

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.001

· 基础研究 ·

人乳头瘤病毒(HPV)31 型中和单克隆抗体的制备及性质鉴定*

夏百成 刘洪洋 郝亚茹 张 婷 马铭饶 许雪梅[△]

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 北京 100005)

摘要 目的: 构建获得 HPV31 构象依赖的中和单抗。**方法:** 采用昆虫细胞表达的 HPV31 L1VLP (virus-like particle, VLP) 免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 收集杂交瘤细胞培养上清, 首先采用 HPV31 VLP-ELISA 及 HPV31 假病毒中和实验筛选分泌 HPV31 中和单抗的杂交瘤细胞株, 然后纯化单克隆抗体, 分别采用假病毒中和实验及 ELISA 实验对纯化后单克隆抗体进行鉴定, 包括抗体的亚型及其结合表位的构象特征、针对 HPV31 的中和 IC₅₀ 及针对 HPV16、HPV18、HPV33、HPV45、HPV52、HPV58、HPV6、HPV11 的交叉中和活性。**结果:** 筛选获得 9 株 HPV31 构象依赖中和单抗, 其中 3 株 HPV31 特异性中和单抗中有 2 株的 IC₅₀ < 10 ng/mL, 分别是 XM31-13 (0.36, IgG1) 及 XM31-23 (7.10, IgG1), 6 株交叉中和单抗中亦有 2 株的 IC₅₀ < 10 ng/mL, 分别是 XM31-19 (7.14, IgG1)、XM31-20 (6.91, IgG1)。**结论:** 获得的 9 株 HPV31 构象依赖的中和单抗, 特别是其中 4 株单抗 IC₅₀ 值 < 10 ng/mL 的 4 株单抗, 可用于含 HPV31 L1VLP 多价疫苗的质控疫苗的研究。

关键词: 人乳头瘤病毒 31 型; L1 病毒样颗粒; 单克隆抗体; 中和活性

中图分类号: R-33; R730.261; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)06-1001-05

Preparation and Characterization of Neutralizing Monoclonal Antibodies
Against Human Papillomavirus Type 31*XIA Bai-cheng, LIU Hong-yang, HAO Ya-ru, ZHANG Ting, MA Ming-rao, XU Xue-mei[△]

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing, 100005, China)

ABSTRACT Objective: Preparation of some conformation-dependent neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) against HPV31.

Methods: Female BALB/c mice were immunized with HPV31 L1 virus-like particles (VLPs) expressed by insect cells, and spleenocytes of the immunized mice were fused with SP2/0 cells to prepare hybridoma cells, the culture supernatants were collected for identification of neutralizing mAb secreting cells by HPV31 VLP-ELISA and HPV31 pseudovirus neutralization experiments. Monoclonal antibodies were purified and identified by ELISA and HPV31, HPV16, HPV18, HPV52, HPV58, HPV33, HPV45, HPV6 or HPV11 pseudovirus neutralization experiments. **Results:** Nine HPV31 conformation-dependent neutralizing mAbs were screened, and three of which were HPV31 specific mAbs and the other six were cross-neutralizing mAbs. The mAbs with IC₅₀ < 10 ng/mL were XM31-13 (0.36), XM31-19 (7.14), XM31-20 (6.9), XM31-23 (7.10). **Conclusions:** Nine conformation-dependent neutralizing mAbs were obtained, and four of them have low IC₅₀ value, which is useful for development of HPV31-VLP containing multivalent vaccines.

Key words: Human papillomavirus; Virus-like particle; Monoclonal antibody; Neutralizing activity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.261; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1001-05

前言

致癌型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染与约 100%的宫颈癌及部分其他泌尿生殖系统癌及口咽癌的发生密切相关^[1-4], 目前已鉴定 20 余型, 其中常见的 12 型, 包括 HPV16/-18/-31/-33 等又称高危型, 包括 HPV16、HPV18、

HPV31、HPV33 等^[5,6]。其中, HPV16/-18 在合计诱发 69.4%的宫颈癌中检出率合计为 69.4%, 其余的宫颈癌为其他致癌型诱发, 其中 HPV31 在宫颈癌及宫颈高度癌前病变中的检出率分别为 3.5%及 10.4%^[7]。

HPV 主要衣壳蛋白 L1 自组装的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)大小及形态与天然病毒颗粒相似, 直径为 50-55

* 基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目基金 (2016-I2M-3-026); 国家国际科技合作项目 (2013DFA32430)

作者简介: 夏百成 (1994-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 病原生物学, E-mail: xiabaicheng1@126.com

[△] 通讯作者: 许雪梅 (1965-), 女, 博士生导师, 研究员教授, 主要研究方向: 病毒疫苗,

E-mail: xuemeixu@vip.sina.com, 电话: 010-69156442

(收稿日期: 2019-09-27 接受日期: 2019-10-23)

nm^[8-10]。每个 VLP 含 72 个 L1 五聚体^[11,12],L1 蛋白含有多种不同的抗体表位,包括结合抗体表位和中和抗体表位,研究发现中和抗体表位又分为线性表位和构象表位,构象表位诱发产生的中和抗体滴度高、中和活性强,但构象表位完整性的维持依赖于 L1 五聚体及 VLP 的正确组装^[7,13,14]。构象依赖的中和单抗常用作 VLP 疫苗免疫保护活性的替代指标,如 HPV16 的构象依赖单抗 H16.V5 用于竞争性 ELISA 法检测临床试验免疫血清的中和抗体水平^[15];另外,构象依赖的单抗也可以用于疫苗生产中的质量控制研究,通过对 VLP 蛋白的构象表位分析来鉴定 VLP 疫苗的结构特征及含量及抗原性。采用酵母表达的 HPV31L1 VLP 为免疫原动物筛选获得的 HPV31 构象依赖的中和单抗已有文献报道^[16],采用昆虫细胞表达生产 HPV31L1 VLP 的单抗的文献报道较少且单抗的特性鉴定信息不全。不同表达体系生产的 31L1 VLP 翻译后的加工修饰不同,因此可能影响相应 VLP 表面的构象表位。鉴于采用昆虫细胞表达的二价苗 Cervarix 的诱发的 HPV16-18 中和抗体水平及交叉中和抗体水平较酵母系统表达的四价苗 Gardasil 的强^[17-19],为了配合研发我国产的、利用昆虫细胞表达的、含 HPV31VLP 的多价 HPV 预防性疫苗的研发,本研究采用昆虫细胞表达的 HPV31L1 VLP 免疫小鼠动物,进行 HPV31 构象依赖中和单抗的筛选鉴定,为相关 HPV 疫苗的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甲基纤维素(MC)、弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)和 HAT 购自 Sigma 公司,胎牛血清(FBS)购自杭州天杭生物科技有限公司,DMEM 购自 Gibco 公司,PEG1500 购自 Roche 公司,Camvir-1 购自美国 MILLIPORE 公司,HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记山羊抗小鼠 IgM 抗体均购自康为世纪生物科技有限公司,其余试剂均为国产分析纯。HiTrap protein G Sepharose Fast Flow 购自 GE 公司,HPV16/18/31/33/45/52/58/6/11 假病毒和 HPV31 L1 VLP 为本实验室制备^[20],4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,SP2/0 骨髓瘤细胞由中国医学科学院基础医学研究所陈实平教授馈赠。

1.2 杂交瘤细胞株的建立

取 5 μ g HPV31 L1 VLP 溶于 50 μ L PBS,于小鼠背部多点点皮下注射,分别于 0、2、4、6 周免疫,初次免疫采用 CFA,强化免疫采用 IFA,末次免疫的第 14 d 尾静脉采集血清,ELISA 检测血清抗体滴度^[21]。选取血清抗体滴度大于 10^4 的且滴度最高的小鼠于融合前 3 d 尾静脉注射 50 μ g HPV31 L1 VLP。PEG1500 作为融合剂,按 5:1~10:1 比例将脾细胞与 SP 2/0 骨髓瘤细胞融合^[22]。融合细胞经半固体培养基(IMDM,2 $\times$ HAT,2% MC,30% FBS)37 $^{\circ}$ C 培养 7 天后,挑取单克隆细胞接种于含有小鼠胸腺细胞的 96 孔板中培养 7 d,取培养上清用于单克隆细胞初步筛选。

1.3 杂交瘤单克隆细胞的筛选

1.3.1 HPV31VLP-ELISA 的筛选 (1)HPV31 L1VLP 结合单抗的筛选:用 PBS 将 HPV31 L1VLP 稀释至 1 μ g/mL,包被 96 孔板,100 μ L/孔,BSA(200 μ L/孔)封闭;将杂交瘤细胞培养上清 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;加入 HRP 标记的羊抗小鼠

IgG(1:3000)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;OPD 底物显色,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min;加入 50 μ L 2 M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 OD_{490nm} 波长处检测,筛选阳性杂交瘤细胞。(2)构象表位依赖单抗的筛选:分别用变性处理的 HPV31 L1VLP(抗原溶于含 10 mM/L DTT 的 PBS,76 $^{\circ}$ C 处理 10 min)及 HPV31 L1VLP 包被 96 孔板,100ng/孔,BSA(200 μ L/孔)封闭;将杂交瘤细胞培养上清 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1:3000)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;OPD 底物显色,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min;加入 50 μ L 2 M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 OD_{490nm} 波长处检测,筛选阳性杂交瘤细胞,阳性对照组为 31VLP 免疫血清(1:1000 稀释),阴性对照组为未免疫小鼠血清(1:100 稀释)。

1.3.2 HPV31 中和单抗的筛选及纯化 参照 HPV31 假病毒中和实验筛选分泌中和单抗的阳性克隆^[23]:将 60 μ L 的杂交瘤培养上清和 60 μ L 用 DMEM 培养基稀释的 HPV31 型假病毒混匀,用 60 μ L 的 DMEM 培养基和 60 μ L 用 DMEM 培养基稀释的假病毒混匀作为阴性对照,4 $^{\circ}$ C 孵育大于 1 h;加入铺好 293T 细胞的 96 孔板中;37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 3 d,收集细胞;用流式细胞仪检测 96 孔板中表达绿色荧光蛋白的细胞百分比,以小于阴性对照一半的孔作为阳性,筛选获得分泌 HPV31 中和单抗的杂交瘤细胞。取杂交瘤细胞培养上清,HiTrap Protein G HP 亲和层析纯化,按 GE 的方案纯化抗体。SDS-PAGE 凝胶电泳检测单抗纯化情况。

1.4 单抗抗体亚型鉴定

采用琼脂糖免疫双扩散法检测抗体亚型,采用免疫双扩散法鉴定抗体的 Ig 类型和亚类^[24],取琼脂糖,加入 PBS(pH=7.0),微波炉融化,趁热倒入玻片中,凝结后用打孔器打孔。取纯化后的 9 种单抗 10-15 μ L 加入中央孔,周边孔分别加入不同 Ig 类或亚类的抗体 10-15 μ L,37 $^{\circ}$ C 湿盒中保湿,出现沉淀线者为阳性,表明这种抗体对应的 Ig 类或亚类。

1.5 单抗的中和活性及交叉中和活性检测

鉴于中和单抗在不同 HPV 型别之间有可能存在交叉保护作用,故采用 HPV16/18/31/33/45/52/58/6/11 假病毒对上述 HPV 31 中和单抗的中和活性及交叉中和活性进行鉴定,以检测型别的 VLP 小鼠免疫血清为阳性对照,以 His 标签抗体为阴性对照,并采用 Reed-Muench 法计算单抗中和活性及交叉中和活性的 IC₅₀ 值。

1.6 HPV31 中和单抗结合活性的鉴定

ELISA 测定 HPV31VLP 与中和单抗的结合活性。用 HPV31 L1VLP 200 ng/孔包被 96 孔板;BSA(200 μ L/孔)封闭;用 PBS 稀释单抗,起始稀释度为 2 μ g/mL,二倍倍比稀释,每孔 100 μ L,每个稀释度 3 个复孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1:3000)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;OPD 底物显色,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min;加入 50 μ L 2 M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 OD_{490nm} 波长处检测,阴性对照组为 His 标签抗体,阳性对照组为 31VLP 免疫血清。通过 t 检验比较分析各个稀释度下不同单抗及阴性对照组的差异。

2 结果

2.1 单克隆细胞的筛选

四次免疫后 3 只小鼠血清滴度分别为 7.9×10^4 、 1.2×10^5 、 6.4×10^5 、 7.9×10^4 ,取小鼠的脾细胞进行融合,通过

VLP-ELISA 对融合获得的 788 株杂交瘤细胞进行筛选, 获得 172 株杂交瘤细胞可分泌具有结合活性的单抗; 其中 87 株杂交瘤细胞可分泌构象表位依赖的单抗, 5 株杂交瘤细胞可分泌线性表位依赖的单抗; 最后通过假病毒中和实验对 92 株杂交瘤细胞进行筛选, 获得 23 株杂交瘤细胞可分泌构象表位依赖的中和单抗。阴性对照组的 $OD_{490\text{ nm}}$ 为 0.09, 阳性对照组的 $OD_{490\text{ nm}}$ 为 3.17, $OD_{490\text{ nm}}$ 大于阴性对照组两倍的杂交瘤培养上清视为具有结合活性。

2.2 单抗的纯化及鉴定

从 23 株可分泌构象表位依赖中和单抗的杂交瘤细胞中, 选择其中 9 株进行抗体纯化, 抗体分别命名为 XM31-6、XM31-8、XM31-9、XM31-10、XM31-11、XM31-13、XM31-19、XM31-20、XM31-23。SDS-PAGE 凝胶电泳检测显示, 在 55 kDa 及约 25 kDa 处分别有两条带, 与重链和轻链大小相符 (如图 1)。

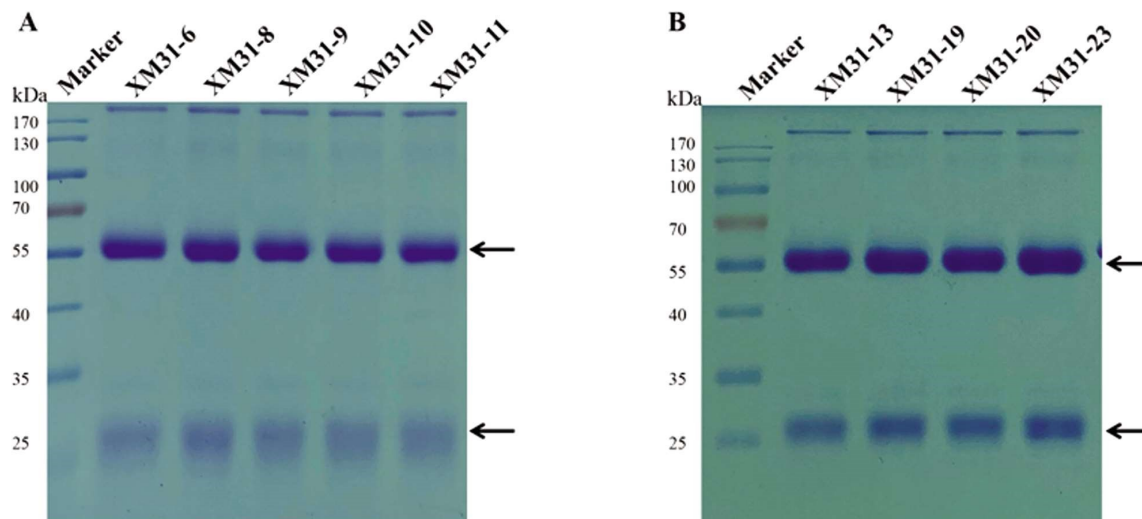


图 1 纯化单克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE profile of purified Mab

2.3 单抗亚型及中和活性检测

利用假病毒中和实验对上述 9 种单抗进行抗体亚型、中和活性及交叉中和活性检测, 重复两次, 其中 9 种单抗抗体类型均为 IgG1, 6 种存在交叉中和活性, 其余 3 种为 HPV31 L1 型别特异性单抗分别为 XM31-10、XM31-13、XM31-23, 其中和

IC_{50} 值分别为 25.83 ng/mL、0.36 ng/mL、7.10 ng/mL (如表 1), 无关抗体 (His 标签抗体) 阴性对照组对九种型别的假病毒均未检测到中和活性, 阳性对照组 (九种型别的 VLP 免疫血清) 在 1:1000 稀释度下, 对相应型别的假病毒中和率均为 100%。

表 1 单抗中和活性及交叉中和活性检测

Table 1 Monoclonal neutralizing activity and cross-neutralization activity detection

Mab	Isotype	Neutralizing activity against HPV31 (IC_{50} , ng/mL)	Cross-neutralizing activity (IC_{50} , μ g/mL)	
			HPV52	HPV16/HPV18/HPV58/HPV33/HPV45/HPV6/HPV11
XM31-6	IgG1	16.13	20.40	-
XM31-8	IgG1	16.34	1.60	-
XM31-9	IgG1	17.07	4.67	-
XM31-10	IgG1	25.83	-	-
XM31-11	IgG1	13.10	10.32	-
XM31-13	IgG	0.36	-	-
XM31-19	IgG1	7.14	6.19	-
XM31-20	IgG1	6.91	59.72	-
XM31-23	IgG1	7.10	-	-

注: IC_{50} 值, 使用 Reed-Muench 法计算, 抗体的平均分子量按照 150 kDa 计算。

Note: IC_{50} value, calculated by reed Muench method, the average molecular weight of antibody is 150 kDa.

2.4 HPV31 中和单抗结合活性检测

利用 GraphPad Prism 5 软件分析 HPV31 中和单抗与 HPV31 L1VLP 的 ELISA 结果, 发现纯化后的 9 种中和单克隆抗体均可与 HPV31 L1VLP 结合 (如图 2)。通常情况下, ELISA

检测抗体工作浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ [25,26], 本研究获得的 9 种中和单克隆抗体在该浓度范围内与 HPV31 L1VLP 结合活性均较高。检测抗体浓度为 4 ng/mL 时, 除 XM31-13 外, 其余 8 种抗体的结合活性显著高于阴性对照组 ($P < 0.01$); XM31-13 在浓度为

8 ng/mL时,其结合活性显著高于阴性对照组($P<0.01$);此外当检测抗体浓度为 64 ng/mL时, XM31-10, XM31-20, XM31-23 结合活性显著高于其余几种单抗(如图 2D)。阴性对照组在各个稀释度下的 $OD_{490\text{ nm}}$ 均在 0.1 左右。由于目前没有商业化

HPV31 单克隆抗体,我们采用 HPV31 VLP 免疫血清作为阳性对照,以判定检测系统是否有效。在 1:100 的稀释度下,免疫血清的 $OD_{490\text{ nm}}$ 为 3.32 左右。

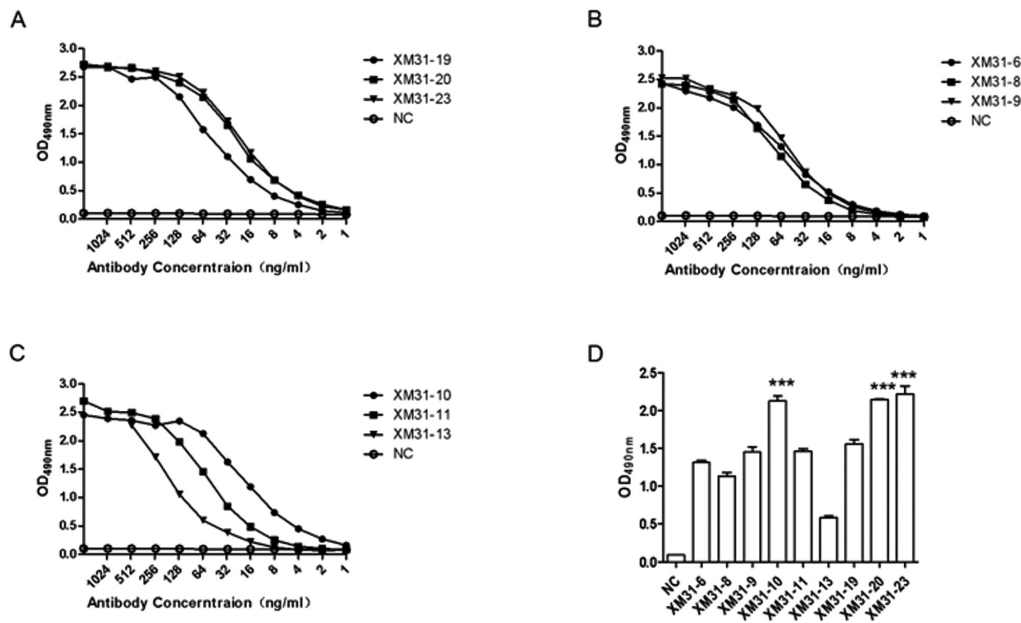


图 2 单克隆抗体的结合活性检测

Fig.2 Detection of binding activity of monoclonal antibodies

NC, negative control(His-tag Mab);*** $P<0.001$, compare with NC, XM31-6, XM31-8, XM31-9, XM31-11, XM31-13, XM31-19 groups

3 讨论

本研究收集杂交瘤细胞上清,首先采用 HPV31 VLP-ELISA 对杂交瘤上清的结合活性进行初步的鉴定分析,随后我们又对筛选出的上清进行了 HPV31 假病毒中和活性的检测。为了便于各杂交瘤分泌中和抗体的中和活性的比较分析及交叉中和活性的分析,我们对筛选纯化后的单抗,然后进行了 IC_{50} 值的分析、表位构象特征的分析、抗体亚型的分析,最终获得了 9 株构象依赖的 HPV31 中和单抗。

由于 VLP 疫苗主要诱发型别特异性的中和抗体,交叉中和和其他型别的能力很低或没有,因此目前上市的疫苗多为不同型别 VLP 的混合疫苗^[7]。为了配合含 HPV31 VLP 的多价 HPV 混合疫苗的研究,我们对上述 9 株纯化抗体的交叉中和活性进行了分析,为了提高交叉中和活性的严谨性,在分析交叉中和活性时,各株单抗使用的检测浓度高达 100 $\mu\text{g/mL}$,比 IC_{50} 值高出 2560 倍至 2.8×10^5 倍。最后合计筛出了 3 株型别特异性的构象依赖中和单抗,分别是 XM31-10、XM31-13、XM31-23。文献报道显示,HPV16/-18/-6/-11 四价苗(Gardasil)采用 HPV16 构象依赖的特异性中和单抗 H16.V5,及 HPV18 构象依赖的特异性中和单抗 H18.J4 进行竞争性 ELISA,分析检测人体免疫血清的型别特异性中和抗体水平,两种单抗在其筛选的相应型别的系列特异性构象中的 IC_{50} 值均较低,分别为 0.16 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.22 $\mu\text{g/mL}$ ^[15]。临床试验表明,与 H16.V5 竞争性的抗体水平与疫苗针对 HPV16 的免疫保护活性具有很好的相关性^[28],提示从型别特异性构象依赖单抗中筛选 IC_{50} 值较低的中和单抗

用于人群疫苗活性的评价可望获得检测方法简易的疫苗评价方法。值得注意的是,与 H18.J4 竞争性的抗体水平与疫苗针对 HPV18 的免疫保护活性相关性较差,可能与 H18.J4 不是人群中识别的主要中和抗体表位^[29]。因此,在不同型别构象依赖单抗的筛选中,要多选几株 IC_{50} 值较低的构象依赖单抗进行研究。

目前 HPV31 L1 的中和单抗仅有两株单抗分别为 H31.5F12 和 H31.5D10^[16,30],均采用酵母表达的 31 L1VLP 筛选获得。H31.5F12 为构象表位依赖的中和单抗,H31.5D10 为线性表位依赖的中和单抗,其中和 EC_{50} 分别为 5.2 ng/mL、9.1 ng/mL。本研究获得的 9 株单抗的 IC_{50} 在 0.36-25.83 ng/mL 之间,特别是其中的 5 种单抗 IC_{50} 值小于 10 ng/mL,此外,与上述研究不同,本研究获得的单抗是采用昆虫细胞表达的 31 L1VLP 筛选获得的。不同表达体系生产的抗原其翻译后修饰存在差异,因此单抗与不同来源的抗原结合活性可能存在差异。目前已经上市和正在进行临床试验的 HPV VLP 疫苗采用了包括大肠杆菌、酵母、昆虫细胞在内的多个表达系统,因此疫苗的质控需要对不同体系产品结合活性均好的优势表位中和抗体,需要从不同来源的多株单抗中进行优选获得。因此,本研究获得的 9 种 HPV31 单抗,特别是 2 株中和活性强、 IC_{50} 值较低的构象依赖单抗 XM31-13 和 XM31-23,在含 HPV31 的多价疫苗中具有潜在的应用价值。

参考文献(References)

- [1] Lechien J R, Seminerio I, Descamps G, et al. Impact of HPV Infection on the Immune System in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review [J]. Cells, 2019, 8

- (9): 1061
- [2] Joseph D A, Miller J W, Xiaocheng W, et al. Understanding the burden of human papillomavirus-associated anal cancers in the US [J]. *Cancer*, 2010, 113(S10): 2892-2900
- [3] Xiaocheng W, Genevieve M, Chen V W, et al. Descriptive epidemiology of vaginal cancer incidence and survival by race, ethnicity, and age in the United States [J]. *Cancer*, 2010, 113(S10): 2873-2882
- [4] Hernandez B Y, Jill B S, German R R, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003 [J]. *Cancer*, 2010, 113(S10): 2883-2891
- [5] Daan G, Laia A, Nuria G, et al. Detection of rare and possibly carcinogenic human papillomavirus genotypes as single infections in invasive cervical cancer [J]. *Journal of Pathology*, 2012, 228(4): 534-543
- [6] Schiller J T, Lowy D R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines [J]. *Nature reviews. Microbiology*, 2012, 10(10): 681-692
- [7] Bruni L, Albero G, Serrano B, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019
- [8] Baker T S, Newcomb W W, Olson N H, et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction [J]. *Biophysical Journal*, 1991, 60(6): 1445
- [9] Qinjian Z, Potter C S, Bridget C, et al. Characterization of virus-like particles in GARDASIL by cryo transmission electron microscopy [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(3): 734-739
- [10] Buck C B, Cheng N, Thompson C D, et al. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(11): 5190-5197
- [11] Matthias W, Garcea R L, Nikolaus G, et al. Subunit interactions in bovine papillomavirus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(14): 6298-6303
- [12] Zavalov O. Mesoscale Model For The Self-Assembly And Cross-Linking Dynamics of HPV Virus-Like Particles: APS March Meeting 2018, 2018
- [13] Zhang X, Li S, Modis Y, et al. Functional assessment and structural basis of antibody binding to human papillomavirus capsid [J]. *Reviews in Medical Virology*, 2016, 26(2): 115-128
- [14] Zhao Q, Modis Y, High K, et al. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity [J]. *Virology Journal*, 2012, 9(1): 52
- [15] Smith J F, Kowalski R, Esser M T, et al. Evolution of type-specific immunoassays to evaluate the functional immune response to Gardasil: a vaccine for human papillomavirus types 16, 18, 6 and 11 [J]. *Human Vaccines*, 2008, 4(2): 134-142
- [16] Brown M J, Hanna S, Victoria T, et al. Development of neutralizing monoclonal antibodies for oncogenic human papillomavirus types 31, 33, 45, 52, and 58 [J]. *Clinical & Vaccine Immunology* Cvi, 2014, 21(4): 587
- [17] Einstein M H, Peter T, Archana C, et al. Comparison of long-term immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine and HPV-6/11/16/18 vaccine in healthy women aged 18-45 years: end-of-study analysis of a Phase III randomized trial [J]. *Human Vaccines*, 2014, 10(12): 3455-3465
- [18] Eve D, Bissett S L, Rebecca H J, et al. A randomized, observer-blinded immunogenicity trial of Cervarix and Gardasil Human Papillomavirus vaccines in 12-15 year old girls [J]. *Plos One*, 2013, 8(5): e61825
- [19] Einstein M H, Baron M, Levin M J, et al. Comparison of the immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 vaccine and the HPV-6/11/16/18 vaccine for oncogenic non-vaccine types HPV-31 and HPV-45 in healthy women aged 18-45 years [J]. *Hum Vaccin*, 2011, 7(12): 1359-1373
- [20] Ya-ru H, Ting Z, Hong-yang L, et al. A C-terminal truncated HPV31 L1 gene can be used to produce L1 VLP vaccine in baculovirus system with high yield and good immunogenicity [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2019, v39(3): 343-347
- [21] Xu Y, Wang Q, Han Y, et al. Type-specific and cross-reactive antibodies induced by human papillomavirus 31 L1/L2 virus-like particles [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56(Pt 7): 907
- [22] K Hler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Biotechnology*, 1975, 24(5517): 524
- [23] Zhang T, Xu Y, Qiao L, et al. Trivalent Human Papillomavirus (HPV) VLP vaccine covering HPV type 58 can elicit high level of humoral immunity but also induce immune interference among component types [J]. *Vaccine*, 2010, 28(19): 3479-3487
- [24] Min-Fa Z, Jia-you L, Er-xiang L, et al. Identification of Anti-human IgG Monoclonal Antibodies and Monoclonal Antibodies with Confined Subclass Reactivity [J]. *Science China Chemistry*, 1984, 27(8): 818
- [25] Min L, Zhi-jie L, Min-xi W, et al. Monoclonal antibodies against HPV11 virus-like particles: functional characteristics and application on quality assessment [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2016, 36(4): 9-14
- [26] Sehr P, Müller M, Höpfl R, et al. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 106(1): 61-70
- [27] Buck C B, Day P M, Trus B L. The papillomavirus major capsid protein L1 [J]. *Virology*, 2013, 445(1-2): 169-174
- [28] Krajden M, Cook D, Yu A, et al. Human Papillomavirus 16 (HPV 16) and HPV 18 Antibody Responses Measured by Pseudovirus Neutralization and Competitive Luminex Assays in a Two- versus Three-Dose HPV Vaccine Trial [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(3): 418-423
- [29] Yan-Chun L, Ting Z, Xi-Xiu X, et al. Preparation and Application of Neutralizing Monoclonal Antibodies Against Human Papillomavirus Type 58 [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28(1): 93-98
- [30] Roberts C, Green T, Hess E, et al. Development of a human papillomavirus competitive luminex immunoassay for 9 HPV types [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(8): 2103-2174