 31 型病毒样颗粒，其包含嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白。

20 在另一个方面，本发明提供一种预防 HPV 相关疾病或感染的免疫原性组合物，其包含 HPV 31 型病毒样颗粒和佐剂。

在另一个方面，本发明提供一种分离的多核苷酸，其编码嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白。

在另一个方面，本发明提供一种载体，其包含编码嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白的多核苷酸。

25 在另一个方面，本发明提供一种杆状病毒，其包含编码嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白多核苷酸。

在另一个方面，本发明提供一种宿主细胞，其包含如上所述的多核苷酸、载体、或杆状病毒。

在另一个方面，本发明提供一种制备 HPV 31 型病毒样颗粒的方

法，其包括培养如上所述的宿主细胞以表达所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白并组装成病毒样颗粒；以及纯化所述 HPV 31 型病毒样颗粒。

附图说明

5 图 1 HPV 31 L1: 33C 的 L1 蛋白的表达。M: Marker; L: 细胞裂解液; E-S: 裂解液离心后收集的上清液。

图 2 透射电镜观察 HPV 31 L1: 33C 病毒样颗粒。

图 3 C 端截短的 HPV16L1 (1-474) 的表达。M: Marker; L: 细胞裂解液; E-S: 裂解液离心后收集的上清液。

10

具体实施方式

在一个方面，本发明提供一种嵌合的人乳头瘤病毒 (HPV) 31 型 L1 蛋白，自其 N 末端至 C 末端方向包含：a. 衍生于 HPV 31 型 L1 蛋白的 N 端片段，所述 N 端片段保持 HPV 31 型 L1 蛋白的免疫原性；和 b. 衍生于第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白的 C 端片段，所述第二型别乳头状瘤病毒 L1 蛋白具有相较于其他型别的 L1 蛋白表达量和可溶性较好的特性；其中所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白具有 HPV 31 型 L1 蛋白的免疫原性。

20 在一个实施方式中，所述 N 端片段为将 HPV 31 型 L1 蛋白的天然序列的 C 末端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段，以及与其具有至少 98% 的同一性的片段；所述 C 端片段为将第二型别乳头状瘤病毒 L1 蛋白的天然序列的 N 末端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段，以及该片段进一步突变、缺失和/或添加而产生的功能性变体。

25 在另一个实施方式中，所述 N 端片段与将 HPV 31 型 L1 蛋白的天然序列的 C 端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段具有至少 98.5%、99%、99.5% 或 100% 的同一性。

在另一个实施方式中，所述 C 端片段含有一个或多个核定位序列。

在一个实施方式中,所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白选自 HPV 1 型、2 型、3 型、4 型、6 型、7 型、10 型、11 型、13 型、16 型、18 型、22 型、26 型、28 型、31 型、32 型、33 型、35 型、39 型、42 型、44 型、45 型、51 型、52 型、53 型、56 型、58 型、59 型、5 60 型、63 型、66 型、68 型、73 型或 82 型 L1 蛋白;

优选地,所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白选自 HPV 16 型、28 型、33 型、59 型、或 68 型 L1 蛋白;

更优选地,所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白选自 HPV 33 型或 HPV 59 型 L1 蛋白。

10 在一个实施方式中,所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白为 HPV 33 型 L1 蛋白,所述 C 端片段为 SEQ ID No: 2; 或其长度为 m 个氨基酸的片段,优选涵盖 SEQ ID No: 2 的第 1-m 位氨基酸的片段; 其中 m 为 8-26 的整数。

15 在一个实施方式中, HPV 33 型 L1 蛋白的 C 端片段具有一个核定位序列。在另一个实施方式中, HPV 33 型 L1 蛋白的 C 端片段具有两个核定位序列。在一些实施方式中,嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白包含一个或多个 HPV 33 型 L1 蛋白的 C 端片段。所述多个 HPV 33 型 L1 蛋白的 C 端片段可以相同也可以不同。在一个实施方式中,SEQ ID No: 2 的氨基酸编号 7-8 的氨基酸序列 (KR) 和氨基酸序列编号 20 20-23 的氨基酸序列 (KRKK) 为 HPV 33 型 L1 蛋白的 C 端片段的核定位序列。

25 在另一个实施方式中,所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白为 HPV 59 型 L1 蛋白,所述 C 端片段为 SEQ ID No: 13; 或其长度为 n 个氨基酸的片段,优选涵盖 SEQ ID No: 13 的第 1-n 位氨基酸的片段; 其中 n 为 16-38 的整数。

在一个实施方式中, HPV 59 型 L1 蛋白的 C 端片段具有一个核定位序列。在另一个实施方式中, HPV 59 型 L1 蛋白的 C 端片段具有两个核定位序列。在一些实施方式中,嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白包含一个或多个 HPV 59 型 L1 蛋白的 C 端片段。所述多个 HPV 59

型 L1 蛋白的 C 端片段可以相同也可以不同。在一个实施方式中, SEQ ID No: 13 的氨基酸编号 14-16 的氨基酸序列 (RKR) 和氨基酸序列编号 28-34 的氨基酸序列 (KRVKRRK) 为 HPV 59 型 L1 蛋白的 C 端片段的核定位序列。

5 在一个实施方式中, 所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白包含 HPV 33 型 L1 蛋白的 C 端片段和 HPV 59 型 L1 蛋白的 C 端片段两者。

在一个实施方式中, 所述 N 端片段与将 SEQ ID No: 1 所示序列的 C 末端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段具有 98%、98.5%、99%、99.5% 或 100% 的同一性。

10 在一个实施方式中, 所述 N 端片段的 C 末端与所述 C 端片段的 N 末端直接连接或通过接头连接。

接头不影响所述 N 端片段的免疫原性, 且不影响蛋白的表达量或可溶性。在一个实施方式中, 所述 N 端片段和所述 C 端片段通过由 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸组成的接头连接。在
15 一个实施方式中, 接头是人工序列。在另一个实施方式中, 接头是 HPV L1 蛋白中天然存在的序列。在一个实施方式中, 接头可以是 HPV 31 型 L1 蛋白的部分序列。在另一个实施方式中, 接头可以是 HPV 33 型 L1 蛋白的部分序列。在另一个实施方式中, 接头可以是 HPV 59 型 L1 蛋白的部分序列。

20 在一个实施方式中, 当所述 N 端片段的 C 末端与所述 C 端片段的 N 末端连接时, 在连接点的正负 4 个氨基酸位点的范围内存在以下连续氨基酸序列: RKFL; 优选地, 在连接点的正负 6 个氨基酸位点的范围内存在以下连续氨基酸序列: LGRKFL。

在一个实施方式中, 嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白与 SEQ ID No: 3
25 具有 98%、98.5%、99%、99.5% 或 100% 的同一性。

在另一个方面, 本发明提供一种 HPV 31 型病毒样颗粒, 其包含如前所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白。在一个实施方式, HPV 31 型病毒样颗粒为由 72 个所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白的五聚体构成的二十面体。在一个实施方式中, HPV 31 型病毒样颗粒具有正确形

成的二硫键，因而具有良好的天然构象。在一个实施方式中，HPV 31 型病毒样颗粒在体内表达系统中自行装配。

在一个方面，本发明提供一种预防 HPV 相关疾病或感染的免疫原性组合物，其包含根据如前所述的 HPV 31 型病毒样颗粒和佐剂。

5 所述预防可被认为是治疗，两者可互换使用。

在一个方面，将上述免疫原性组合物施用至受试者。在一个实施方式中，受试者是人。

10 在一个方面，本发明提供一种分离的多核苷酸，其编码如前所述所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白。在一个实施方式中，多核苷酸为针对不同表达系统进行密码子优化后的多核苷酸。在一个实施方式中，多核苷酸为针对昆虫杆状病毒表达系统进行密码子优化后的多核苷酸。

在一个方面，本发明提供一种分离的多核苷酸，其具有 SEQ ID No: 4 所示的序列。

15 在一个方面，本发明提供一种载体，其包含如前所述的多核苷酸。在一个实施方式中，载体是杆状病毒载体。在一个实施方式中，载体可以是用于杆状病毒表达系统的转移载体。在另一个实施方式中，载体可以是用于杆状病毒表达系统的表达载体。在另一个实施方式中，载体可以是用于杆状病毒表达系统的重组后的载体。

20 在一个方面，本发明提供一种杆状病毒，其包含如前所述的多核苷酸。

25 在一个方面，本发明提供一种宿主细胞，其包含如前所述的多核苷酸、载体、或杆状病毒。在一个实施方式中，宿主细胞为昆虫细胞，优选地，所述昆虫细胞选自 Sf9 细胞、Sf21 细胞、Hi5 细胞和 S2 细胞。

在一个方面，本发明提供一种制备根据如前所述的 HPV 31 型病毒样颗粒的方法，其包括：培养如前所述的宿主细胞以表达所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白并组装成病毒样颗粒；以及纯化所述 HPV 31 型病毒样颗粒。

在一个实施方式中，宿主细胞为昆虫细胞。在一个实施方式中，宿主细胞为 Hi5 细胞。在一个实施方式中，嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白在宿主细胞中自行装配成 HPV 31 型病毒样颗粒。在一个实施方式中，嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白在宿主细胞中自行装配成 HPV 31 型病毒样颗粒，其具有由 72 个所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白的五聚体构成的二十面体。在一个实施方式中，HPV 31 型病毒样颗粒具有正确形成的二硫键，从而具有良好的天然构象。

在一个实施方式中，纯化采用阳离子交换层析。在一个实施方式中，纯化采用强阳离子交换层析。在另一个实施方式中，纯化采用弱阳离子交换层析。在一个实施方式中，纯化采用多次阳离子交换层析的组合。在一个实施方式中，纯化采用 HS 强阳离子交换层析。在另一个实施方式中，纯化采用 MMA 离子交换层析。在另一个实施方式中，纯化采用 HS-MMA 两步层析。

真核表达系统表达的乳头瘤病毒 L1 蛋白能自发装配成病毒样颗粒，但具有表达量低不易规模化生产的缺点。

各型别 HPV 的 L1 蛋白的序列可以从 <https://www.uniprot.org> 方便地获得。每一型别的 HPV L1 可以来源于不同的毒株，因而其氨基酸序列有多个版本，其中任何一个版本的天然序列都可以用于本发明，本发明的构思和设计过程中，所用某一给定型别的 HPV L1 蛋白序列有可能不同于实施例中使用的序列，但是这种差异不影响发明人的判断和结论。

本领域技术人员普遍认为 L1 蛋白的 C 端不含有主要中和抗原表位，因此试图通过截短 HPV L1 蛋白的 C 端提高表达量，例如葛兰素公司的美国专利 US6361778B1 中，HPV16 L1 蛋白 C 端截短 1-34 个氨基酸，优选 26 个氨基酸，声明 VLP 的产量增加许多倍，最好至少增加 10 倍，特别是大约 10 到 100 倍。受此启发，发明人尝试将 HPV 16 型 L1 的 C 端截短 31 个氨基酸，命名为 HPV16 L1 (1-474)。但其蛋白表达量高但蛋白可溶性差，难以提取纯化（见对比例）。

这种截短引起的蛋白可溶性差有可能是 C 端的核定位序列的缺

失造成的,本发明并不受限于此推测。发明人在研究和生产过程中发现 HPV 16 型 L1 蛋白、HPV 28 型 L1 蛋白、HPV 33 型 L1 蛋白、HPV 59 型 L1 蛋白和 HPV 68 型 L1 蛋白相较于其他型别的 L1 蛋白表达量和可溶性较好,受此启发,发明人用表达量和可溶性较好型别的 L1 蛋白 C 端替换不易提取或表达量低的 HPV 型别的 C 端。即发明人构建了这样一种嵌合蛋白:自其 N 末端至 C 末端方向包含衍生于第一型别乳头瘤病毒 L1 蛋白(例如 HPV L1 蛋白)的 N 端片段和衍生于第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白(例如 HPV L1 蛋白)的 C 端片段,前者提供第一型别乳头瘤病毒(例如 HPV)的免疫原性,后者提供表达量和可溶性较好的特性。两者可以直接连接也可以通过接头连接。

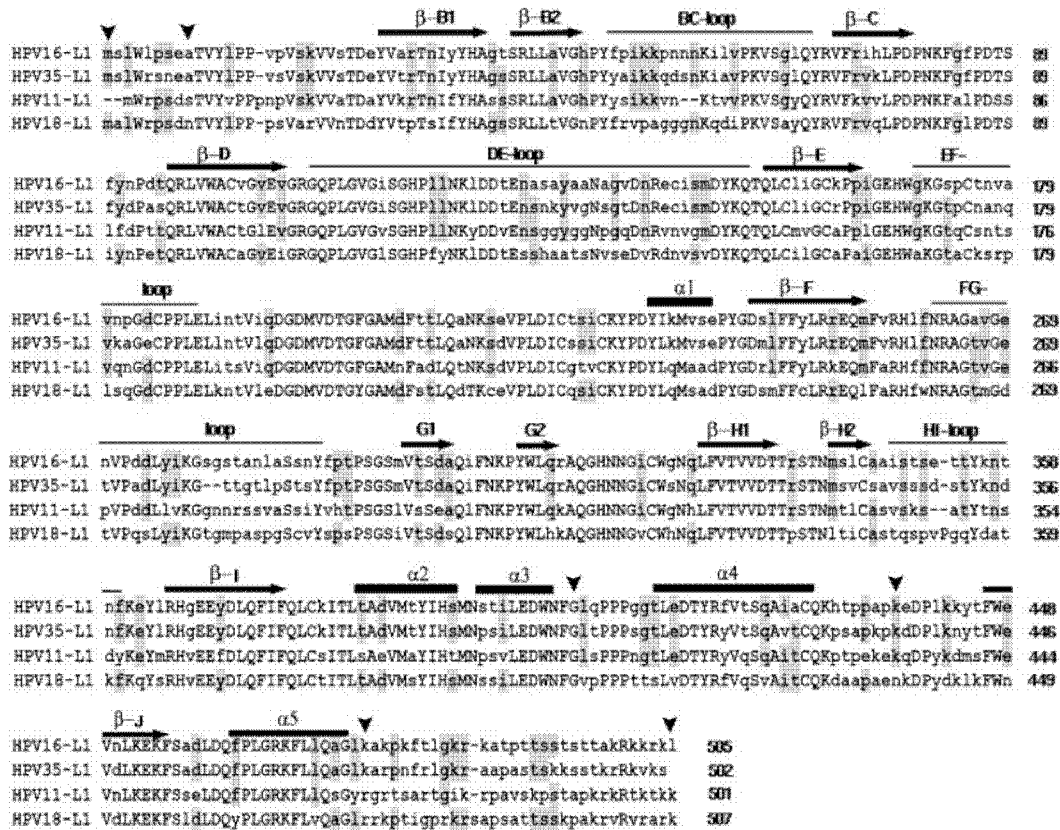
为保持第一型别 HPV L1 蛋白的免疫原性,以及保证其能够形成 VLP,发明人确定了合适的 HPV L1 蛋白的 N 端片段的长度。以下报道涉及常见 HPV 亚型的表位研究:

Sunanda Baidya 等人报道,L1 蛋白的表位 48EEYDLQFIFQLCKITLTA65, 45RHGEEYDLQFIFQLCKITLTA65, 63LPDPNKF69, 79PETQRLVWAC88, 36PVPQGQYDA43, 77YNPETQRLVWAC88, 188DTGYGAMD195, 36PVPQGQYDATK45, 45KQDIPKVSAYQYRVFRV61, 130RDNVSVQDYKQTQLCI144 and 49YSRHVEEY DLQFIF62 可以用作设计 HPV16 和 18 型疫苗的工具(参见 Epitope design of L1 protein for vaccine production against Human Papilloma Virus types 16 and 18, Bioinformation 13(3):86-93 March 2017,通过引用全部并入本文)。

Katharina Slupetzky 等人报道 HPV-16 的 aa 282-286 及 351-355 附近的区域对于中和表位有贡献,而且后者是免疫优势位点(参见 Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops, Journal of General Virology (2001), 82, 2799-2804,通过引用全部并入本文)。

Brooke Bishop 等人制备了 HPV11、16、18 和 35 L1 蛋白的以下 3 种变体:其 N 端 9 个氨基酸缺失、 $\alpha 4$ (对应于 HPV16 的 404-436

位氨基酸残基)缺失、其 C 端 31 个氨基酸缺失，报道前两者不能组装成 VLP，但是未报道后者有此现象



5

(Crystal Structures of Four Types of Human Papillomavirus L1 Capsid Proteins UNDERSTANDING THE SPECIFICITY OF NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES , The Journal of Biological Chemistry, 282,31803-31811。通过引用全部并入本文)。

10 各型别的 HPV L1 蛋白的 α 螺旋、 β 折叠片各个 Loop 区都可以通过本领域常用的序列分析软件方便地确定。其中 α 螺旋区包含 $\alpha 1$ 区、 $\alpha 2$ 区、 $\alpha 3$ 区、 $\alpha 4$ 区和 $\alpha 5$ 区。

发明人对 14 种型别 (6 型、11 型、16 型、18 型、31 型、33 型、35 型、39 型、45 型、51 型、52 型、56 型、58 型和 59 型) 的 HPV
15 L1 蛋白进行序列比对，然后根据如上引用的文献 (Crystal Structures of Four Types of Human Papillomavirus L1 Capsid Proteins UNDERSTANDING THE SPECIFICITY OF NEUTRALIZING

MONOCLONAL ANTIBODIES, The Journal of Biological Chemistry, 282,31803-31811) 进行二级结构预测, 结果如下所示, 其中向下的箭头之间的部分对应于该文献中涉及的为制备变体而缺失的区域。

HPV6-L1	---MWRPSDSTVYVPPNPNVSKVVA TDAYVTRTNI F YHASSRLLAVGHYPYFS IKRA---	54
HPV11-L1	---MWRPSDSTVYVPPNPNVSKVVA TDAYVVRTNIF YHASSRLLAVGHYPYFS IKKV---	54
HPV52-L1	MSVWRPSEATVYLP--PVPVSKVVS TDEYVSRYS IYYYAGSSRLLTVGHYPYFS IKNTSSGN	59
HPV58-L1	MSVWRPSEATVYLP--PVPVSKVVS TDEYVSRYS IYYYAGSSRLLAVGNPYFS IKSP--NN	57
HPV33-L1	MSVWRPSEATVYLP--PVPVSKVVS TDEYVSRYS IYYYAGSSRLLAVGHYPYFS IKNP--TN	57
HPV31-L1	MSLWRPSEATVYLP--PVPVSKVVS TDEYVTRTNI YHAGSARLLTVGHYPYFS IPKS--DN	57
HPV16-L1	MSLWLPSEATVYLP--PVPVSKVVS TDEYVARTNI YHAGTSRLLAVGHYPYFP IKKP--NN	57
HPV35-L1	MSLWRSNEATVYLP--PVPVSKVVS TDEYVTRTNI YHAGSSRLLAVGHYPYAIKKQ--DS	57
HPV51-L1	MALWRTNDSKYLP--PAPVSRIVNTEEYI TRTG IYYYAGSSRLLTVGHYPYFP IKP----T	55
HPV56-L1	MATWRPSENKYLP--PTPVSKVVA TDSYVVKRTSIF YHAGSSRLLAVGHYPYVSVTR----D	55
HPV39-L1	MAMWRSSDSMVYLP--PPSVAKVVNTDDYVTRTG IYYYAGSSRLLTVGHYPYFKV--GM--NG	56
HPV59-L1	MALWRSSDNKVYLP--PPSVAKVVS TDEYVTRTS IF YHAGSSRLLTVGHYPYFKV--PK--GG	56
HPV18-L1	MALWRTNDSKYLP--PPSVARVVNTDDYVTRTS IF YHAGSSRLLTVGNPYFRV--PA--GG	56
HPV45-L1	MALWRTNDSKYLP--PPSVARVVNTDDYVSRYS IF YHAGSSRLLTVGNPYFRV--PA--GA	57
HPV6-L1	-NKTIVPKVSGYQYRVFKVVLDPDNKFFALPDS SLPDPTTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	113
HPV11-L1	-NKTIVPKVSGYQYRVFKVVLDPDNKFFALPDS SLPDPTTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	113
HPV52-L1	GKKVLPVKVSGLQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEIGRGQPLGVG	119
HPV58-L1	NKKVLPVKVSGLQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEIGRGQPLGVG	117
HPV33-L1	AKKLLVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEIGRGQPLGVG	117
HPV31-L1	PKKIVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEIGRGQPLGVG	117
HPV16-L1	-NKILVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	116
HPV35-L1	-NKIAVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	116
HPV51-L1	STRAAIPKVSARQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	115
HPV56-L1	NTKTNIPKVSAYQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGAG	115
HPV39-L1	GRKQDIPKVSAYQYRVFRVRLPDPNKF SFPDASLYNPE TQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	116
HPV59-L1	NGRQDVPKVSAYQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	116
HPV18-L1	GAKQDIPKVSAYQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVG	116
HPV45-L1	GAKQAVPKVSAYQYRVFRVRLPDPNKF GPPDTSFYNPDTQRLVWACTGLEVGRGQPLGIG	117
HPV6-L1	VSGHPLLNKYDDVENS G--SGGNPGQDNRRVNVGM DYKQTQLCMVGCAPPLGEHWGKGTQCS	172
HPV11-L1	VSGHPLLNKYDDVENS GGGYGNPGQDNRRVNVGM DYKQTQLCMVGCAPPLGEHWGKGTQCS	173
HPV52-L1	ISGHPLLNKFDDTETS NKYAGKPGIDNRE CLSMDYKQTQLCLIGCKPP TGEHWGKGTQCS	179
HPV58-L1	VSGHPLLNKFDDTETS NKYPAQPGSDNRE CLSMDYKQTQLCLIGCKPP TGEHWGKGTQCS	177
HPV33-L1	ISGHPLLNKFDDTETGNKYPGQPGADNRE CLSMDYKQTQLCLIGCKPP TGEHWGKGTQCS	177
HPV31-L1	ISGHPLLNKFDDTENS NKYAGGPGIDNRE CLSMDYKQTQLCLIGCKPP TGEHWGKGTQCS	177
HPV16-L1	ISGHPLLNKLDDTENASAYAANAGVDNRE CLSMDYKQTQLCLIGCKPP TGEHWGKGTQCS	176
HPV35-L1	ISGHPLLNKLDDTENS NKYVGNSTDNRE CLSMDYKQTQLCLIGCKPP TGEHWGKGTQCS	176
HPV51-L1	LSGHPFLNKYDDTENSRIANGNAQQDVRDNTSVDNKQTQLCLIGCAPP TGEHWGKGTQCS	175
HPV56-L1	LSGHPFLNKLDDTES SNLANNVIEDSRDNISVDNKQTQLCLIGCAPP TGEHWGKGTQCS	175
HPV39-L1	ISGHPFLNKLDDTENS PFS--STNKDSRDNVSDYKQTQLCLIGCAPP TGEHWGKGTQCS	175
HPV59-L1	LSGHPFLNKLDDTENS HVASVDTKDRDNVSDYKQTQLCLIGCAPP TGEHWGKGTQCS	176
HPV18-L1	LSGHPFLNKLDDTES SHAATSNVSDVDRDNVSDYKQTQLCLIGCAPP TGEHWGKGTQCS	176
HPV45-L1	LSGHPFLNKLDDTES AHAATAVITQDVRDNVSDYKQTQLCLIGCAPP TGEHWGKGTQCS	177
HPV6-L1	NTPVQAGDCPPELINTSVIQDGMVDTGFGAMNFADLQTNKSDVPLD ICGTTCCKYPDYLQ	232
HPV11-L1	NTSVQAGDCPPELINTSVIQDGMVDTGFGAMNFADLQTNKSDVPLD ICGTTCCKYPDYLQ	233
HPV52-L1	NNSGNPGDCPPELQINSV IQDGMVDTGFGAMDFTLQANKSDVPLD ICSSVCKYPDYLQ	239
HPV58-L1	NNA--AATDCPPELFLNS I IEDGDMVDTGFGAMDFTLQANKSDVPLD ICNSTCKYPDYLQ	236
HPV33-L1	NAA--PANDCPPELINTSV I IEDGDMVDTGFGAMDFTLQANKSDVPLD ICGSTCKYPDYLQ	236
HPV31-L1	NNATTPGDCPPELKN SVIQDGMVDTGFGAMDFTLQANKSDVPLD ICNSTCKYPDYLQ	237
HPV16-L1	KVAVNPGDCPPELINTSV IQDGMVDTGFGAMDFTLQANKSEVPLD ICSTCKYPDYLQ	236
HPV35-L1	ANQVKA GDCPPELINTSV IQDGMVDTGFGAMDFTLQANKSDVPLD ICSSVCKYPDYLQ	236
HPV51-L1	NTPVPPGDCPPELVSSV IQDGMVDTGFGAMDFAALQATKSDVPLD ISGVCCKYPDYLQ	235
HPV56-L1	STQVTTGDCPPELINTSV I IEDGDMVDTGFGAMDFAALQATKSDVPLD ISGVCCKYPDYLQ	235
HPV39-L1	PNNVSTGDCPPELVNTP I IEDGDMVDTGFGAMDFAALQATKSDVPLD ICSSVCKYPDYLQ	235
HPV59-L1	PTTVVQAGDCPPELINTSV I IEDGDMVDTGFGAMDFAALQATKSDVPLD ICSSVCKYPDYLQ	236
HPV18-L1	SRPLSQGDCPPELKN SVIQDGMVDTGFGAMDFAALQATKSDVPLD ICSSVCKYPDYLQ	236
HPV45-L1	PAQLQAGDCPPELKN SVIQDGMVDTGFGAMDFAALQATKSDVPLD ICSSVCKYPDYLQ	237
HPV6-L1	MAADPYGDRLFFFLRKEQMFARHFFN RAGEVGEVDPDTLTIKGS--GNRTSVGSS IYVNT	290
HPV11-L1	MAADPYGDRLFFFLRKEQMFARHFFN RAGTVGEVPPDDLLVKG--NNRSSVASS IYVHT	291
HPV52-L1	MASEPYGDSLFFFLRREQMFVRHFFN RAGTLGDPVPGDLYIQGNSGNTATVQSSAFFPT	299
HPV58-L1	MASEPYGDSLFFFLRREQMFVRHFFN RAGTLGAEVPPDDLYIKGS--GNTAVIQSSAFFPT	294
HPV33-L1	MTSEPYGDSLFFFLRREQMFVRHFFN RAGTLGAEVPPDDLYIKGS--GTTASIQSSAFFPT	294
HPV31-L1	MVAEPYGDTLFFFLRREQMFVRHFFN RSGTVGESVPTDLYIKGS--GSTATLANS TYFPT	295

HPV16-L1	MYSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAAGAVGENVPDDLVIKGS---GSTANLASSNYFPT	294
HPV35-L1	MYSEPYGDMLEFFYLRRQMFVRHLFNRAAGTVGTEVPADLYIKGT--T---GTLPSTSYFPT	292
HPV51-L1	MSADTYGNSMFFHLRREQIFARHYYNKLVGVGEDIPNDVYIKGSG--NGRDPIESYIYSAT	294
HPV56-L1	MSADAYGDSMFFYLRRQQLFARHYFNRAAGVGETI PAELYIKGS--NGREPPSSVYVAT	293
HPV39-L1	MSADVYGDMSMFFCLRREQLFARHFWRNRRGGMVGDAIPAQLYIKGT--DIRANPGSSVYVCS	293
HPV59-L1	MSADAYGDSMFFCLRREQVYFARHFWRNRSCTMGDQLPESLYIKGT--DIRANPGSILYSPS	294
HPV18-L1	MSADPYGDMSMFFCLRREQLFARHFWRNRAAGTMDTVPQSLYIKGT--GMRASPSCVYVSPS	294
HPV45-L1	MSADPYGDMSMFFCLRREQLFARHFWRNRAAGVMGDTVPTDLYIKGTSANMRETPGSCVYVSPS	297

HPV6-L1	PSGSLVSSQAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICWGNQLFVTVVDITRSTNMTLCASVT--TSS	348
HPV11-L1	PSGSLVSSQAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICWGNHLFVTVVDITRSTNMTLCASVS--KSA	349
HPV52-L1	PSGSMVTSESQLFNKPYPWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDITRSTNMTLCAEVK--KES	357
HPV58-L1	PSGSLVTSQQLFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDITRSTNMTLCTEVT--KEG	352
HPV33-L1	PSGSMVTSESQLFNKPYPWLQRAQGHNNGICWGNQVFPVTVVDITRSTNMTLCTQVT--SDS	352
HPV31-L1	PSGSMVTSDAQIFNKPYPWMLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDITRSTNMSVCAAIAAN--SDF	354
HPV16-L1	PSGSMVTSDAQIFNKPYPWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDITRSTNMSLCAAIST--SET	353
HPV35-L1	PSGSMVTSDAQIFNKPYPWLQRAQGHNNGICWSNQLFVTVVDITRSTNMSVCSAVSS--SDS	351
HPV51-L1	PSGSMITSDSQIFNKPYPWLHRAQGHNNGICWNNQLFITVDITRSTNLTISTATAA--VSP	353
HPV56-L1	PSGSMITSEAQLFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDITRSTNMTISTATE--QLS	351
HPV39-L1	PSGSMVTSDSQLFNKPYPWLHKAQGHNNGICWHNQLFVTVVDITRSTNFLTSTIESSIPS	353
HPV59-L1	PSGSMVTSDSQLFNKPYPWLHKAQGHNNGICWHNQLFVTVVDITRSTNLSVCASTISSIPN	354
HPV18-L1	PSGSMVTSDSQLFNKPYPWLHKAQGHNNGICWHNQLFVTVVDITRSTNLTICASTQSPVPG	354
HPV45-L1	PSGSMITSDSQLFNKPYPWLHKAQGHNNGICWNNQLFVTVVDITRSTNLTICASTQNPVFN	357

HPV6-L1	TYTNSDYKEYMRHVEEYDLQFIFQLCSITLSAEVMAYIHTMNPVLELDWNFGLSPPNGT	408
HPV11-L1	TYTNSDYKEYMRHVEEYDLQFIFQLCSITLSAEVMAYIHTMNPVLELDWNFGLSPPNGT	409
HPV52-L1	TYKNEFKEYLRHGEFFDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHKMDATILEDWQFGLTPPPSAS	417
HPV58-L1	TYKNDNFKEYVRHVEEYDLQFVFLCKITLTAEIMTYIHTMDSNILEDWQFGLTPPPSAS	412
HPV33-L1	TYKNEFKEYIRHVEEYDLQFVFLCKITLTAEVMTYIHAMNPLELDWQFGLTPPPSAS	412
HPV31-L1	TFKSSNFKEYLRHGEFFDLQFIFQLCKITLSADIMTYIHSMNPAILEDWNFGLTPPPSGS	414
HPV16-L1	TYKNTNFKEYLRHGEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGGT	413
HPV35-L1	TYKNDNFKEYLRHGEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNPSILEDWNFGLTPPPSGT	411
HPV51-L1	TFTPSNFKQYIRHGEYELQFIFQLCKITLTTEVMAYLHTMDPTILEGWNFGLTPPPSAS	413
HPV56-L1	KYDARKINQYL RHVEEYDLQFVFLCKITLSAEVMAYLIHNMNANILEDWNIGLSPPVATS	411
HPV39-L1	TYDPSKFKKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTITLTADVMSYIHTMNSSILEDWNFVAVAPPSPAS	413
HPV59-L1	VYTPTSFKKEYARHVEEYDLQFIFQLCKITLTTEVMSYIHNMTTILEDWNFGVTPPPTAS	414
HPV18-L1	QYDATKFKQYSRHVEEYDLQFIFQLCTITLTADVMSYIHSMNSSILEDWNFGVPPPTTS	414
HPV45-L1	TYDPTKPKMYSRHVEEYDLQFIFQLCTITLTAEVMSYIHSMNSSIENWNFGVPPPTTS	417

HPV6-L1	LEDTYRYVQSQAITCQKPTPEKEKDPYKRLSFWVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLQSG	468
HPV11-L1	LEDTYRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKMSFWVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLQSG	469
HPV52-L1	LEDTYRFVTSQAITCQKNTPPKGEDPLKDYHFWVDLKEKFSADLDQYPLGRKFLQAG	477
HPV58-L1	LQD TYRFVTSQAITCQKTAPPKEKEDPLNKYTFWVNLKEKFSADLDQYPLGRKFLQAG	472
HPV33-L1	LQD TYRFVTSQAITCQKTYPPKEKEDPLGKYTFWVVDLKEKFSADLDQYPLGRKFLQAG	473
HPV31-L1	LEDTYRFVTSQAITCQKSAPQPKEDPKDYVFWVNLKEKFSADLDQYPLGRKFLQAG	474
HPV16-L1	LEDTYRFVTSQAITCQKHTPAPKEDPLKKYTFWVNLKEKFSADLDQYPLGRKFLQAG	473
HPV35-L1	LEDTYRYVTSQAIVTCQKPSAPKPKDPLKNYTFWVVDLKEKFSADLDQYPLGRKFLQAG	471
HPV51-L1	LEDAYRFVNRNAAATSCQKDTPPQAKPDLAKYKFWVDLKERFSLDLDQYPLGRKFLQVQ	473
HPV56-L1	LEDKYRYVRSQAITCQREQPPTEKQDPLAKYKFWVDNLQDSFSTDLQYPLGRKFLMQLG	471
HPV39-L1	LYD TYRYLQSAAITCQKDAPEKEDPYDGLKFWVDLREKFSLELDQYPLGRKFLQAR	473
HPV59-L1	LYD TYRFVQSAAVTCQKDTAPPVQDPYDKLFWVDLKERFADLDQYPLGRKFLQAG	474
HPV18-L1	LYD TYRFVQSVAVTCQKDAAPAENKDPYDKLFWVDLKERFSLDLDQYPLGRKFLVQAG	474
HPV45-L1	LYD TYRFVQSVAVTCQKDTTPEKQDPYDKLFWVDLKEKFSSELDQYPLGRKFLVQAG	477

HPV6-L1	YRGRSSIRTGVKRPVASKASAAPKRKRKTKR---	500
HPV11-L1	YRGRTSARTGIKRPVASKPSTAPKRKRKTKK---	501
HPV52-L1	LQARPKLKRPAASSAPRTST---KKK-KYKR---	503
HPV58-L1	LKAKPRLKRSAPITRAP-ST---KRK-KYKK---	498
HPV33-L1	LKAKPKLKRAPTSRTSSA---KRK-KYKK---	499
HPV31-L1	YRARPKFKAGKRSAPSASTTTPAKRKRKTKK---	504
HPV16-L1	LKAKPKFTLGKRKATPTTSSSTSITAKRKRKRL---	505
HPV35-L1	LKARPFRGLKRAAPASTSKKSSTKRKRKYS---	502
HPV51-L1	VQRKPRPGLKRPASSASSSSSSAKRKRKVKK---	504
HPV56-L1	TRSKPAVATSKKRSAPTSTS--TPAKRKR---	499
HPV39-L1	VRRRP TIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS---	505
HPV59-L1	ARPKPTIGPRKRAAPASTSPSKRKRKRKSSRK---	508
HPV18-L1	LRRKPTIGPRKRSAASATSSKPAKRVRVARK---	507
HPV45-L1	LRRRP TIGPRKRPAASTSTASRPAKRVRIRSK---	510

除发明人所用的序列对比的方法之外，可用于预测的蛋白质二

级结构预测软件包括但不限于：

1. JPred: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/index.html>

2. ProtPredicct: <http://predictprotein.org>

3. PsiPred: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>

5 4. SCRATCH-1D: <http://download.igb.uci.edu>

5. Nnpredict: <http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict>

6.

Predictprotein: <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/SOPMA>

<http://www.ibcp.fr/predict.html>

10 7.

SSPRED: http://www.embl-heidelberg.de/sspred/ssprd_info.html。

在本发明的一个实施方式中，发明人以以下方式确定衍生于第一型别的 HPV L1 蛋白的 N 端片段的长度：将 L1 蛋白天然序列在其 $\alpha 5$ 区及其附近区域截短，保留从其 N 末端至 $\alpha 5$ 区域新产生的 C 末
15 端的序列。如此截短的序列可以保证其具有本型别的免疫原性，且能够形成 VLP。

衍生于第一型别的 HPV L1 蛋白的 N 端片段还可以进一步改造，以保证其具有本型别的免疫原性，且能够形成 VLP 为限。

20 发明人以以下方式确定了衍生于第二型别的 HPV L1 蛋白的 C 端片段的长度。将 L1 蛋白天然序列在其 $\alpha 5$ 区及其附近区域截短、保留从其 $\alpha 5$ 区域新产生的 N 末端至 C 末端序列。如此截短的序列不具有主要中和抗原表位，不干扰形成的嵌合蛋白的免疫原性。

衍生于第二型别的 HPV L1 蛋白的 C 端片段还可以进一步突变、缺失和/或添加，优选保留其至少一个核定位序列。Yang 等人预测
25 了 107 种 HPV 亚型的核定位序列（Yang et al. Predicting the nuclear localization signals of 107 types of HPV L1 proteins by bioinformatic analysis. *Geno. Prot. Bioinfo.* Vol. 4 No. 1 2006 通过引用全部并入本文），各型别的 HPV L1 蛋白的核定位序列可以通过本领域常用的序列分析软件方便地确定。

上述 N 端片段和 C 端片段的连接发生在前者的新产生的 C 末端和后者新产生的 N 末端。可以是直接连接也可以是通过接头连接。将连接点视为原点，则在原点的 N 端侧为负，而其 C 端侧为正。

如下示出 HPV6 L1 蛋白的 453-469 位氨基酸序列、以及多个型别 HPV L1 蛋白的与之相对应的一段序列。可以看出这些序列高度相似。这段序列和 $\alpha 5$ 区有重合。括号内数字表示所列出序列的最后一位氨基酸的位置，其中对于 HPV 45 型，一些 HPV 45 型毒株的 L1 蛋白的 N 端存在额外的 26 个氨基酸，而在另一些 HPV 45 型毒株的 L1 蛋白的 N 端不存在所述额外的 26 个氨基酸，所以以 (478)+26 表示。

HPV6 ELDQYPLGRKFLLQSGY(469)

HPV11 ELDQFPLGRKFLLQSGY(470)

HPV16 DLDQFPLGRKFLLQAGL(474)

HPV18 DLDQYPLGRKFLVQAGL(475)

15 HPV31 DLDQFPLGRKFLLQAGY(475)

HPV35 DLDQFPLGRKFLLQAGL(472)

HPV39 ELDQFPLGRKFLLQARV (474)

HPV45 DLDQYPLGRKFLVQAGL(478)+26

HPV51 DLDQFALGRKFLLQVGV(474)

20 HPV52 DLDQFPLGRKFLLQAGL(478)

HPV56 DLDQFPLGRKFLMQLGTRS(474)

HPV58 DLDQFPLGRKFLLQSGL(473)

HPV33 DLDQFPLGRKFLLQAGL(473)

25 KAKPKLKRAAPTSTRTSSAKRKKVKK 其中, 480-481 的 KR 和 493-496 位的 KRKK 是核定位序列。

HPV59

DLDQFPLGRKFLLQLGA(475)RPKPTIGPRKRAAPAPTSTPSPKRVKRRKSSRK, 其中, 484-486 的 RKR 和 498-504 的 KRVKRRK 是核定位序列。

在本发明的一个实施方式中，发明人借助多个 HPV 型别之间的 $\alpha 5$ 区及其附近区域的序列相似性，便利地完成了不同型别之间的 L1 蛋白的 C 端替换。

在本发明的最优选的实施方式中，发明人注意到各个型别的 HPV L1 蛋白都在相似的位置具有一段四肽 RKFL，更有利的情形是一段六肽 LGRKFL。发明人巧妙地利用这一高度保守的序列，将嵌合蛋白的连接点设计在这一段寡肽的任一氨基酸位点。自一个方面看来，自嵌合蛋白 N 末端起至 RKFL 或 LGRKFL 止与衍生于第一型别的 HPV L1 蛋白的 N 端片段的序列相同，而从另一方面看来自 RKFL 或 LGRKFL 起至嵌合蛋白的 C 末端止，与衍生于第二型别的 L1 蛋白的 C 端片段的序列相同。

如此产生的嵌合蛋白保持与天然 HPV L1 蛋白高度相似性，可以预期在生产乃至此后的医疗或预防过程中，都会有良好的表现。

本领域的技术人员会理解，因为同一型别的 HPV 有不同的毒株，因此其天然序列不同，利用不同毒株构建而成的嵌合蛋白亦落入本发明。

本领域的技术人员会理解，因为不同型别 HPV L1 的高度相似性，如果在嵌合蛋白构建过程中，将衍生于第一型别 HPV L1 蛋白的 N 端片段向 C 末端延伸更多的氨基酸残基，或者是将衍生于第二型别的 HPV L1 蛋白的 C 端片段向 N 末端延伸更多的氨基酸残基，亦有可能因相应位点上氨基酸的相同或相似，形成与本发明结构一致的嵌合蛋白。如此形成的嵌合蛋白亦落入本发明。

本领域的技术人员会理解，在以上描述的实施方式的嵌合蛋白的基础上，会通过氨基酸残基的突变、缺失和/或添加形成嵌合蛋白的变体。这些变体有可能具有第一型别的 HPV L1 蛋白的免疫原性、可以形成 VLP，且具有良好的产量和可溶性。如此形成的嵌合蛋白亦落入本发明。

发明的有益效果

目前普遍用于生产病毒样颗粒的表达系统分为真核表达系统和原核表达系统。真核表达系统表达的乳头瘤病毒 L 蛋白能自发装配成病毒样颗粒，但具有表达量低不易规模化生产的缺点。原核表达系统表达的乳头瘤病毒 L 蛋白的天然构象往往被破坏，需要后期进行体外处理才能得到病毒样颗粒，而且产量较低，很难进行产业化。

本发明将乳头瘤病毒（例如人乳头瘤病毒）L 蛋白的 C 端进行改造，例如替换为 HPV 16 型 L1 蛋白、HPV 28 型 L1 蛋白、HPV 33 型 L1 蛋白、HPV 59 型 L1 蛋白或 HPV 68 型 L1 蛋白中的 C 端片段，可以在表达系统（例如宿主细胞，例如昆虫细胞）中提高乳头瘤病毒 L 蛋白的表达量和可溶性。这可用于疫苗例如 HPV 疫苗的大规模生产。

发明人自行发现 HPV 16 型 L1 蛋白、HPV 28 型 L1 蛋白、HPV 33 型 L1 蛋白、HPV 59 型 L1 蛋白和 HPV 68 型 L1 蛋白相较于其他型的 L1 蛋白表达量和可溶性较好，且发现所述增加的蛋白表达量和可溶性取决于所述 HPV L1 蛋白的 C 端序列。在 107 型 HPV L1 蛋白中，大部分在 C 端具有核定位序列，且 C 端序列具有一定的相似性。

对于目前无法表达、表达量非常低或表达后不可溶的乳头瘤病毒 L 蛋白，将其 C 端片段替换为 HPV 16 型 L1 蛋白、HPV 28 型 L1 蛋白、HPV 33 型 L1 蛋白、HPV 59 型 L1 蛋白或 HPV 68 型 L1 蛋白中的 C 端片段，使得原本表达量极低或不可溶的乳头瘤 L 蛋白的可溶性表达和后续纯化成为可能。这可以用于更多价疫苗（例如 HPV 疫苗）的大规模生产，使得更全面地预防多种乳头瘤病毒，特别是 HPV 的感染成为可能。

HPV 31 型 L1 蛋白在昆虫细胞中表达量低且可溶性差，不利于后续纯化和疫苗的生产。此外，在酵母细胞中，因为无法正确形成二硫键，HPV 31 型 L1 蛋白装配成的病毒样颗粒缺乏良好的构象。

本发明的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白相比于未改造之前的 HPV 31 型 L1 蛋白在昆虫细胞中的表达量和可溶性大大提高。可用于 HPV 31 型疫苗的大规模生产。此外，嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白在昆虫细胞

中可以正确形成二硫键而装配为具有良好构象的 HPV 31 型病毒样颗粒。这可以提高 HPV 31 型病毒样颗粒的免疫原性，产生更好的免疫应答。

5 定义

除非另有说明，本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属的技术领域的普通技术人员通常理解的含义。为方便地理解本发明，以下引述下列术语的通常含义。

当用于本文和所附权利要求书中时，单数形式“一个/种”、“另一个/种”和“所述/该”包括复数指代对象，除非上下文明确地另有指示。除非另有明确说明，否则术语“包括/包含/具有”、“例如”等旨在传达包含而非限制。

术语“免疫原性”是指某种物质，例如蛋白质或多肽刺激免疫应答的能力，即刺激产生抗体，尤其是产生体液或者刺激细胞介导的应答的能力。

术语“抗体”指能结合抗原的免疫球蛋白分子。抗体可以是多克隆混合物或单克隆。抗体可以是源于天然来源或源于重组来源的完整的免疫球蛋白或可以是完整的免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体可以存在于多种形式，包括例如 Fv、Fab'、F(ab')₂ 以及以单链存在。

术语“抗原性”是指某种物质，例如蛋白质或多肽产生与其特异性结合的抗体的能力。

术语“表位”包括能够特异性结合至抗体或 T 细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团（例如氨基酸或糖侧链，或其组合）组成，并且通常具有特定三维结构特征以及特定的电荷特征。

术语“亚型”或“型别”可在本文中互换使用，表示所述病毒抗原的遗传变体以使得一个亚型区别于一个不同亚型地被免疫系统识别。例如，HPV 16 在免疫学上可区别于 HPV 33。

术语“HPV L1 蛋白”如本文所用，术语“HPV”和“人乳头状瘤病毒”是指乳头状瘤病毒科的无包膜双链 DNA 病毒。它们的基因组是圆形的，并且大小约为 8 千碱基对。大多数 HPV 编码八种主要蛋白，六种位于“早期”区域(E1-E2)，并且两种位于“晚期”区域(L1(主要衣壳蛋白)和 L2(次要衣壳蛋白))。已经鉴定了超过 120 种 HPV 类型，并且它们由数字标出(例如，HPV-16、HPV-18 等)。

术语“HPV”或“HPV 病毒”指乳头状瘤病毒科的乳头状瘤病毒，为无包膜 DNA 病毒，该病毒基因组为双链闭环 DNA，大小约为 8kb，通常可以分为三个区域：①早期区(E)，含有编码 E1、E2、E4~E7 病毒复制、转录及转化有关的非结构蛋白的 6 个开放阅读框，以及 E3 和 E8 开放阅读框；②晚期区(L)含有编码主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 的阅读框；③长调控区(LCR)不编码任何蛋白，但具有复制的起源以及多个转录因子结合位点。

术语“HPV L1 蛋白”及“HPV L2 蛋白”指由 HPV 基因的晚期区(L)编码，在 HPV 感染周期中晚期合成的蛋白。L1 蛋白质是主要的衣壳蛋白并且具有 55-60kDa 的分子量。L2 蛋白质是次要的衣壳蛋白质。72 个 L1 五聚体构成二十面体 HPV 病毒粒子的外壳，包裹闭环双链 DNA 微染色体。L2 蛋白质位于 L1 蛋白质内侧。

术语“病毒样颗粒”是含有某种病毒的一个或多个结构蛋白的空心颗粒，没有病毒核酸。

“HPV 假病毒”系利用 HPV VLP 的非特异包裹核酸的特性，通过细胞内表达的 HPV L1 和 L2 组成的 VLP 包裹游离的 DNA 或导入外源质粒形成。是理想的 HPV 体外中和实验模型。

“假病毒中和法”是评价抗体的中和活性的一种方法，将免疫后的动物血清与一定量的假病毒孵育后再侵染细胞，细胞会随着血清中中和抗体的增加而减少，在一定的范围内可存在线性负相关，因此可以通过检测表达细胞数的变化来评价血清中抗体的中和活性。

术语“其片段”或“其变体”指根据本发明的部分核苷酸或氨

氨基酸序列被缺失、插入和/或取代。优选地，本发明提供的多肽的片段或变体能在动物或人体中引发体液和/或细胞免疫应答。

术语“嵌合”意指，源自不同的亲本分子的多肽或核苷酸序列分别经由酰胺键或 3', 5'-磷酸二酯键连接在一起。优选的，不被
5 额外的接头序列分隔开，而是直接彼此相邻。

术语“截短”意指通过从多肽的 N 和/或 C-末端除去一个或多个氨基酸或者缺失一个或多个多肽内部的氨基酸。

术语“核定位序列”为可引导蛋白质进入细胞核的氨基酸序列。在一些 HPV L1 蛋白中，两个紧密的碱性残基簇(即核定位序列)(例如一个是 KRKR、KRKK、KRKRK、KRKKRK、KRVKRRK 等，另一个是 KR、RKR、KRK 等)之间具有 10-14 个氨基酸的间隔区。上述碱性残基簇属于核定位序列。在另一些 HPV L1 蛋白中，核定位序列为精氨酸和/或赖氨酸形成的紧密的碱性残基簇。核定位序列包括但不限于如上所述碱性残基簇的实例。参见 Jun Yang 等，Predicting
10 the Nuclear Localization Signals of 107 Types of HPV L1 Proteins by Bioinformatic Analysis, Genomics, Proteomics & Bioinformatics Volume 4, Issue 1, 2006, Pages 34-41, 其全部内容通过引用并入本文。

术语“功能性变体”为某一多肽或蛋白经截短、突变、缺失和/或添加后仍然保持所需要的活性或特征的本体。

20 两条多肽或核酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的残基的数目占残基总数的百分比，且基于比较的分子中较小者的大小来计算。在计算同一性百分数时，将正在比较的序列以产生序列之间最大匹配的方式比对，通过特定算法解决比对中的空位(如果存在的话)。确定两个序列之间同一性的优选计算机程序方法包括，但不限于，GCG 程序包，包括 GAP、BLASTP、BLASTN 和 FASTA(Altschul 等人，1990, J.Mol.Biol.215: 403-410)。上述程序可以公开地从国际生物技术信息中心(NCBI)和其他来源得到。熟知的
25 Smith Waterman 算法也可用于确定同一性。

可以保守性置换非关键的氨基酸而不影响蛋白质的正常功能。

保守性置换意指用化学或功能相似的氨基酸置换氨基酸。提供相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。举例来说，在一些实施方式中，表 1-3 中提供的氨基酸组被认为是相互的保守性置换。

5 表 1 在某些实施方式中，被认为是相互保守性置换的氨基酸的所选组

酸性残基	D 和 E
碱性残基	K、R 和 H
亲水性不带电荷的残基	S、T、N 和 Q
脂肪族不带电荷的残基	G、A、V、L 和 I
非极性不带电荷的残基	C、M 和 P
芳香族残基	F、Y 和 W

表 2 在某些实施方式中，被认为是相互的保守性置换的氨基酸的其他所选组

组 1	A、S 和 T
组 2	D 和 E
组 3	N 和 Q
组 4	R 和 K
组 5	I、L 和 M
组 6	F、Y 和 W

表 3 在某些实施方式中，被认为是相互的保守性置换的氨基酸的其他所选组

组 A	A 和 G
组 B	D 和 E
组 C	N 和 Q
组 D	R、K 和 H
组 E	I、L、M、V
组 F	F、Y 和 W
组 G	S 和 T

组 H

C 和 M

术语“氨基酸”意指二十种常见的天然存在的氨基酸。天然存在的氨基酸包括丙氨酸 (Ala; A)、精氨酸 (Arg; R)、天冬酰胺 (Asn; N)、天冬氨酸 (Asp; D)、半胱氨酸 (Cys; C); 谷氨酸 (Glu; E)、谷氨酰胺 (Gln; Q)、甘氨酸 (Gly; G)、组氨酸 (His; H)、异亮氨酸 (Ile; I)、亮氨酸 (Leu; L)、赖氨酸 (Lys; K)、蛋氨酸 (Met; M)、苯丙氨酸 (Phe; F)、脯氨酸 (Pro; P)、丝氨酸 (Ser; S)、苏氨酸 (Thr; T)、色氨酸 (Trp; W)、酪氨酸 (Tyr; Y) 和缬氨酸 (Val; V)。

术语“佐剂”指一种增强免疫应答的化合物或混合物。特别的，疫苗可以包含佐剂。用于本发明的佐剂可以包括但不限于以下的一种或多种：含矿物佐剂组合物、油-乳佐剂、皂素佐剂制剂、细菌或微生物衍生物。

术语“载体”意指能够增殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及作为整合至已引入载体的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够引导该类载体以可操作方式连接的核酸的表达。

术语“宿主细胞”意指已引入外源核酸的细胞，以及这样的细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”（或“转化细胞”）、“转染体”（或“转染细胞”）或“感染体”（或“感染细胞”），其各自包括初代转化、转染或感染的细胞和由其衍生的后代。这样的后代在核酸含量上可能不与亲本细胞完全相同，并且可能含有突变。

施用量优选的为“预防性有效量”（本文预防可以被认为是治疗，两者可互换使用），其足以对个体显示出益处。

25 实施例

实施例 1: HPV31L1 C 端替换为 HPV33L1 C 端的嵌合基因的构建

1.1 用作模板的 pFB-HPV31L1 的构建

委托 Thermo Fisher 公司[原英潍捷基（上海）贸易有限公司]基因合成 HPV31L1 基因，且合成的序列两端分别具有 KpnI 和 XbaI 酶切位点，其序列见 SEQ ID NO: 5。通过 KpnI 和 XbaI 酶切位点将合成的基因片段与 pcDNA3 载体（销售商 Thermo Fisher）连接，得到含有编码 HPV31L1 1-504 个氨基酸的核苷酸序列的质粒 pcDNA3-HPV31-L1。

将得到的 pcDNA3-HPV31-L1 质粒进行 KpnI 和 XbaI 双酶切得到 HPV31L1（1-504）的基因的片段。再将该片段与 KpnI 和 XbaI 双酶切的 pFastBacTM1 载体（销售商 Thermo Fisher）进行连接，得到含 HPV31L1（1-504）基因片段的杆粒载体，命名为 pFB-HPV31L1。

1.2 用作模板的 pFB-HPV33L1 的构建

委托 Thermo Fisher 公司[原英潍捷基（上海）贸易有限公司]基因合成 HPV33L1 基因，且合成序列两端分别具有 KpnI 和 XbaI 酶切位点，基因片段序列见 SEQ ID NO: 6。通过 KpnI 和 XbaI 酶切位点将合成的基因片段与 pcDNA3 载体（销售商 Thermo Fisher）连接，得到含有编码 HPV33L1 1-499 位氨基酸的核苷酸序列的质粒 pcDNA3-HPV33-L1。

将得到的 pcDNA3-HPV33-L1 质粒进行 KpnI 和 XbaI 双酶切得到 HPV33L1（1-499）的基因的片段。再将该片段与 KpnI 和 XbaI 双酶切的 pFastBacTM1 载体（销售商 Thermo Fisher）进行连接，得到含 HPV33L1（1-499）基因片段的杆粒载体，命名为 pFB-HPV33L1。

1.3 pFB-HPV31L1: 33C 的构建

HPV31L1 C 端替换为 HPV33L1 C 端的嵌合基因：以构建成功的重组质粒 pFB-HPV31L1 为基因模板，用引物 F1 和 R1 扩增长度为 1444bp 基因片段，引物序列 F1 如 SEQ ID No: 7 所示，R1 如 SEQ ID No: 8 所示。

该基因片段包含编码 HPV31L1 的 1-475 氨基酸的基因片段、与 HPV33L1 的 474-499 氨基酸的基因片段重叠的 10 个碱基以及 KpnI 酶切位点(GGTAC[^]C)段，扩增的序列如 SEQ ID No: 9 所示：

PCR 扩增参数: 94°C 预变性 5min; 98°C 变性 10s、69°C 退火 15s、72°C 1kb/1min、进行 30 个循环; 72°C 延伸 5min; 16°C 结束。

以重组质粒 pFB-HPV33L1 为基因模板, 用引物 F2 和 R2, 扩增长度 101bp 的基因片段, 引物序列 F2 如 SEQ ID No: 10 所示, R2 如
5 SEQ ID No: 11 所示。

该基因片段含 HPV33L1 C 端的 26 个 (474-499) 氨基酸的基因片段、与 HPV31L1 的 1-475 氨基酸 C 端基因片段重叠的 10bp 碱基以及 XbaI(T[^]CTAGA) 酶切位点, 扩增的序列如 SEQ ID No: 12 所示。

PCR 扩增参数: 94°C 预变性 5min; 98°C 变性 10s、69°C 退火 15s、
10 72°C 1kb/1min、进行 30 个循环; 72°C 延伸 5min; 16°C 结束。

PCR 拼接序列:

拼接引物分别为 F1 和 R2, 以上述引物扩增得到的片段 (F1 和 R1 扩增得到的片段, F2 和 R2 扩增得到的片段) 为模板。

PCR 拼接参数: 94°C 预变性 5min; 98°C 变性 10s、52°C 退火 15s、
15 72°C 1kb/1min、进行 5 个循环; 98°C 变性 10s、68°C 退火 15s、72°C 1kb/1min、进行 25 个循环; 72°C 延伸 5min; 16°C 结束。

最终得到 SEQ ID NO: 4, 编码由 HPV31L1 的 1-475 氨基酸和 HPV33L1 C 端的 26 个 (474-499) 氨基酸组成的核苷酸序列, 两端带有 KpnI 和 XbaI 酶切位点 (下称拼接序列)。

20 用 KpnI+XbaI 双酶切 pFastBacTM1 载体和拼接序列片段, 将拼接序列克隆到 pFastBacTM1 载体上, 获得重组质粒 pFB-HPV31L1: 33C。即为 HPV31L1 C 端替换为 HPV33L1 C 端的嵌合基因。

实施例 2: HPV 31L1: 33C 重组杆状病毒包装

25 实施例 1 构建的 pFB-HPV 31L1: 33C 的重组质粒经鉴定和测序正确后, 将其转化至 DH10Bac 细菌感受态细胞 (Bac-to-Bac[®] 试剂盒, 购于 Thermo Fisher) 中, 37°C 培养扩增, 并进行平皿划线培养, 挑选白色菌斑并扩增, 培养过夜后收集菌液, 使用碱裂解法提取重组杆粒 DNA。

用阳离子转染试剂（购于 Sino Biological）将其转染至昆虫细胞 SF9 中进行重组杆状病毒毒种包装。具体操作如下：

- a. 取对数生长期的 SF9 细胞按照 0.6×10^6 cell/dish 的密度接种 dish，将接种有 SF9 细胞的 dish 室温放置 2h，贴壁。
- 5 b. 提取的质粒 20 μ L Bacmid DNA 加至 200 μ L Grace's Medium(无血清，无添加物，购于 Gibico)混和颠倒 5 次。
- c. 25 μ L 0.2x TF1（转染试剂，购于 Sino Biological）滴加至 200 μ L Grace's Meduim 轻轻混匀。
- d. 将 b 和 c 混合。室温孵育 15-45min。
- 10 e. 当 DNA 与 cellfectin（购于 Sino Biological）孵育时，弃细胞上清，添加无血清添加物的 Grace Medium 0.8mL/dish。
- f. 将 d 中孵育好的 DNA 与转染试剂复合物滴加到 dish 中。
- g. 27 $^{\circ}$ C 孵育 2hr。
- 15 h. 弃细胞培养液，加 2.5mL/dish 完全生长培养基（SCD6 SF +10%FBS）（SCD6 SF 购于 Sino Biological，FBS 购于 Gibico）。
- i. 27 $^{\circ}$ C 培养 7 天观察是否有病毒感染。

20 转染后待细胞产生明显的病变后收集病毒上清，一般培养 7-11 天。用移液器无菌收取病毒上清液，即为 HPV31L1: 33C P1 代毒种。使用 HPV31L1: 33C P1 代毒种按照 1:50 (V/V) 比例感染 SF9 细胞，SF9 细胞的感染密度为 2×10^6 cells/mL，27 $^{\circ}$ C 培养扩增 3 天，1000g \pm 200g 室温离心 10min，收集的病毒上清液即为 P2 代病毒，可用于感染生产。

25

实施例 3： HPV 31L1: 33C 表达生产

用实施例 2 中获得的含有 HPV 31L1: 33C 重组基因的杆状病毒感染 High Five 细胞，感染比例 1:200 (V/V)，1000g \pm 100g 室温离心收集细胞沉淀，使用 PBS 或 MOPS 缓冲液（pH6.0-7.0，盐浓度 100

mM-1M) 超声裂解细胞沉淀, 低温超声破碎 3min, 大于 10000g 的离心力离心 10 分钟, 收集离心后上清液, SDS-PAGE 电泳检测。泳道 1: Marker(Marker 为 7 种纯化后的蛋白, 分子量大小包含 14.4 至 116kDa, 生产商为 Thermo Scientific); 泳道 2: 细胞裂解液; 泳道 3: 裂解液离心后收集的上清液。

结果如图 1 所示, 该方法制备的 HPV 31L1: 33C L1 蛋白产量大于 100 mg/L, 蛋白大小约 56 KD, 可以用于大规模生产。

实施例 4: HPV 31L1: 33C 病毒样颗粒的纯化制备

HPV 31L1:33C 病毒样颗粒纯化方法为两步层析法, 即 HS-MMA 法, 纯化实施例 3 中收集的上清液, 最终可得到高纯度的病毒样颗粒。

第一步层析:

介质: 采用 Thermo Fisher 公司生产的 POROS[®] 50 HS 强阳离子交换介质。

介质体积: 介质体积 150mL, 线性流速 30mL/min。

层析条件: 平衡缓冲液 (pH6.2, 盐浓度为 50mM 磷酸盐, 0.5M 氯化钠); 清洗缓冲液 (盐浓度为 50mM 磷酸盐, 0.75M 氯化钠, pH6.2;)

层析柱先用 5 CV 平衡缓冲液, 然后上样。上样结束后, 之后分别用 5 CV 的平衡缓冲液和清洗缓冲液洗脱杂蛋白。

洗脱条件: pH6.2, 洗脱盐浓度为 1.25M 氯化钠采用含有 50mM 盐酸精氨酸的 50mM 磷酸盐缓冲液进行洗脱。

第二步层析:

介质: 采用上海博格隆公司生产的 MMA 离子交换介质。

介质体积: 介质体积 150mL, 线性流速 30mL/min。

层析条件: 平衡缓冲液 50mM PB, 1.25M NaCl, pH6.2。层析柱先用 4CV 平衡缓冲液平衡, 然后上样。上样结束后, 用 5 CV 平衡缓冲液冲洗杂蛋白后, 然后用洗脱缓冲液洗脱目标蛋白收集蛋白。

洗脱条件：100mM NaAC,150mM NaCl,0.01% Tween 80, pH4.5。

实施例 5: HPV 31L1: 33C 病毒样颗粒的形态学检测

取 10 μ L 样品用于透射电镜观察。将样品固定到碳喷铜网上吸附
5 2min, 残余液体用滤纸吸掉, 再使用磷钨酸(北京中镜科仪技术有限公司, 浓度 2%, pH6.5)染色两次, 每次 30 秒, 残余染色液用滤纸吸掉, 晾干后即可在透射电子显微镜下观察。透射电子显微镜(品牌: 日立, 型号: H-7650)为 80KV, 放大倍数为 80, 000 倍。电镜观察结果见图 2, 由图 2 可见, C 端改造的 HPV 31L1:33C 可以形
10 成大小均一的病毒样颗粒, 平均直径在 60nm 左右。

实施例 6: HPV 31L1: 33C 病毒样颗粒动物免疫原性评价

6.1 假病毒中和细胞的模型建立

由于 HPV 很难进行体外培养, 又具有较强的宿主特异性, 很难
15 在除人体以外的生物体进行繁殖, 缺乏合适的动物模型。所以需要建立合适有效的体外中和实验模型, 用于疫苗免疫保护性的评估。

HPV 假病毒是理想的 HPV 体外中和实验模型: 利用 HPV VLP 具有非特异包裹核酸的特性, 细胞内表达的 HPV L1 和 L2 组成的 VLP 包裹游离的 DNA 或导入外源质粒形成 HPV 假病毒。

20 采用假病毒中和法对样品免疫后动物血清样品进行免疫原性分析。HPV31 病毒样颗粒样品免疫动物后能产生针对 HPV31 的中和抗体, 能中和 HPV31 型的假病毒。将免疫后的动物血清与一定量的假病毒孵育后再侵染细胞, 可表达 GFP 荧光的细胞会随着血清中中和抗体的增加而减少, 在一定的范围内可存在线性负相关, 因此可以
25 通过检测表达 GFP 的细胞数的变化来评价血清中抗体的中和活性。

假病毒构建方法: 将 HPV31 型的 pCMV3-3-HPV31L1+L2 (L1 序列来源于 Uniprot P17388, L2 序列来源 Uniprot P17389) 质粒(购于 Sino Biological)以及荧光质粒(PSEU-GFP Spark, 购于 Sino Biological)共转染至 293FT 贴壁细胞(购于 Thermo Fisher)。具体

方法参考文献(Pastrana D V, Buck C B, Pang Y S, Thompson C D, Castle P E, FitzGerald P C, Kjaer S K, Lowy D R, Schiller J T. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. [J]Virology 2004,321:205-216.)。收集假病毒上清液并进行分装，置于-80℃冰箱中保存备用。

6.2 HPV 31L1: 33C 病毒样颗粒动物免疫保护性评价

小鼠免疫程序:

HPV 31L1: 33C 病毒样颗粒吸附于磷酸铝佐剂上，经混合后取 200 μ L 用于免疫小鼠，每只小鼠免疫剂量 0.15 μ g，免疫 10 只小鼠，于实验第 0 天、第 7 天、第 21 天分别用稀释后样品对小鼠进行免疫，同时设立空白血清对照组，于实验第 28 天摘取小鼠眼球取血，分离出血清进行假病毒中和滴度检测。

小鼠 EC₅₀ 检测:

小鼠血清在 56℃ 灭活 30 分钟后，离心 6000g，5 分钟后取上清进行检测。检测前 4-8 小时，将 293FT 细胞以 15000 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中，培养于 37℃，5%CO₂ 的二氧化碳培养箱中。免疫后小鼠血清、空白对照血清均用中和培养基系列稀释后按照体积比 1:1 分别与 6.1 中制备的 HPV31 假病毒混合。2~8℃ 冰箱中孵育 1 小时后按照 100 μ L/孔加入到提前 4-8 小时铺板的 293FT 细胞上，每个样品 2 个复孔，同时设立空白血清对照孔、假病毒阳性对照孔和阴性对照孔。加样后的细胞继续在 37℃，5%CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养 62-96 小时后，在酶联斑点分析仪中（型号：S6 Universal-V Analyzer，厂家：CTL）进行荧光扫描拍照以及计数。通过计算每个小鼠血清样品的中和抑制率，依据 Reed-Muench 法计算得到血清中和抑制率为 50% 时血清最大稀释倍数，即半数有效稀释倍数 EC₅₀。

HPV31 血清假病毒中和滴度检测结果详见表 4。

表 4 小鼠血清中和滴度检测结果 EC₅₀ (GMT \pm SEM)

HPV 型	EC ₅₀ 值
-------	--------------------

31 型	5210±1147
------	-----------

备注:

1. 动物数, N=10;
2. GMT(Geometric Mean Titer): 几何平均滴度;
3. SEM(Standard Error of Mean): 标准误差。

5 上述检测结果显示, 本发明制备的 HPV 31L1: 33C 病毒样颗粒具有较好的免疫原性, 可在动物体内产生高滴度的中和抗体, 可以用于制备成预防 HPV 感染的疫苗。

比较例 1: C 端截短的 HPV16L1 (1-474) 的表达

10 发明人尝试将 HPV16L1 的 C 端截短 31 个氨基酸, 命名为 HPV16L1 (1-474) (SEQ ID NO: 14)。但在研究中发现, 截短的 HPV16L1 (1-474) 蛋白表达量高但蛋白可溶性差, 难以提取纯化, 具体表达和提取结果见图 3。

15 虽然前述已经用说明和实施例的方式对本发明进行了详细描述, 但其目的在于理解方便, 本领域普通技术人员显然可以对本发明的技术方案作出的各种变形和改进, 而不会偏离附加的权利要求的精神或范围。

附录 1: 序列表

<p>SEQ ID No: 1</p>	<p>HPV 31 型 L1 蛋白的 1-475 氨基酸序列</p> <p>MSLWRPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVTRTNIYYHAGSARLLTVGHPYYSIP KSDNPKKIVVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKFGFPDTSFYNPETQRLVWACVGL EVGRGQPLGVGISGHPLLNFDDTENSRYAGGPGTDNRECISMDYKQTQLC LLGCKPPIGEHWGKGSPCSNNAITPGDCPPELKNLSVIQDGMVDTGFGAMDF TALQDTKSNVPLDICNSICKYPDYLMVAEPTYGDTLFFYLRREQMFVRHFFNR SGTVGESVPTDLYIKGSGSTATLANSTYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWMQRA QGHNNGICWGNQLFVTVVDTRSTNMSVCAAIANSDDTFKSSNFKEYLRHGE EFDLQFIFQLCKITLSADIMTYIHSMNPAILEDWNFGLTTPPSGSLEDTYRFVTS QAITCQKSAPQPKEDPFKDYVFEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGY</p>
<p>SEQ ID No: 2</p>	<p>HPV 33 型 L1 蛋白的 474-499 氨基酸序列</p> <p>KAKPKLKRAAPTSTRTSSAKRKKVKK</p>
<p>SEQ ID No: 3</p>	<p>嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白的氨基酸序列</p> <p>MSLWRPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVTRTNIYYHAGSARLLTVGHPYYSIP KSDNPKKIVVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKFGFPDTSFYNPETQRLVWACVGL EVGRGQPLGVGISGHPLLNFDDTENSRYAGGPGTDNRECISMDYKQTQLC LLGCKPPIGEHWGKGSPCSNNAITPGDCPPELKNLSVIQDGMVDTGFGAMDF TALQDTKSNVPLDICNSICKYPDYLMVAEPTYGDTLFFYLRREQMFVRHFFNR SGTVGESVPTDLYIKGSGSTATLANSTYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWMQRA QGHNNGICWGNQLFVTVVDTRSTNMSVCAAIANSDDTFKSSNFKEYLRHGE EFDLQFIFQLCKITLSADIMTYIHSMNPAILEDWNFGLTTPPSGSLEDTYRFVTS QAITCQKSAPQPKEDPFKDYVFEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGYKA KPKLKRAAPTSTRTSSAKRKKVKK</p>
<p>SEQ ID No: 4</p>	<p>嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白的核苷酸序列</p> <p>ATGAGCCTGTGGAGGCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCGTGAGCAAGGTGGTGAGC ACCGACGAGTACGTGACCAGGACCAACATCTACTACCACGCCGCGCAGCGCCAGGCTGCTGACCGTGGGC CACCCCTACTACAGCATCCCAAGAGCGACAACCCCAAGAAGATCGTGGTGCCCAAGGTGAGCGGCCTG CAGTACAGGGTGTTCAGGGTGAGGCTGCCCGACCCCAACAAGTTCGGCTTCCCCGACACCAGCTTCTACA</p>

	<p>ACCCCGAGACCCAGAGGCTGGTGTGGGCTGCGTGGGCCTGGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCCTGGGCG TGGGCATCAGCGGCCACCCCTGCTGAACAAGTTCGACGACACCGAGAACAGCAACAGGTACGCCGGCG GCCCCGGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGCTGGGCT GCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGCCCCTGCAGCAACAACGCCATCACCCCGGGCG ACTGCCCCCCTGGAGCTGAAGAACAGCGTGATCCAGGACGGCGACATGGTGGACACCGGCTTCGGCG CCATGGACTTCACCGCCCTGCAGGACACCAAGAGCAACGTGCCCCTGGACATCTGCAACAGCATCTGCAA GTACCCCGACTACCTGAAGATGGTGGCCGAGCCCTACGGCGACACCCTGTTCTTCTACCTGAGGAGGGAG CAGATGTTCTGTGAGGCACTTCTTCAACAGGAGCGGCACCGTGGGCGAGAGCGTGCCACCGACCTGTACA TCAAGGGCAGCGGCAGCACCGCCACCCTGGCCAACAGCACCTACTTCCCCACCCCGAGCGGCAGCATGGT GACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTACTGGATGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCAT CTGCTGGGGCAACCAGCTGTTCTGTGACCGTGGTGGACACCACCAGGAGCACCAACATGAGCGTGTGCGC CGCCATCGCCAACAGCGACACCACCTTCAAGAGCAGCAACTTCAAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGA GTTGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTGTGCAAGATCACCTGAGCGCCGACATCATGACCTACATCCACA GCATGAACCCCGCCATCCTGGAGGACTGGAAGTTCGGCCTGACCACCCCGCCAGCGGCAGCCTGGAGG ACACCTACAGGTTCTGTGACCAGCCAGGCCATCACCTGCCAGAAGTCCGCCCGCCAGAAAGCCCAAGGAGG ACCCCTTCAAGGACTACGTGTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCGACCTGGACCAGTT CCCCCTGGGCAGGAAGTTCCTGCTGCAGGCCGGCTACAAAGCCAAGCCAAAAGTGAAGGGGCTGCCCC AACCAGCACCAGGACCTCCTCTGCCAAGAGGAAGAAGGTGAAGAAGTAAA</p>
SEQ ID No: 5	<p>合成的 HPV31L1 基因</p> <p>ctgggtaccATGAGCCTGTGGAGGCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCGTGAGCAAGGTGG TGAGCACCGACGAGTACGTGACCAGGACCAACATCTACTACCACGCCGGCAGCGCCAGGCTGCTGACCG TGGGCCACCCCTACTACAGCATCCCCAAGAGCGACAACCCCAAGAAGATCGTGGTGCCCAAGGTGAGCG GCCTGCAGTACAGGGTGTTAGGGTGAAGGCTGCCCGACCCCAACAAGTTCGGCTTCCCCGACACCAGCTT CTACAACCCCGAGACCCAGAGGCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCCTGGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCCT GGGCGTGGGCATCAGCGGCCACCCCTGCTGAACAAGTTCGACGACACCGAGAACAGCAACAGGTACGC CGGCGGCCCGGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGCT GGGCTGCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGCCCCTGCAGCAACAACGCCATCACCCC CGGCGACTGCCCCCCTGGAGCTGAAGAACAGCGTGATCCAGGACGGCGACATGGTGGACACCGGCTT</p>

	<p>CGGCGCCATGGACTTCACCGCCCTGCAGGACACCAAGAGCAACGTGCCCTGGACATCTGCAACAGCATC TGCAAGTACCCCGACTACCTGAAGATGGTGGCCGAGCCCTACGGCGACACCCTGTTCTTACCTGAGGA GGGAGCAGATGTTTCGTGAGGCACTTCTTCAACAGGAGCGGCACCGTGGGCGAGAGCGTGCCACCGACC TGTACATCAAGGGCAGCGGCAGCACCGCCACCCTGGCCAACAGCACCTACTTCCCCACCCCAAGCGGCAG CATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTACTGGATGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAA CGGCATCTGCTGGGGCAACCAGCTGTTTCGTGACCGTGGTGGACACCACCAGGAGCACCAACATGAGCGT GTGCGCCGCCATCGCCAACAGCGACACCACCTTCAAGAGCAGCAACTTCAAGGAGTACCTGAGGCACGG CGAGGAGTTCGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTGTGCAAGATCACCTGAGCGCCGACATCATGACCTAC ATCCACAGCATGAACCCCGCCATCCTGGAGGACTGGAACCTTCGGCCTGACCACCCCAAGCGGCAGCC TGGAGGACACCTACAGGTTTCGTGACCAGCCAGGCCATCACCTGCCAGAAGTCCGCCCCCAGAAGCCCA AGGAGGACCCCTTCAAGGACTACGTGTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCGACCTGG ACCAGTTCCTCCCTGGGCAGGAAGTTCCTGCTGCAGGCCGGCTACAGGGCCAGGCCCAAGTTCAAGGCCG GCAAGAGGAGCGCCCCAGCGCCAGCACACCACCCCGCCAAGAGGAAGAAGACCAAGAAGTAAActeg agctc</p>
SEQ ID No: 6	<p>合成的 HPV33L1 基因</p> <p>ctgggtaccATGAGTGTGTGGAGACCATCTGAGGCTACAGTCTACCTGCCTCCTGTGCTGTGAGCAAGGTGG TGAGCACAGATGAATATGTGAGCAGGACCAGCATCTACTACTATGCTGGCTCCAGCAGACTGCTGGCTGT GGGACACCCATACTTCAGCATCAAGAACCCAAACCAATGCCAAGAACTGCTGGTGCCAAAGGTGTCTGG ACTCCAATACAGGGTGTTCAGGGTGAGACTGCCTGACCCAAACAAGTTTGGCTTTCCTGACACCTCCTTCT ACAACCCTGACACCCAGAGACTGGTGTGGGCTTGTGTGGGATTGGAGATTGGCAGGGGACAACCACTGG GAGTGGGCATCTCTGGACACCCACTGCTGAACAAGTTTGATGACACAGAGACAGGCAACAAATACCCTG GACAACCTGGAGCAGACAACAGGGAGTGTCTGAGTATGGACTACAAGCAGACCCAACTTGTCTGCTGG GCTGTAAGCCTCCAACAGGAGAACACTGGGGCAAGGGAGTGGCTTGTACCAATGCTGCCCTGCCAATG ACTGTCTCCATTGGAACCTGATAAACACCATCATTGAGGATGGAGATATGGTGGACACAGGCTTGGCTG TATGGACTTCAAGACCCCTCAAGCCAACAAGTCTGATGTGCCAATTGACATCTGTGGCAGCACTTGTA TACCCTGACTACCTGAAAATGACCTCTGAACCATATGGAGACTCCCTGTTCTTCTTCTGAGGAGGGAACA GATGTTTGTGAGACACTTCTTCAACAGGGCTGGCACCCCTGGGAGAGGCTGTGCTGATGACCTCTACATC AAGGGCTCTGGCACACAGCCAGCATCCAGTCTCTGCTTCTTCCAACACCATCTGGCAGTATGGTGAC</p>

	<p>CTCTGAGAGCCAACCTTTTCAACAAGCCATACTGGCTCCAAAGGGCTCAAGGACACAACAATGGCATCTGT TGGGGCAACCAGGTGTTTGTGACAGTGGTGGACACCACCAGGAGCACCAATATGACCCTGTGTACCCAGG TGACCTCTGACAGCACCTACAAGAATGAGAACTTCAAGGAATACATCAGGCATGTGGAGGAATATGACCT CCAATTTGTGTTCCAACCTTTGTAAGGTGACCCTGACAGCAGAGGTGATGACCTACATCCATGCTATGAACC CTGACATCTTGGAGGACTGGCAGTTTGGACTGACACCTCCTCCATCTGCCTCCCTCCAAGACACCTACAGG TTTGTGACCAGCCAGGCTATCACTTGTGTCAGAAGACAGTGCCTCCAAAGGAGAAGGAGGACCCACTGGGC AAATACACCTTCTGGGAGGTGGACCTGAAAGAGAAGTTCTCTGCTGACCTGGACCAGTTTCCACTGGGCA GGAAGTTCCTGCTCCAAGCAGGACTGAAAGCCAAGCCAAAAGTAAAAGGGGCTGCCCAACCAGCACCA GGACCTCCTCTGCCAAGAGGAAGAAGGTGAAGAAGTAAActcgagctc</p>
<p>SEQ ID No: 7</p>	<p>HPV31L1 F1 CTTGGTACCATGAGCCTGTGGAGGCCAGCGAG</p>
<p>SEQ ID No: 8</p>	<p>HPV31L1 R1 GCTTGGCTTTGTAGCCGGCCTGCAGCAGGAACTTCCTG</p>
<p>SEQ ID No: 9</p>	<p>HPV31L1 扩增序列 1 <u>CTTGGTACC^[1]</u> <u>ATGAGCCTGTGGAGGCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCGTGAGCAAGGTGGTGAGC</u> <u>ACCGACGAGTACGTGACCAGGACCAACATCTACTACCACGCCGGCAGCGCCAGGCTGCTGACCGTGGGC</u> <u>CACCCCTACTACAGCATCCCAAGAGCGACAACCCCAAGAAGATCGTGGTGCCCAAGGTGAGCGGCCTG</u> <u>CAGTACAGGGTGTTCAGGGTGAGGCTGCCCGACCCCAACAAGTTCGGCTTCCCGACACCAGCTTCTACA</u> <u>ACCCGAGACCCAGAGGCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCCTGGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCTGGGCG</u> <u>TGGGCATCAGCGGCCACCCCTGCTGAACAAGTTCGACGACACCGAGAACAGCAACAGGTACGCCGGCG</u> <u>GCCCCGGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGCTGGGCT</u> <u>GCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGCCCTGCAGCAACAACGCCATACCCCCGGCG</u> <u>ACTGCCCCCTGGAGCTGAAGAACAGCGTGATCCAGGACGGCGACATGGTGGACACCGGCTTCGGCG</u> <u>CCATGGACTTCACCGCCCTGCAGGACACCAAGAGCAACGTGCCCTGGACATCTGCAACAGCATCTGCAA</u> <u>GTACCCGACTACCTGAAGATGGTGGCCGAGCCCTACGGCGACACCCTGTCTTCTACCTGAGGAGGGAG</u> <u>CAGATGTCGTGAGGCACTTCTTCAACAGGAGCGGCACCGTGGGCGAGAGCGTGCCACCGACCTGTACA</u> <u>TCAAGGGCAGCGGCAGCACCGCCACCCCTGGCCAACAGCACCTACTTCCCCACCCCAAGCGGCAGCATGGT</u> <u>GACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTACTGGATGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCAT</u></p>

	<p><u>CTGCTGGGGCAACCAGCTGTTCTGTGACCGTGGTGGACACCACCAGGAGCACCAACATGAGCGTGTGCGC</u> <u>CGCCATCGCCAACAGCGACACCACCTTCAAGAGCAGCAACTTCAAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGA</u> <u>GTTTCGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTGTGCAAGATCACCTGAGCGCCGACATCATGACCTACATCCACA</u> <u>GCATGAACCCCGCCATCCTGGAGGACTGGAAGTTCGGCCTGACCACCCCGCCAGCGGCAGCCTGGAGG</u> <u>ACACCTACAGGTTCTGTGACCAGCCAGGCCATCACCTGCCAGAAGTCCGCCCCCAGAAGCCCAAGGAGG</u> <u>ACCCCTTCAAGGACTACGTGTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCGACCTGGACCAGTT</u> <u>CCCCCTGGGCAGGAAGTTCCTGCTGCAGGCCGGCTAC</u>^[2] AAAGCCAAGC^[3]</p> <p>[1]: KpnI酶切位点; [2]: 编码 HPV31L1 的 1-475 氨基酸的基因片段; [3]: 与 HPV33L1 的 474-499 氨基酸的基因片段重叠的 10 个碱基。</p>
SEQ ID No: 10	<p>HPV31L1 F2 GGCCGGCTACAAAGCCAAGCCAAAAGCTGAAAAGGG</p>
SEQ ID No: 11	<p>HPV31L1 R2 CTGTCTAGATTTACTTCTTCACCTTCTTCCTCTTGGCAGAG</p>
SEQ ID No: 12	<p>HPV31L1 扩增序列 2 <u>GGCCGGCTAC</u>^[1] <u>AAAGCCAAGCCAAAAGCTGAAAAGGGCTGCCCAACCAGCACCAGG</u> <u>ACCTCTCTGCCAAGAGGAAGAAGGTGAAGAAG</u>^[2] TAA ATCTAGA^[3]CAG.</p> <p>[1]: 与 HPV31L1 的 1-475 氨基酸 C 端基因片段重叠的 10bp 碱基; [2]: HPV33L1 C 端的 26 个 (474-499) 氨基酸的基因片段; [3]: XbaI 酶切位点。</p>
SEQ ID No: 13	<p>HPV 59 型 L1 蛋白的 471-508 氨基酸序列 LQLGARPKPTIGPRKRAAPAPTSTPSPKRVKRRKSSRK</p>
SEQ ID NO: 14	<p>C 端截短的 HPV16L1 (1-474) 氨基酸序列 MSLWLPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIK KPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKFGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGVE VGRGQPLGVGISGHPLLKLDDETENASAYAANAGVDNRECISMDYKQTQLCL IGCKPPIGEHWGKSPCTNVAVNPGDCPPLELINTVIQDGMVDTGFGAMDFT TLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAAG</p>

	AVGENVPDDLVIKGGSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQG HNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSLCAAISTSETTYKNTNFKEYLRHGEEYD LQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGGTLEDTYRFVTSQAI ACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGL
--	--

权利要求书

1. 一种嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，自其 N 末端至 C 末端方向包含：

5 a. 衍生于 HPV 31 型 L1 蛋白的 N 端片段，所述 N 端片段保持 HPV 31 型 L1 蛋白的免疫原性；和

b. 衍生于第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白的 C 端片段，所述第二型别乳头状瘤病毒 L1 蛋白具有相较于其他型别的 L1 蛋白表达量和可溶性较好的特性；

10 其中所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白具有 HPV 31 型 L1 蛋白的免疫原性。

2. 根据权利要求 1 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中

所述 N 端片段为将 HPV 31 型 L1 蛋白的天然序列的 C 末端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段，以及与其具有至少
15 98% 的同一性的片段；并且

所述 C 端片段为将第二型别乳头状瘤病毒 L1 蛋白的天然序列的 N 末端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段，以及该片段进一步突变、缺失和/或添加而产生的功能性变体。

3. 根据权利要求 2 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中所述
20 C 端片段含有一个或多个核定位序列。

4. 根据权利要求 1 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白选自 HPV 1 型、2 型、3 型、4 型、6 型、7 型、10 型、11 型、13 型、16 型、18 型、22 型、26 型、28 型、31 型、32 型、33 型、35 型、39 型、42 型、44 型、45 型、51
25 型、52 型、53 型、56 型、58 型、59 型、60 型、63 型、66 型、68 型、73 型或 82 型 L1 蛋白；

优选地，所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白选自 HPV 16 型、28 型、33 型、59 型、或 68 型 L1 蛋白；

更优选地，所述第二型别乳头瘤病毒 L1 蛋白选自 HPV 33 型或

HPV 59 型 L1 蛋白。

5. 根据权利要求 4 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中所述 C 端片段为 SEQ ID No: 2；或其长度为 m 个氨基酸的片段，优选涵盖 SEQ ID No: 2 的第 1-m 位氨基酸的片段；其中 m 为 8-26 的整数。

5 6. 根据权利要求 4 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中所述 C 端片段为 SEQ ID No: 13；或其长度为 n 个氨基酸的片段，优选涵盖 SEQ ID No: 13 的第 1-n 位氨基酸的片段；其中 n 为 16-38 的整数。

7. 根据权利要求 1 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中所述 N 端片段与将 SEQ ID No: 1 所示序列的 C 末端截短于其 $\alpha 5$ 区内的任一氨基酸位点而得到的片段具有 98%、98.5%、99%、99.5% 或 100% 的同一性。

8. 根据权利要求 1 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，所述 N 端片段的 C 末端与所述 C 端片段的 N 末端直接连接或通过接头连接。

9. 根据权利要求 1 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其中当所述 N 端片段的 C 末端与所述 C 端片段的 N 末端连接时，在连接点的正负 4 个氨基酸位点的范围内存在以下连续氨基酸序列：RKFL；

15 优选地，在连接点的正负 6 个氨基酸位点的范围内存在以下连续氨基酸序列：LGRKFL。

10. 根据权利要求 1 所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白，其与 SEQ ID No: 3 具有 98%、98.5%、99%、99.5% 或 100% 的同一性。

11. 一种 HPV 31 型病毒样颗粒，其包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白。

12. 根据权利要求 11 所述的 HPV 31 型病毒样颗粒，其为由 72 个所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白的五聚体构成的二十面体。

25 13. 一种预防 HPV 相关疾病或感染的免疫原性组合物，其包含根据权利要求 11 或 12 所述的 HPV 31 型病毒样颗粒和佐剂。

14. 一种分离的多核苷酸，其编码权利要求 1 至 10 中任一项所述的嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白。

15. 一种分离的多核苷酸，其具有 SEQ ID No: 4 所示的序列。

16. 一种载体，其包含根据权利要求 14 或 15 所述的多核苷酸。

17. 根据权利要求 16 所述的载体，其中所述载体为杆状病毒载体。

5 18. 一种杆状病毒，其包含根据权利要求 14 或 15 所述的多核苷酸。

19. 一种宿主细胞，其包含根据权利要求 14 或 15 所述的多核苷酸、根据权利要求 16 或 17 所述的载体、或根据权利要求 18 所述的杆状病毒。

10 20. 根据权利要求 19 所述的宿主细胞，其为昆虫细胞，优选地，所述昆虫细胞选自 Sf9 细胞、Sf21 细胞、Hi5 细胞和 S2 细胞。

21. 一种制备根据权利要求 11 或 12 所述的 HPV 31 型病毒样颗粒的方法，其包括：

15 培养权利要求 19 至 20 中任一项所述的宿主细胞以表达所述嵌合的 HPV 31 型 L1 蛋白并组装成病毒样颗粒；以及
纯化所述 HPV 31 型病毒样颗粒。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述宿主细胞为 Hi5 细胞。

23. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述纯化采用阳离子交换层析，优选地，所述阳离子交换层析为 HS-MMA 两步层析。

20

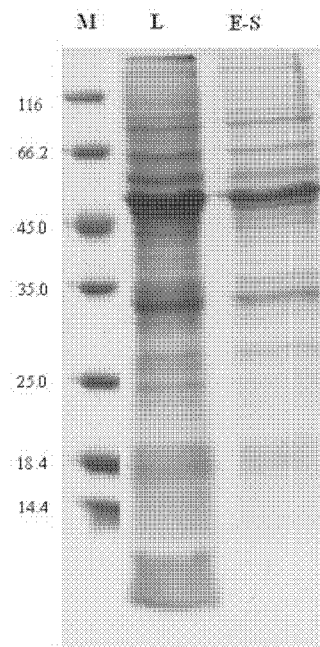


图 1

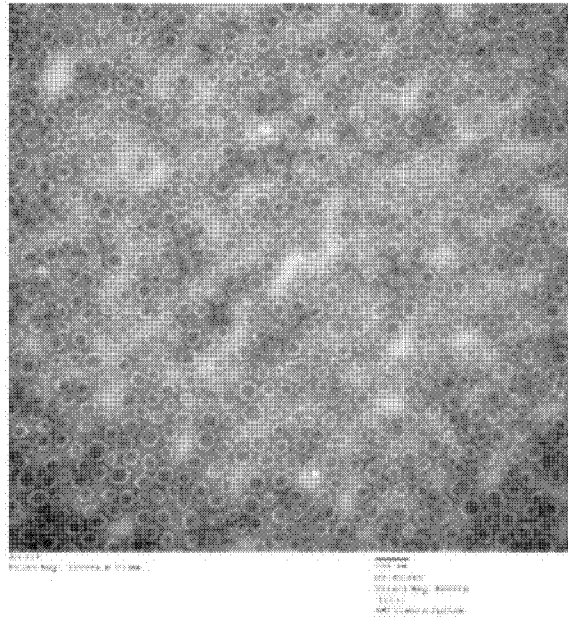


图 2

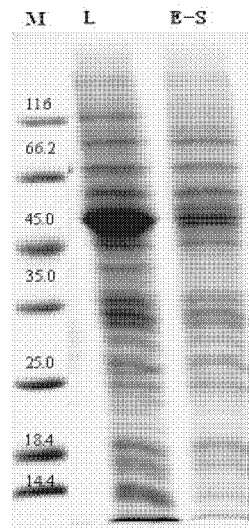


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/102557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/025(2006.01)i; C12N 15/37(2006.01)i; A61K 39/12(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 15/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, Baidu Xueshu Search, WEB OF SCIENCE, PubMed, GenBank, 中国生物序列检索数据库, Chinese Biological Sequence Retrieval Dataase: 人乳头瘤病毒, 嵌合的, 融合蛋白, 31型, 第二型别, 免疫原性, 表达量, 可溶性, α 5区, Human Papillomavirus, HPV, fusion protein, chimera, hybrid gene, immunogenic, expression, second tye, truncated, SEQ ID NOS: 1-14		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5821087 A (MERCK & CO., INC.) 13 October 1998 (1998-10-13) see claims, and description, columns 6-9	1-4, 8, 9, 11-14, 16-23
A	WO 2004084831 A2 (MERCK & CO., INC. et al.) 07 October 2004 (2004-10-07) see entire document	1-23
A	CN 106701797 A (BEIJING KANGLEWEISHI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 May 2017 (2017-05-24) see entire document	1-23
A	CN 104212818 A (XIAMEN UNIVERSITY et al.) 17 December 2014 (2014-12-17) see entire document	1-23
A	CN 104164374 A (ABZYMO BIOSCIENCES CO., LTD. et al.) 26 November 2014 (2014-11-26) see entire document	1-23
A	TW 200607858 A (MERCK & CO., INC.) 01 March 2006 (2006-03-01) see entire document	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 October 2020		Date of mailing of the international search report 25 November 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/102557

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	高波等 (GAO, Bo et al.). "人乳头瘤病毒31和33型L1蛋白类病毒颗粒的制备及其免疫原性 (Preparation and Immunogenicity of Virus-Like Particles of Human Papillomavirus Types 31 and 33 L1 Protein)" <i>中国生物制品学杂志 (Chinese Journal of Biologicals)</i> , No. 12, 31 December 2014 (2014-12-31), pp. 1508-1511, and see entire document	1-23
Y	郝亚茹等 (HAO, Yaru et al.). "HPV31 L1 C端截短基因可在昆虫细胞表达体系中高水平制备L1 VLP疫苗 (A C-terminal Truncated HPV31 L1 Gene Can be Used to Produce L1 VLP Vaccine in Baculovirus System with High Yield and Good Immunogenicity)" <i>基础医学与临床 (Basic & Clinical Medicine)</i> , Vol. 39, No. 3, 31 March 2019 (2019-03-31), pages 343-347, see the abstract, and pages 345-347	1-4, 8, 9, 11-14, 16-23
A	Daning Wang et al. "Stop Codon Mutagenesis for Homogenous Expression of Human Papillomavirus L1 Protein in Escherichia Coli" <i>Protein Expression and Purification</i> , Vol. 133, 31 May 2017 (2017-05-31), pp. 110-120, and see entire document	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/102557

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	5821087	A	13 October 1998	None			
WO	2004084831	A2	07 October 2004	MX	PA05010285	A	17 November 2005
				EC	SP056032	A	27 January 2006
				CN	100506999	C	01 July 2009
				EP	1608767	A2	28 December 2005
				AU	2004224335	B2	28 January 2010
				NO	341527	B1	04 December 2017
				CN	1761759	A	19 April 2006
				US	7276243	B2	02 October 2007
				US	7482428	B2	27 January 2009
				EP	1608767	A4	30 August 2006
				IL	171067	A	30 November 2011
				NZ	542246	A	21 December 2007
				US	2008166371	A1	10 July 2008
				AT	546529	T	15 March 2012
				NL	300772	I1	29 December 2015
				IS	8019	A	12 September 2005
				RU	2356943	C2	27 May 2009
				BR	PI0408639	A	28 March 2006
				RU	2005132603	A	27 April 2006
				ES	2381964	T3	04 June 2012
				NL	300772	I2	29 December 2015
				NO	20054889	D0	21 October 2005
				NO	20054889	L	19 December 2005
				US	2006177817	A1	10 August 2006
				ZA	200507178	B	30 August 2006
				EP	1608767	B1	22 February 2012
				NO	20054889	A	19 December 2005
				ZA	200507178	A	30 August 2006
				JP	2006523099	A	12 October 2006
				AU	2004224335	A1	07 October 2004
				JP	4505452	B2	21 July 2010
				WO	2004084831	A3	11 November 2004
				CA	2519112	C	11 September 2012
				IS	2859	B	15 December 2013
				KR	20050119141	A	20 December 2005
				HK	1090953	A1	12 March 2010
				NO	2018010	I1	27 March 2018
				CA	2519112	A1	07 October 2004
CN	106701797	A	24 May 2017	None			
CN	104212818	A	17 December 2014	CN	104212818	B	12 April 2017
				HK	1207879	A1	12 February 2016
CN	104164374	A	26 November 2014	CN	110592133	A	20 December 2019
				CN	104164374	B	22 October 2019
TW	200607858	A	01 March 2006	TW	I334438	B	11 December 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/102557

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/025(2006.01)i; C12N 15/37(2006.01)i; A61K 39/12(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 15/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed, GenBank, 中国生物序列检索数据库:人乳头瘤病毒, 嵌合的, 融合蛋白, 31型, 第二型别, 免疫原性, 表达量, 可溶性, α5区, Human Papillomavirus, HPV, fusion protein, chimera, hybrid gene, immunogenic, expression, second tye, truncated, SEQ ID NOs: 1-14</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5821087 A (MERCK & CO INC) 1998年 10月 13日 (1998 - 10 - 13) 参见权利要求书, 说明书第6-9栏</td> <td>1-4, 8-9, 11-14, 16-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2004084831 A2 (MERCK & CO INC等) 2004年 10月 7日 (2004 - 10 - 07) 参见全文</td> <td>1-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106701797 A (北京康乐卫士生物技术股份有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 参见全文</td> <td>1-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104212818 A (厦门大学等) 2014年 12月 17日 (2014 - 12 - 17) 参见全文</td> <td>1-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104164374 A (北京安百胜生物科技有限公司等) 2014年 11月 26日 (2014 - 11 - 26) 参见全文</td> <td>1-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>TW 200607858 A (MERCK & CO INC) 2006年 3月 1日 (2006 - 03 - 01) 参见全文</td> <td>1-23</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	US 5821087 A (MERCK & CO INC) 1998年 10月 13日 (1998 - 10 - 13) 参见权利要求书, 说明书第6-9栏	1-4, 8-9, 11-14, 16-23	A	WO 2004084831 A2 (MERCK & CO INC等) 2004年 10月 7日 (2004 - 10 - 07) 参见全文	1-23	A	CN 106701797 A (北京康乐卫士生物技术股份有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 参见全文	1-23	A	CN 104212818 A (厦门大学等) 2014年 12月 17日 (2014 - 12 - 17) 参见全文	1-23	A	CN 104164374 A (北京安百胜生物科技有限公司等) 2014年 11月 26日 (2014 - 11 - 26) 参见全文	1-23	A	TW 200607858 A (MERCK & CO INC) 2006年 3月 1日 (2006 - 03 - 01) 参见全文	1-23
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
Y	US 5821087 A (MERCK & CO INC) 1998年 10月 13日 (1998 - 10 - 13) 参见权利要求书, 说明书第6-9栏	1-4, 8-9, 11-14, 16-23																					
A	WO 2004084831 A2 (MERCK & CO INC等) 2004年 10月 7日 (2004 - 10 - 07) 参见全文	1-23																					
A	CN 106701797 A (北京康乐卫士生物技术股份有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 参见全文	1-23																					
A	CN 104212818 A (厦门大学等) 2014年 12月 17日 (2014 - 12 - 17) 参见全文	1-23																					
A	CN 104164374 A (北京安百胜生物科技有限公司等) 2014年 11月 26日 (2014 - 11 - 26) 参见全文	1-23																					
A	TW 200607858 A (MERCK & CO INC) 2006年 3月 1日 (2006 - 03 - 01) 参见全文	1-23																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 10月 16日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 11月 25日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>魏春宝</p> <p>电话号码 62411028</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	高波等. "人乳头瘤病毒31和33型L1蛋白类病毒颗粒的制备及其免疫原性" 中国生物制品学杂志, 第12期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第1508-1511页 参见全文	1-23
Y	郝亚茹等. "HPV31 L1 C端截短基因可在昆虫细胞表达体系中高水平制备L1 VLP疫苗" 基础医学与临床, 第39卷, 第3期, 2019年 3月 31日 (2019 - 03 - 31), 第343-347页, 参见摘要, 第345-347页	1-4, 8-9, 11-14, 16-23
A	Daning Wang等. "Stop codon mutagenesis for homogenous expression of human papillomavirus L1 protein in Escherichia coli" Protein Expression and Purification, 第133卷, 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31), 第110-120页 参见全文	1-23

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/102557

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	5821087	A	1998年 10月 13日	无			
WO	2004084831	A2	2004年 10月 7日	MX	PA05010285	A	2005年 11月 17日
				EC	SP056032	A	2006年 1月 27日
				CN	100506999	C	2009年 7月 1日
				EP	1608767	A2	2005年 12月 28日
				AU	2004224335	B2	2010年 1月 28日
				NO	341527	B1	2017年 12月 4日
				CN	1761759	A	2006年 4月 19日
				US	7276243	B2	2007年 10月 2日
				US	7482428	B2	2009年 1月 27日
				EP	1608767	A4	2006年 8月 30日
				IL	171067	A	2011年 11月 30日
				NZ	542246	A	2007年 12月 21日
				US	2008166371	A1	2008年 7月 10日
				AT	546529	T	2012年 3月 15日
				NL	300772	I1	2015年 12月 29日
				IS	8019	A	2005年 9月 12日
				RU	2356943	C2	2009年 5月 27日
				BR	PI0408639	A	2006年 3月 28日
				RU	2005132603	A	2006年 4月 27日
				ES	2381964	T3	2012年 6月 4日
				NL	300772	I2	2015年 12月 29日
				NO	20054889	D0	2005年 10月 21日
				NO	20054889	L	2005年 12月 19日
				US	2006177817	A1	2006年 8月 10日
				ZA	200507178	B	2006年 8月 30日
				EP	1608767	B1	2012年 2月 22日
				NO	20054889	A	2005年 12月 19日
				ZA	200507178	A	2006年 8月 30日
				JP	2006523099	A	2006年 10月 12日
				AU	2004224335	A1	2004年 10月 7日
				JP	4505452	B2	2010年 7月 21日
				WO	2004084831	A3	2004年 11月 11日
				CA	2519112	C	2012年 9月 11日
				IS	2859	B	2013年 12月 15日
				KR	20050119141	A	2005年 12月 20日
				HK	1090953	A1	2010年 3月 12日
				NO	2018010	I1	2018年 3月 27日
				CA	2519112	A1	2004年 10月 7日
CN	106701797	A	2017年 5月 24日	无			
CN	104212818	A	2014年 12月 17日	CN	104212818	B	2017年 4月 12日
				HK	1207879	A1	2016年 2月 12日
CN	104164374	A	2014年 11月 26日	CN	110592133	A	2019年 12月 20日
				CN	104164374	B	2019年 10月 22日
TW	200607858	A	2006年 3月 1日	TW	I334438	B	2010年 12月 11日