

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.20.001

· 基础研究 ·

HPV18 L2 保守中和表位肽协同 MF59 与 CpG-ODN 免疫
可诱发广谱中和抗体反应*马铭饶 郝亚茹 张 婷 刘洪洋 王志荣 夏百成 周 艳 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:人乳头瘤病毒(HPV)次要外壳蛋白 L2 保守中和表位肽可诱发交叉中和抗体,研究 L2 保守中和表位肽免疫原性的特点利于 HPV 通用疫苗的研发。HPV18 是第二常见的优势流行高危型,但 18L2 保守表位肽的免疫活性未见报道。**方法:**本研究采用化学法合成 HPV18 L2N 端多肽(18RG-1)并偶联 KLH 获得 18RG1-KLH 肽;联合 MF59/CpG-ODN 复合佐剂或弗氏佐剂皮下免疫 BALB/c 小鼠 5 次,用假病毒中和实验检测抗血清针对 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 及 $\alpha 11$ 亚属中多个致癌型 HPV 的中和抗体。**结果:**MF59/CpG-ODN 复合佐剂多肽组抗血清对所有 6 种检测型别的中和活性与弗氏佐剂多肽组的相当。MF59/CpG-ODN 佐剂多肽组抗血清具有广谱中和活性,中和范围至少包括 14 种致癌型 HPV,中和抗体滴度最高的为 HPV45 (438)和 HPV18 (325),其次为 HPV68 (163)和 HPV70 (150),这四种优势中和型别均为 $\alpha 7$ 亚属。**结论:**首次发现 HPV18 L2 RG1 保守中和表位免疫血清可诱发广谱中和抗体反应(其中对 $\alpha 7$ 亚属的 HPV 中和活性最强,为优势中和型别)。研究结果为基于 L2 保守表位的广谱 HPV 疫苗研发奠定基础。

关键词:人乳头瘤病毒 18 型;L2 保守中和表位;广谱中和抗体

中图分类号:R-33;R730.261;R457.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)20-3801-06

Conservative Neutralizing Epitope of Human Papillomavirus Type 18 L2
Immunized with MF59 and CpG-ODN Can Induce Broad-spectrum
Neutralizing Antibodies*MA Ming-rao, HAO Ya-ru, ZHANG Ting, LIU Hong-yang, WANG Zhi-rong, XIA Bai-cheng, ZHOU Yan, XU Xue-mei[△]

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

ABSTRACT Objective: The human papillomavirus (HPV) minor coat protein L2 contains conservative neutralizing epitope which can induce cross-neutralizing antibodies. It is beneficial to analyze the immunogenicity of L2 conservative neutralizing epitopes for the development of HPV universal vaccines. HPV18 is the second most prevalent high-risk type worldwide, but the immunogenicity of the 18L2 peptide has not been reported. **Methods:** HPV18 L2 peptide (18RG-1) was synthesized by chemical methods and conjugated with KLH to construct 18RG1-KLH; BALB/c mice were immunized five times with MF59/CpG-ODN or Freund's Adjuvant. Neutralizing antibodies against oncogenic HPVs from $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 11$ species were detected by pseudovirus neutralization assay. **Results:** The neutralizing activity of the antiserum of the MF59/CpG-ODN group against all 6 detected types is equivalent to that of the Freund's Adjuvant group. The antiserum of the MF59/CpG-ODN group, which can at least neutralize 14 oncogenic HPVs, has broad-spectrum neutralizing activity. The highest neutralizing antibody titers are against HPV45 (438) and HPV18 (325), followed by HPV68 (163) and HPV70 (150), all belong to $\alpha 7$ specie. **Conclusions:** It is discovered for the first time that conservative neutralizing epitope HPV18 L2RG1 can induce broad-spectrum neutralizing activity (neutralizing activity against $\alpha 7$ species is the strongest). The results lay the foundation of the development of broad-spectrum HPV vaccines based on L2 conserved epitopes.

Key words: Human papillomavirus type 18; L2 conservative neutralizing epitope; Broad-spectrum neutralizing antibody

Chinese Library Classification: R-33; R730.261; R457.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)20-3801-06

* 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);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目基金(2020-I2M-2-014);国家自然科学基金面上项目(31970867)

作者简介:马铭饶(1996-),女,硕士研究生,主要研究方向:病原生物学,电话:15313157883,E-mail:mamingrao0516@163.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:病原疫苗,E-mail:xuemeixu@vip.sina.com,

E-mail: xuemeixu@ibms.pumc.edu.cn, 电话:010-69156442

(收稿日期:2020-06-23 接受日期:2020-07-18)

前言

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染人的上皮组织,引起良恶性增生,目前已鉴定出 200 多型,根据病毒主要外壳蛋白 L1 氨基酸序列的同源性可分为 5 个属 ($\alpha, \beta, \gamma, \mu, \nu$ 属), 根据感染部位的不同可分为黏膜型和皮肤型^[1]。黏膜型 HPV 又分为诱发恶性肿瘤的致癌型和诱发黏膜疣状增生的低危型,致癌型有 20 多种,诱发约 100 % 宫颈癌、88 % 肛周癌、43 % 阴户癌、70 % 阴道癌 / 阴茎癌及 72 % 头颈癌^[2-4], 包括 12 种常见的高危型 (HPV16、-18、-31、-33、-35、-45、-52、-58 等) 及 10 余种少见的可能 / 可疑高危型,分布于 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 及 $\alpha 11$ 亚属^[5]。

目前上市的 4 种 HPV L1 病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 疫苗,包括葛兰素史克的二价苗 (HPV16/-18)^[6,7]、默沙东的四价苗 (HPV6/-11/-16/-18)^[8] 和九价苗 (HPV6/-11/-16/-18/-31/-33/-45/-52/-58)^[9]、及万泰的二价苗 (HPV16/-18)^[10], 其中保护范围最宽的九价苗才只涵盖有限的 7 种高危型, 另外 L1VLP 疫苗不能通过无限制的增加 L1VLP 的型别来扩大保护范围, 因此 L1VLP 疫苗不能完全满足宫颈癌及其他相关恶性肿瘤的预防需求。

研究发现, 与 L1VLP 主要诱发型别特异性中和抗体及保护作用不同^[11], HPV16 L2 含有交叉中和表位 (aa.17-36, 又称 RG-1 表位肽), 16L2 多肽或以 16RG-1 为基础的 L2 表位疫苗, 包括多型 L2 融合蛋白疫苗和表面展示 L2 表位肽的嵌合 VLP (chimeric VLP, cVLP) 疫苗, 均可诱发较强的交叉中和抗体, 且具有交叉保护作用^[12]。因此深入研究不同型别, 特别是危害严重型别的 L2 多肽的免疫原性, 对研发具有交叉中和活性的 HPV 疫苗意义重大。尽管目前相继报道一些型别的 RG-1 同源区多肽的疫苗相关研究, 而且发现不同型别 RG-1 表位肽的免疫原性具有差异, 其抗血清的保护范围各具特色^[12-18], 但是缺乏对 18RG-1 同源区多肽免疫活性的相关研究。

HPV18 是仅次于 HPV16 的优势高危型, HPV18 在世界和中国的宫颈癌组织中检出率均位居第二位, 分别为 14.2 % 和 9.6 %。此外, HPV18 还是诱发宫颈癌的主要型别, 在世界和中国的宫颈腺癌中检出率分别高达 34.9 % 和 36.4 %。HPV18 隶属 $\alpha 7$ 亚属, 除 HPV18 外, $\alpha 7$ 亚属中的其他型别在宫颈腺癌中的检出率也较高, 其中 HPV45 的检出率为 5.7 % (位居第三位)^[2]。与宫颈鳞癌相比, 宫颈腺癌向内生长, 不易早期发现, 卵巢转移率高、预后效果差^[19]。

为此本研究采用 18RG1-KLH 多肽免疫小鼠, 对其抗血清的交叉中和活性进行分析。由于线性肽的免疫原性弱, 其他型别 RG-1 表位肽免疫原性的相关研究多采用完全弗式佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 进行初次免疫, 不完全弗式佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA) 进行强化免疫, 但弗式佐剂含有灭活的卡介苗和矿物油等物质, 常引起注射部位的肉芽肿及溃烂, 且弗式佐剂的完全乳化耗时费力 (需 1 小时左右), 限制了单次免疫的抗原肽的数目, 不利于抗原肽的筛选。因此, 本研究在弗式佐剂的基础上, 又增加了一种新型复合佐剂, 即采用 MF59 联合 C 型 CpG-ODN (C274) 免疫小鼠。结果表明

18RG1-KLH 多肽抗血清可以中和所有 14 种检测型别, 其中对 $\alpha 7$ 亚属的 6 种型别 (HPV18、-39、-45、-59、-68、-70) 的中和活性最强; 而且 MF59/CpG-ODN 复合佐剂多肽组抗血清对检测型别的中和活性与弗氏佐剂多肽组的相当。

1 材料与方法

1.1 材料

293TT 细胞系、pfbwB 质粒、p16SHELL 质粒、p18SHELL 质粒、p45SHELL 质粒、p68SHELL 质粒 (美国国立卫生研究院肿瘤研究所 John T.Schiller 教授及德国肿瘤研究中心 Martin Müller 教授惠赠); p52SHELL 质粒、p58SHELL 质粒 (日本国立传染病研究所 Tadahito Kanda 教授惠赠); p35SHELL 质粒、p39SHELL 质粒及 p59SHELL 质粒 (英国健康保护署 Simon Beddows 博士和 Phil Luton 博士惠赠); p33SHELL 质粒 (本实验室构建); pVITRO-HPV53L1L2 质粒、pVITRO-HPV66L1L2 质粒、pVITRO-HPV70L1L2 质粒、pVITRO-HPV73L1L2 质粒 (Addgene plasmid # 52599、# 52602、# 52603、# 52588); DMEM 培养基 (Invitrogen 公司); 弗式完全佐剂及弗式不完全佐剂 (Sigma 公司); MF59 佐剂 (本实验室合成) 及 CpG-ODN 佐剂 (上海生工生物工程股份有限公司合成); BALB/c 小鼠 (4~6 周, 雌性) 8 只 (北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号 No. 1103241911027112)。

1.2 方法

1.2.1 18RG1-KLH 多肽的合成 参照 GenBank 序列号为 NP_040316.1 的 HPV18 L2 氨基酸 16-35 位设计 (N 端改造) 并合成 18RG-1 (由上海吉尔生化有限公司合成), 采用 HPLC 纯化, 纯度大于 95 %。以 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 为活化剂, 将 18RG-1 偶联到 KLH 载体上, 获得 18RG1-KLH 多肽, 用 PBS 溶解备用。

1.2.2 18RG1-KLH 多肽免疫 BALB/c 小鼠 将 BALB/c 小鼠按照图 1 所示流程进行免疫, 分别在第 0、21、35、49 及 63 天进行多肽免疫, 其中初次免疫使用 100 μ g 18RG1-KLH 多肽联合 CFA 或 MF59/CpG-ODN 佐剂进行皮下注射, 强化免疫使用 50 μ g 18RG1-KLH 多肽联合 IFA 或 MF59/CpG-ODN 佐剂进行皮下注射。最后一次免疫后两周 (第 77 天) 尾部采血, 分离血清备用。

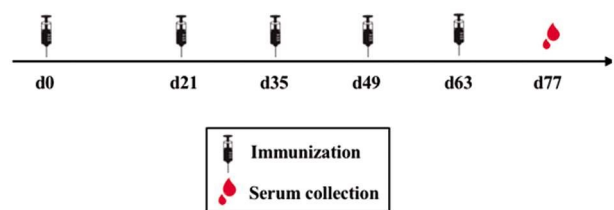


图 1 18RG1-KLH 免疫流程图

Fig.1 Schematic diagram of 18RG1-KLH immunization regimen

1.2.3 假病毒的制备 如文献所述^[20], 使用 HPV L1/L2 外壳蛋白表达质粒 (p18SHELL 等) 分别联合 pfbwB 质粒共转染 293TT 细胞, 37 °C 孵育 24 h。使用 5 mol/L NaCl 抽提假病毒, 感染细胞并分别检测不同型别假病毒的滴度, -80 °C 保存备用。

1.2.4 假病毒中和实验 采用假病毒中和实验进行抗血清中

和抗体水平分析,主要步骤如下^[21]:使用 DMEM 完全培养基稀释假病毒,将感染后的阳性荧光细胞百分比控制在 1%~25% (3%~25%较准确)。将稀释后的假病毒与倍比稀释的待测免疫血清等体积混合,将假病毒稀释液与等体积的 DMEM 完全培养基混合作为阴性对照组,4℃孵育 1 h,然后将每孔的混合液加入至预先铺好的 293TT 细胞中(3×10^4 个/100 μ L),37℃、5% CO₂ 孵育 72 h。消化细胞,转入流式管,使用流式细胞仪检测各孔细胞荧光。一定稀释度下的假病毒感染抑制率通过如下公式计算:感染抑制率=(1-待测血清样品中的荧光细胞百分数/阴性对照样品中的荧光细胞百分数)×100%。感染抑制率大于 50%的最高血清稀释倍数即为其中和抗体滴度。血清 1:25 稀释时感染抑制率小于 50%则认为该血清无中和活性。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad prism8 软件分析实验数据并作图,采用双尾非配对 t 检验进行统计学分析,比较组间差异。 $P < 0.05$ 时,认为进行比较的数据之间存在统计学上的显著性差异。

2 结果

2.1 18RG1-KLH 多肽抗血清对 HPV18 中和活性的检测

18RG1-KLH 多肽在小鼠体内可诱发产生针对 HPV18 的中和抗体,该多肽联合弗式佐剂时,其平均中和抗体滴度为 75,阳转率为 4/4;联合 MF59/CpG-ODN 佐剂时,其平均中和抗体滴度为 325,阳转率为 4/4。两个佐剂组之间无明显统计学差异($P=0.1078$),但 MF59/CpG-ODN 混合佐剂多肽组诱发的针对 HPV18 的中和抗体滴度较高(见图 2)。

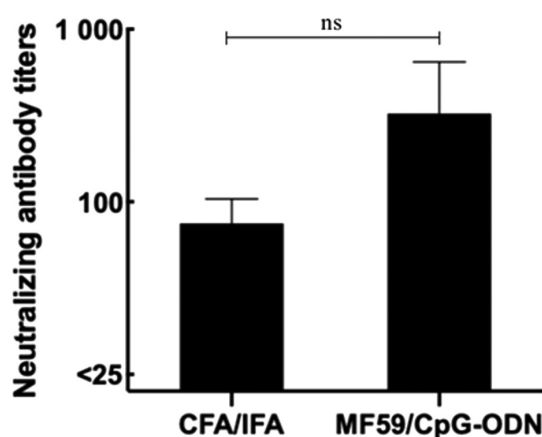


图 2 18RG1-KLH 可诱发小鼠产生针对 HPV18 的中和抗体

Fig.2 18RG1-KLH induced neutralizing antibodies against HPV18 in mice

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=4$. ns, $P > 0.05$.

2.2 18RG1-KLH 多肽抗血清对 $\alpha 7$ 亚属 HPV 的交叉中和活性的检测

除 HPV18 外,18RG1-KLH 多肽联合弗式佐剂或 MF59/CpG-ODN 佐剂还可诱发针对至少 5 种 $\alpha 7$ 亚属的致癌型 HPV 的交叉中和抗体,分别为 HPV39,-45,-59,-68,-70,其中 MF59/CpG-ODN 佐剂多肽组针对 HPV45 的平均中和抗体滴度最高,平均滴度为 438,阳转率为 4/4;针对 HPV68,-70 的中和抗体滴度次之,平均滴度分别为 163 和 150;针对 HPV39,-59

的中和抗体水平相对较低,平均滴度分别为 32 和 25 (见图 3)。两个佐剂组之间无明显统计学差异(P 值均大于 0.05),但 MF59/CpG-ODN 混合佐剂多肽组诱发的针对 HPV45,-68,-70 的中和抗体滴度较高。

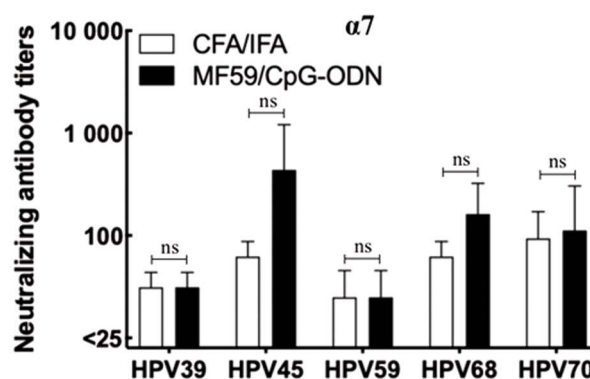


图 3 18RG1-KLH 可诱发小鼠产生针对 $\alpha 7$ -HPVs 的中和抗体

Fig.3 18RG1-KLH induced neutralizing antibodies against $\alpha 7$ -HPVs in mice

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=4$. ns, $P > 0.05$.

2.3 18RG1-KLH 多肽抗血清对 $\alpha 9$ 亚属 HPV 的交叉中和活性的检测

由于 MF59/CpG-ODN 佐剂多肽组抗血清的中和滴度略高于与弗式佐剂多肽组(无明显统计学差异),且 MF59/CpG-ODN 佐剂与抗原混合更方便快速,故选用 MF59/CpG-ODN 佐剂多肽组的抗血清对其它亚属的中和抗体进行检测。18RG1-KLH 多肽可中和至少 5 种 $\alpha 9$ 亚属的常见高危型 HPV,分别为 HPV16,-33,-35,-52,-58,其中针对 HPV16 的中和抗体滴度较高,平均滴度为 32,阳转率为 4/4;针对其余四种 HPV 型别的中和抗体滴度相当,平均滴度均为 25,阳转率均为 3/4(见图 4)。

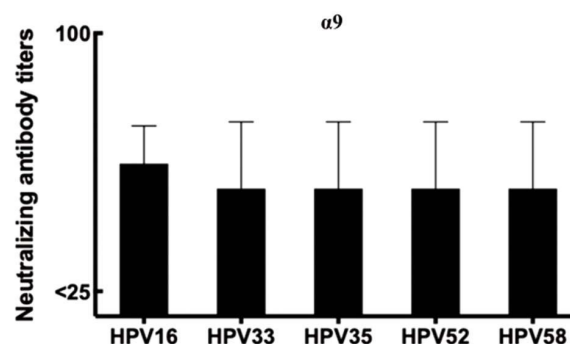


图 4 18RG1-KLH 可诱发小鼠产生针对 $\alpha 9$ -HPVs 的中和抗体

Fig.4 18RG1-KLH induced neutralizing antibodies against $\alpha 9$ -HPVs in mice

2.4 18RG1-KLH 多肽抗血清对 $\alpha 6/11$ 亚属 HPV 的交叉中和活性的检测

18RG1-KLH 多肽联合 MF59/CpG-ODN 佐剂的抗血清可至少中和 2 种 $\alpha 6$ 亚属和 1 种 $\alpha 11$ 亚属的致癌型 HPV,且针对这三种 HPV 型别的中和抗体水平相当,平均滴度均为 25,阳转率均为 3/4(见图 5)。

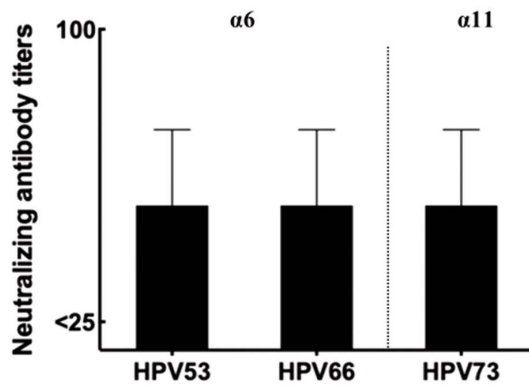


图5 18RG1-KLH 可诱发小鼠产生针对 α 6-HPVs 和 α 11-HPV 的中和抗体

Fig.5 18RG1-KLH induced neutralizing antibodies against α 6-HPVs and α 11-HPV in mice

3 讨论

HPV16 L2 的保守中和表位主要位于 N 端 120 个氨基酸, 其中 aa.17-36 为主要中和表位区, 该区又称 RG-1 表位肽, 该表位肽偶联 KLH 的兔免疫血清可中和 HPV16,-31,-52,-58 等多种型别^[12,13]。鉴于 RG-1 表位肽在 PV 间保守性很强 (见表 1), 其它几种型别如 HPV 6,-16,-17,-31,-33,-45,-58 的 RG-1 表位肽也用于了疫苗研究^[12-18], 比较分析显示不同型别的 RG-1 表位肽诱发的交叉中和抗体的水平和范围具有差异。目前已报道的 RG-1 表位肽中, 16RG-1、31RG-1、33RG-1 及 58RG-1 的免疫活性较好, 其抗血清中和型别较多、滴度较高^[12,15-17], 但这四种型别均为 α 9 亚属成员, 与 α 7 亚属型别的 RG-1 表位肽有一定的序列差异 (见表 1)。

表 1 不同型别 HPV RG-1 同源区的序列比较

Table 1 Sequence comparison of different types of HPV RG-1 homologous region

Species	Types	RG-1																					
$\alpha 7$	HPV18	16-	D	L	Y	K	T	C	K	Q	S	G	T	C	P	P	D	V	V	P	K	V	-35
	HPV39	16-	*	*	*	R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*	-35
	HPV45	16-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I	N	*	*	-35
	HPV59	16-	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	S	*	*	I	N	*	*	-35
	HPV68	16-	E	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I	N	*	*	-35
	HPV70	16-	*	I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*	-35
$\alpha 9$	HPV16	17-	Q	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	I	I	*	*	*	-36
	HPV31	17-	Q	*	*	Q	*	*	*	A	A	*	*	*	*	S	*	*	I	*	*	*	-36
	HPV33	16-	Q	*	*	Q	*	*	*	A	T	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	-35
	HPV35	17-	Q	*	*	R	*	*	*	A	A	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	-36
	HPV52	16-	Q	*	*	Q	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	-35
	HPV58	16-	Q	*	*	Q	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	-35
$\alpha 6$	HPV53	16-	Q	*	*	Q	*	*	*	*	*	*	*	*	*	E	*	*	I	N	*	*	-35
	HPV66	16-	Q	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	*	E	*	*	I	N	*	*	-35
$\alpha 11$	HPV73	16-	Q	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	-35

α 7 亚属中的致癌型别包括 HPV18,-39,-45,-59,-68,-70,-85, 其中 HPV18,-39,-45,-59 为较为常见, 又称高危型^[2]。目前仅有表面展示 45RG-1 表位肽的 HPV18 cVLP 的报道, 结果显示该 cVLP 的兔抗血清对 HPV18 的中和活性很差, 仅为 18L1VLP 的 1/100, 交叉中和活性也不理想, 仅能中和 HPV39,-45,-70, 中和滴度最高的仅为 100^[14], 这可能与 45RG-1 表位肽免疫原性较弱有关 (研究显示 HPV6 和 HPV17 的 RG-1 表位肽免疫原性很弱, 6RG1-KLH 和 17RG1-KLH 协同弗式佐剂的兔血清的中和抗体滴度低、保护范围窄^[15,18])。其它 α 7 亚属 RG-1 表位肽的研究未见报道, 因此有必要对 α 7 亚属的 RG-1 表位肽进行深入研究。HPV18 是 α 7 亚属中检出率最高的型别, 本研究发现, 18RG1-KLH 联合 MF59/CpG-ODN 佐剂多肽组小鼠血清可以中和所有 14 种检测型别, 其中对 α 7 亚属的 6 种型别 (HPV18,

-39,-45,-59,-68,-70) 的中和活性最强, 如针对 HPV18,-45 的滴度分别高达 325 和 438; 除 α 7 亚属外, 还可中和检测用的 5 种 α 9 亚属的高危型 (累计诱发约 68.5% 的宫颈癌) 及至少 2 种 α 6 亚属和 1 种 α 11 亚属的高危型。基于 RG-1 表位肽的疫苗研究发现, RG-1 相关抗原在兔模型中诱发的中和抗体反应高于小鼠模型中的^[16] (中和抗体滴度可相差 1 个数量级)。本研究的 18RG-1 表位肽在小鼠中诱发了针对至少 14 个型别的广谱中和抗体, 表明 18RG-1 表位肽具有很好的免疫原性。目前, 可预防 HPV 感染的中和抗体阈值尚不明确, 但研究发现, 在小鼠阴道攻击模型中, 低于假病毒中和抗体检测极限 100 余倍的血清抗体仍具有保护作用^[22], 提示本研究的 18RG-1 表位肽诱发的中和抗体对中和滴度较低的型别也可能有保护作用, 因此 18 RG-1 表位肽在研发广谱 HPV 疫苗中具有应用前景。

国际同行及我们课题组以 HPV16 L1VLP 为载体,在其表面展示 $\alpha 9$ 亚属中不同型别的 RG-1 表位,报道了 3 种诱发广谱中和抗体较好的 HPV16 cVLP^[12,15-17],分析发现,上述 cVLP 抗血清针对 $\alpha 9$ 亚属 HPV 的中和作用都很强,提示将 RG-1 表位肽插入至同亚属的 HPV L1 中,可强化针对该亚属 HPV 的中和作用,故 18RG-1 表位肽也可通过插入至同亚属 HPV L1、构建 18RG1-cVLP 的方式来进一步提高其对 $\alpha 7$ 亚属的中和活性,但单型 cVLP 诱发的 L2 依赖抗体对某些型别的中和滴度较低,不利于持久的免疫保护活性的维持。为了强化针对 $\alpha 7$ 亚属的中和活性,同时弥补单型 RG1-16L1 cVLP 的不足,下一步工作我们将把 18RG-1 表位肽插入至同亚属的 HPV L1 中(特别是 HPV18 L1VLP 的表面区),筛选获得免疫活性好的 18RG1-cVLP,然后与本课题组构建的展示 $\alpha 9$ 亚属 RG-1 表位的 HPV16 cVLP 联合应用,实现优势互补,可望克服 HPV L1VLP 疫苗的缺陷;此外,18RG-1 表位肽还可通过将其与免疫活性好的其它 L2 表位肽串联构建多表位 L2 疫苗^[23-26]或展示于其它不同载体(如细菌硫氧还蛋白 Trx^[27-29]、靶向 IgYR 改造抗体^[30,31]等)表面来进一步提高其中和活性。

本研究中还使用了一种新型复合佐剂,即 MF59/CpG-ODN 复合佐剂。MF59 佐剂充分乳化后可形成水包油乳液,稳定性好,主要活化体液免疫,以 MF59 为佐剂的流感疫苗 Flud[®] 已获批上市,累计销售超 6000 万剂,显示出了良好的安全性^[32,33]。CpG-ODN 是 Toll 样受体 9 的配体,可分为 A、B、C、P 四种类型,C274 属于 C 型,可诱导 B 细胞和浆细胞样树突状细胞的增值分化^[34-37]。本研究结果显示,MF59/CpG-ODN 佐剂组与 CFA/IFA 佐剂组诱发的中和抗体水平无统计学差异。

参考文献(References)

- [1] Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types[J]. *Virology*, 2015, 476: 341-344
- [2] 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[J]. Summary Report, 2019, 17
- [3] 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 China[J]. Summary Report, 2019, 17
- [4] Yete S, D'Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications[J]. *Oncology*, 2018, 94(3): 133-141
- [5] Arbyn M, Tommasino M, Depuydt C, et al. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? [J]. *J Pathol*, 2014, 234 (4): 431-435
- [6] Schwarz TF, Huang LM, Valencia A, et al. A ten-year study of immunogenicity and safety of the AS04-HPV-16/18 vaccine in adolescent girls aged 10-14 years [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15 (7-8): 1970-1979
- [7] Romanowski B, Schwarz TF, Ferguson L, et al. Sustained immunogenicity of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine administered as a two-dose schedule in adolescent girls: Five-year clinical data and modeling predictions from a randomized study [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(1): 20-29
- [8] Kjaer SK, Nygård M, Dillner J, et al. A 12-Year Follow-up on the Long-Term Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine in 4 Nordic Countries [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66 (3): 339-345
- [9] Vesikari T, Brodzski N, van Damme P, et al. A Randomized, Double-Blind, Phase III Study of the Immunogenicity and Safety of a 9-Valent Human Papillomavirus L1 Virus-Like Particle Vaccine (V503) Versus Gardasil[®] in 9-15-Year-Old Girls [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2015, 34(9): 992-998
- [10] Qiao YL, Wu T, Li RC, et al. Efficacy, Safety, and Immunogenicity of an Escherichia coli-Produced Bivalent Human Papillomavirus Vaccine: An Interim Analysis of a Randomized Clinical Trial [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(2): 145-153
- [11] Malagon T, Deolet M, Boily M-C, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(10): 781-789
- [12] Wang D, Li Z, Xiao J, et al. Identification of Broad-Genotype HPV L2 Neutralization Site for Pan-HPV Vaccine Development by a Cross-Neutralizing Antibody[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123944
- [13] Schellenbacher C, Huber B, Skoll M, et al. Incorporation of RG1 epitope into HPV16L1-VLP does not compromise L1-specific immunity [J]. *Vaccine*, 2019, 37(27): 3529-3534
- [14] Huber B, Schellenbacher C, Jindra C. et al. A chimeric 18L1-45RG1 virus-like particle vaccine cross-protects against oncogenic alpha-7 human papillomavirus types[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): 1-18
- [15] Chen X, Liu H, Wang Z, et al. Human papillomavirus 16L1-58L2 chimeric virus-like particles elicit durable neutralizing antibody responses against a broad-spectrum of human papillomavirus types[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 63333-63344
- [16] Chen X, Zhang T, Liu H, et al. Displaying 31RG-1 peptide on the surface of HPV16 L1 by use of a human papillomavirus chimeric virus-like particle induces cross-neutralizing antibody responses in mice[J]. *Hum Vaccine Immunother*, 2018, 14(8): 2025-33
- [17] Xu Xue-mei, Chen Xue, Wang Zhirong, et al. Papillomavirus Chimeric Protein and Application Thereof. *Complier: US, PCT/CN2017/075402 [P/OL]*. 2017-09-21
- [18] Huber B, Schellenbacher C, Shafii-Keramat S, et al. Chimeric L2-Based Virus-Like Particle (VLP) Vaccines Targeting Cutaneous Human Papillomaviruses (HPV) [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (1): e0169533
- [19] Galic V, Herzog TJ, Lewin SN, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma histology in women with cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 125(2): 287-291
- [20] Buck CB, Pastrana D V, Lowy DR, et al. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 119: 445-462
- [21] Dessy FJ, Giannini SL, Bougelet CA, et al. Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and pseudovirion-based neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine [J]. *Hum Vaccin*, 2008, 4 (6): 425-434
- [22] Longet S, Schiller JT, Bobst M, et al. A murine genital-challenge model is a sensitive measure of protective antibodies against human

- papillomavirus infection[J]. J Virol, 2011, 85(24): 13253-13259
- [23] Jagu S, Karanam B, Gambhira R, et al. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(11): 782-792
- [24] Kalnin K, Tibbitt T, Yan Y, et al. Low doses of flagellin-L2 multimer vaccines protect against challenge with diverse papillomavirus genotypes[J]. Vaccine, 2014, 32(28): 3540-3547
- [25] Kalnin K, Chivukula S, Tibbitts T, et al. Incorporation of RG1 epitope concatemers into a self-adjuvanting Flagellin-L2 vaccine broadens durable protection against cutaneous challenge with diverse human papillomavirus genotypes[J]. Vaccine, 2017, 35(37): 4942-4951
- [26] Zhang T, Chen X, Liu H, et al. A rationally designed flagellin-L2 fusion protein induced serum and mucosal neutralizing antibodies against multiple HPV types[J]. Vaccine, 2019, 37(30): 4022-4030
- [27] Seitz H, Ribeiro-Müller L, Canali E, et al. Robust In Vitro and In Vivo Neutralization against Multiple High-Risk HPV Types Induced by a Thermostable Thioredoxin-L2 Vaccine[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(10): 932-941
- [28] Spagnoli G, Bolchi A, Cavazzini D, et al. Secretory production of designed muropeptides displayed on a thermostable bacterial thioredoxin scaffold in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2017, 129: 150-157
- [29] Spagnoli G, Pouyanfar S, Cavazzini D, et al. Broadly neutralizing antiviral responses induced by a single-molecule HPV vaccine based on thermostable thioredoxin-L2 muropeptide nanoparticles [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 18000
- [30] Chen X, Liu H, Zhang T, et al. A vaccine of L2 epitope repeats fused with a modified IgG1 Fc induced cross-neutralizing antibodies and protective immunity against divergent human papillomavirus types [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95448
- [31] Zhang T, Liu H, Chen X, et al. Lipidated L2 epitope repeats fused with a single-chain antibody fragment targeting human FcγRI elicited cross-neutralizing antibodies against a broad spectrum of human papillomavirus types[J]. Vaccine, 2016, 34(46): 5531-5539
- [32] O'Hagan DT, Rappuoli R, De GE, et al. MF59 adjuvant: the best insurance against influenza strain diversity [J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(4): 447-462
- [33] O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, et al. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes [J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(1): 13-30
- [34] Marshall J, Fearon K, Abbate C, et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2003, 73(6): 781-792
- [35] Chuang YC, Tseng JC, Huang LR, et al. Adjuvant Effect of Toll-Like Receptor 9 Activation on Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1075
- [36] Fehér K. Single Stranded DNA Immune Modulators with Unmethylated CpG Motifs: Structure and Molecular Recognition by Toll-Like Receptor 9[J]. Curr Protein Pept Sci, 2019, 20(11): 1060-1068
- [37] Ma Y, Jiao YY, Yu YZ, et al. A Built-In CpG Adjuvant in RSV F Protein DNA Vaccine Drives a Th1 Polarized and Enhanced Protective Immune Response[J]. Viruses, 2018, 10(1): 38

(上接第 3835 页)

- [20] Kanzaki R, Naito H, Kise K, et al. Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10613
- [21] 林建中, 朱佳庚, 吴宏飞, 等. AXL 表达在前列腺癌细胞多西他赛耐药中的作用研究[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(4): 302-308
- [22] 张义朋, 黄华艳, 仰映婕, 等. 受体酪氨酸激酶 AXL 在肿瘤耐药中的作用研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2018, 38(7): 819-824
- [23] Scaltriti M, Elkabets M, Baselga J. Molecular Pathways: AXL, a Membrane Receptor Mediator of Resistance to Therapy[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(6): 1313-1317
- [24] Leconet W, Chentouf M, du Manoir S, et al. Therapeutic Activity of Anti-AXL Antibody against Triple-Negative Breast Cancer Patient-Derived Xenografts and Metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11): 2806-2816
- [25] Abdel-Rahman WM, Al-Khayyal NA, Nair VA, et al. Role of AXL in invasion and drug resistance of colon and breast cancer cells and its association with p53 alterations. World J Gastroenterol, 2017, 23(19): 3440-3448
- [26] 李微, 王彦明, 肖典. 基于 CAB 技术的新型 Axl 抗体偶联药物 -BA3011[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(6): 29-31, 51
- [27] 安然, 胡博, 郎小玲, 等. 靶向 Axl 药物在癌症治疗中的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 420-424
- [28] Woo SM, Min KJ, Seo SU, et al. Axl Inhibitor R428 Enhances TRAIL-Mediated Apoptosis Through Downregulation of c-FLIP and Survivin Expression in Renal Carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): E3253
- [29] Linger RM, Cohen RA, Cummings CT, et al. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(29): 3420-3431
- [30] Onken J, Torka R, Korsing S, et al. Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9876-9889