

文章编号: 1004-0374(2012)02-0174-07

表位疫苗的设计及应用研究进展

赵 德¹, 冯 磊¹, 张 强², 郭建宏², 高凤山^{1,2*}

(1 大连大学生命科学与技术学院, 分子免疫学实验室, 大连 116622; 2 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原微生物国家重点实验室, 兰州 730046)

摘 要: 表位疫苗相对传统疫苗拥有较多优势, 其最大的优点就是可以克服传统疫苗造成的毒力恢复或散毒的可能。另外表位疫苗本身无毒、稳定, 符合未来疫苗发展的方向。表位疫苗的设计需要从表位的筛选、优化及表位的组合等多方面展开。现对表位疫苗的设计策略及应用作一介绍。

关键词: 表位疫苗; 筛选; 优化; 抗原

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A

Design and application of epitope-vaccines

Zhao De¹, Feng Lei¹, Zhang Qiang², Guo Jian-Hong², Gao Feng-Shan^{1,2*}

(1 Laboratory of Molecular Immunology, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China; 2 Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Comparing to traditional vaccines, epitope-vaccine displays many advantages. The most outstanding advantage for epitope-vaccine is that it can avoid the disadvantages of virus-excretion and virulence recovery. In addition, the epitope-vaccine is atoxic and stable. Therefore, the epitope-vaccine meets to the developing direction of future vaccine. Design of epitope-vaccine needs to carry out from epitope-screening, optimization and assemblage of epitopes, etc. Presently, we will give an introduction to designing strategy and application of epitope-vaccine.

Key words: epitope-vaccine; screening; optimization; antigen

表位疫苗是近年来发展起来的一种新型疫苗, 它是利用基因工程手段, 体外表达或人工合成病原微生物的表位, 将其作为一种疫苗使用^[1]。表位(epitope) 又称抗原决定簇(antigenic determinance), 是抗原分子中决定抗原特异性的化学基团, 它能够与 T 细胞抗原受体 TCR 或 B 细胞抗原受体 BCR 特异性结合, 最终刺激机体产生免疫反应, 形成对病原微生物的免疫能力。相比较于传统疫苗, 表位疫苗安全、无毒、稳定, 可以直接刺激机体产生特异性免疫反应。因此, 表位疫苗更符合未来疫苗的发展方向。下面就表位疫苗的设计和应用按照图 1 展开介绍。

1 表位筛选

研制表位疫苗, 首先要筛选出需要的表位。表

位包括 T 细胞表位和 B 细胞表位。T 细胞表位由 T 细胞受体 (TCR) 识别, B 细胞表位由 B 细胞受体 (BCR) 识别。T 细胞表位在细胞内由主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 或 II 分子识别并递呈到细胞表面, 然后分别被 CD8⁺ 细胞毒 T 细胞的 TCR 识别和辅助性 CD4⁺ T 细胞的 TCR 识别。被 CD8⁺ 细胞毒 T 细胞的 TCR 识别的细胞表位称为细胞毒 T 细胞 (cytotoxic T leukocyte,

收稿日期: 2011-08-21; 修回日期: 2011-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972169, 3117-2304); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金(SKLVEB2009KFKT007)

*通信作者: E-mail: gfs0626@126.com; Tel: 0411-87402310

CTL) 表位, 后者称为辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 表位。B 细胞表位被 BCR 识别, 同时也能够被 MHC II 类分子递呈, 属于可溶性蛋白质抗原构象决定簇, 其与 MHC II 分子结合后的复合物在细胞表面被 BCR 识别。关于三类细胞表位的区别见表 1。

因此, 表位的鉴定可以利用与其相关的免疫反应来实现, T 细胞表位利用细胞免疫应答鉴定, B 细胞表位利用表位与抗体的特异反应鉴定^[2]。

1.1 酶、化学降解法

酶法主要是用酶水解蛋白抗原, 其原理是利

用胰蛋白酶、胃蛋白酶等降解蛋白质分子为小肽, 并筛选有功能的小肽用于抗原表位研究。化学降解法是用一些化学物质或者酶将蛋白质降解成多个多肽片段, 然后从降解得到的肽混合物中分离得到目的肽。利用化学降解法已成功从多种蛋白, 例如谷蛋白、细胞色素 *b*、珠蛋白、血清蛋白等中分离得到抗原表位多肽^[3]。化学法与酶法确定抗原表位的特异性高, 但操作复杂繁琐, 只能获得线性表位。

1.2 串联重复多肽合成法

串联重复多肽合成法是最早使用的筛选抗原表

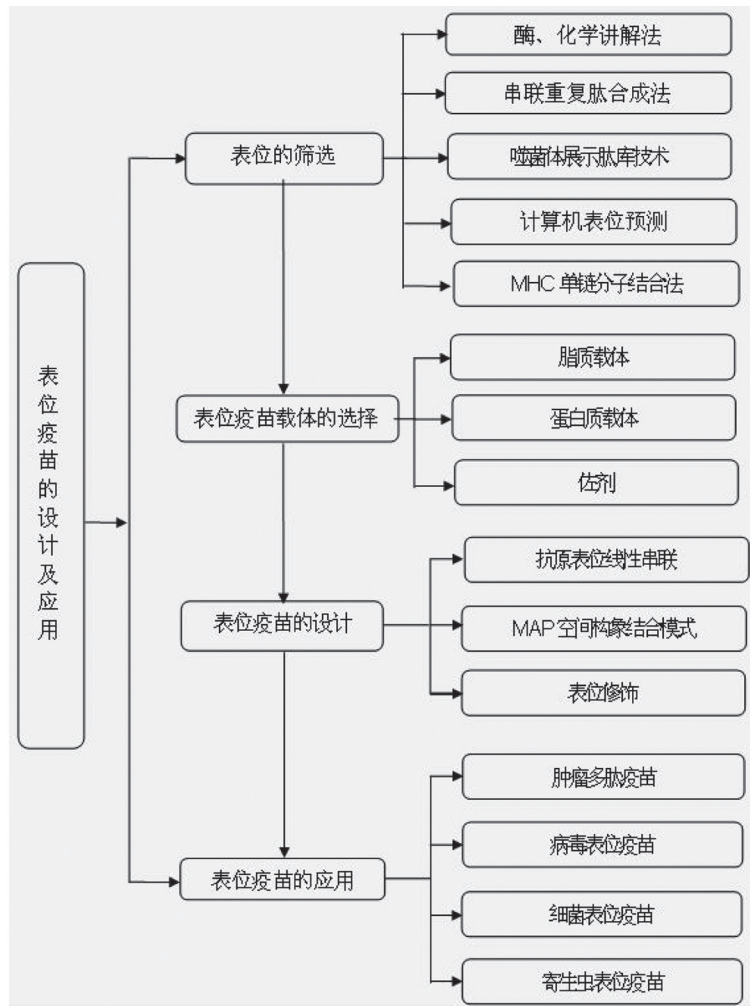


图1 表位疫苗的设计及应用示意图

表1 细胞表位的分类

表位类型	氨基酸数目	存在部位	递呈细胞	限制性	受体
细胞毒T细胞表位	8~10	有核细胞	抗原递呈细胞	MHC I类分子	T细胞受体
辅助性T细胞表位	13~21	有核细胞	抗原递呈细胞	MHC II类分子	T细胞受体
B细胞表位	20~40	B细胞		MHC II类分子	B细胞受体

位多肽的方法,该方法根据已知病原基因的氨基酸序列,合成连续重叠多肽,通过单纯的动物免疫学实验筛选出阳性片段。这一技术要求明确抗原分子的一级结构,只能检测抗原线性表位。另外该方法有很大的局限性,不但工作量大、费用高,而且重叠之间的表位有可能被忽略,所以不能够鉴定出目的蛋白上所有 T 细胞表位。

近来,该方法得到了改善,即不再依靠单纯费时和费力的动物免疫实验进行筛选,而是利用多肽表位在体内与 MHC 结合的原理,在体外筛选串联重复多肽。Axelsson-Robertson 等^[4]近来使用人 MHC I 类分子 HLA-A*3001 和 HLA-A*3002 来筛选结核分枝杆菌 TP104 蛋白串联重复肽中的细胞表位,结果筛选到了 3 个与 HLA-A*3001 结合的 TP104 多肽,和 22 个与 HLA-A*3002 结合的多肽。

1.3 噬菌体展示肽库技术

将编码表位多肽的寡聚核苷酸整合到编码噬菌体表面蛋白的基因上,该基因表达后的蛋白含有目的多肽,展示在噬菌体表面。通过设计出编码不同多肽的寡聚核苷酸,可以在噬菌体表面展示多达 10^9 以上不同的多肽序列,几乎可以涵盖所有的抗原表位。利用抗原表位可以与抗体进行特异性结合的特性,筛选出目的抗原表位。然后将抗体固定在酶标板上,与肽库噬菌体结合,洗去未结合的噬菌体,经过几轮筛选,就可以得到能够与抗体特异性结合的噬菌体,通过 DNA 序列分析,得出该噬菌体携带的外源序列,进而得出目的表位的氨基酸序列。

Gazarian 等^[5]最近利用噬菌体展示技术,构建了展示 7 肽至 12 肽的猪伪狂犬病毒的噬菌体展示库,最后筛选出一个由 10 个抗原肽组成的共有基序,免疫 C57BL/6 小鼠后发现在小鼠中产生了伪狂犬病毒的血清中和抗体;攻毒试验表明除了 2 只小鼠外,其余小鼠都能够存活。利用噬菌体展示肽库技术可以筛选出优势的抗原表位。然而,由于噬菌体展示库技术采用抗体结合原理,因而只能用于 MHC II 类分子递呈的 B 细胞或 Th 细胞表位的筛选,而不适用于 MHC I 类分子结合的 CTL 表位的筛选。

1.4 计算机表位预测

计算机表位预测是指通过计算机软件,预测 B 细胞表位或者 T 细胞表位。在已知抗原蛋白结构的基础上,可以做到既能预测构象表位,又能预测线性表位,并能够用图直观表示出来。在已知氨基酸序列的基础上,可以利用氨基酸的理化数据特征,

预测可能含有表位的区域。目前,已有多种软件可以预测目标蛋白的 B 细胞或 T 细胞表位,比如 EpiTOP、NetMHCpan 2.4 Server 等。Karosiene 等^[6]最近报道了几种最新的 MHC I 类分子结合的表位肽预测软件,包括 NetMHC、NetMHCpan 和 Pick-Pocket。经过实验比较发现,NetMHCpan 在预测的准确率方面要好于其他预测软件,并且可以适用于预测任何动物 MHC I 类分子结合的多肽表位。另外,El-Manzalawy 和 Honavar^[7]最近报道了 B 细胞表位的预测方法,包括预测线性表位和构象表位。B 细胞线性表位的预测方法包括 Propensity Scale methods、Improved Scale methods 和 Machine learning methods 等。前两者用到的预测软件有 PREDITOP、PEOPLE、BETITOPE 和 BcePred,而后者所用的软件为 ABCPred。B 细胞构象表位的预测方法有 sequence-based prediction methods、structure-based prediction methods 和 Mimotope analysis-based prediction methods。构象表位预测所用到的软件分别有 CEP、DiscoTope、Ellipro、PEPITO 等。

1.5 MHC 单链分子结合法

多肽与 MHC I 复合体结合的研究开始于 1992 年,Godeau 等^[8]采用一个富含甘氨酸-丝氨酸的 15 个氨基酸接头将小鼠 H-2Kd 胞外区和 $\beta 2m$ 进行拼接后,转入杆状病毒载体并在昆虫细胞中进行表达,表达的蛋白在体外可以结合 H-2Kd 限制性片段,表明重构的复合体蛋白具有结合多肽的活性。Oleksiewicz 等^[9]将一段猪瘟病毒(CSFV)表位肽与猪的 MHC 分子即猪的白细胞抗原(swine leukocyte antigen, SLA) I 类分子的 SLA-I 重链基因及轻链基因 $\beta 2m$ 进行共价连接,并通过 pET-22b 进行表达。ELISA 检测表明,原核表达的 SLA-I-peptides- $\beta 2m$ 重组蛋白复合体在体外能够部分正确折叠。2006 年,本课题组也报道了利用体外构建具有开放抗原多肽结合槽的猪 SLA-I 复合体以结合和筛选口蹄疫病毒 9 肽的研究^[10]。最近, Kim 等^[11]报道了将 HLA-A2 重链基因、轻链 $\beta 2m$ 及一段包含西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)表位的多肽用柔性接头连接,免疫转基因小鼠后能够针对病原产生强烈的保护性的 CD8⁺T 细胞反应,攻毒后小鼠能够健康存活。

2 表位疫苗的载体

由于表位多肽只是一段氨基酸残基,免疫原性较差,且容易被降解,因此在实际使用过程中需要借助一定的载体才能发挥免疫作用。

2.1 脂质载体

脂质分子本身不具备免疫原性, 但可以作为载体连接在抗原肽的末端, 能帮助肽分子被抗原呈递细胞识别, 不仅使表位多肽在机体内能够稳定存在而不被降解, 而且可以增强免疫应答反应。因此, 脂质分子是一种较为理想的表位疫苗载体。

Zeng 等^[12]最近报道了将流感病毒的 T 细胞表位经脂质体 S-[2,3-二(棕榈酰基氧基)丙基]-半胱氨酸包裹, 接种实验动物后证实, 脂质体能够促进表位肽产生良好的免疫反应。另外, 其他病毒如抗艾滋病病毒的脂肽疫苗的研究已经取得了一定的进展, 并且在临床应用上收到了良好的效果^[13]。

免疫刺激复合物 (the immunostimulating complex, ISCOM) 是 20 世纪 80 年代发明的一种脂质体, 其主要成分是一种皂角素 (Quil A), 它可以包裹病原微生物的抗原蛋白或者多肽, 在体内缓慢释放并诱导机体产生免疫反应。目前 ISCOMs 应用较为广泛。最近, Solano-Parada 等^[14]将寄生在美洲狮哥斯达黎加亚种的血管圆口线虫的一段多肽表位与 ISCOM 混合应用接种小鼠, 结果免疫小鼠获得了 100% 的保护, 而比应用磷脂酰 B 簇维生素及胆固醇作为脂质的免疫组分别高出 40 和 20 个百分点。该实验充分证明 ISCOM 确实能够提高多肽表位的免疫效果。

2.2 蛋白载体

乙肝病毒的核心蛋白能够允许一定程度的缺失和插入, 并且能够将外源序列高密度地暴露在蛋白颗粒表面。英国 Acambis 公司研制的针对流感病毒所有 A 型株的表位疫苗 ACAM-FLU-A(TM), 以乙肝病毒的核心蛋白氨基端 163 个氨基酸作为载体来递送流感病毒离子通道蛋白 M2 的胞外结构域 M2e, 并经过临床试验证明该疫苗具有很好的耐受性和免疫原性^[15]。另外, Zhou 等^[16]最近报道了将来自于 IL-10 的一段多肽通过基因重组的方法插入到乙肝病毒核心抗原 (HBcAg) 中, 从而制成了一种 HBcAg 作为载体, 并与 IL-10 相关的疫苗, 该疫苗能够诱导动物机体产生高滴度的 IL-10 特异性的 IgG, 该疫苗可以用于治疗 IL-10 缺乏相关疾病。

热激活蛋白 HSP 也可作为表位疫苗的蛋白载体, 在肿瘤免疫中发挥着重要作用, 通过分子载体的作用将抗原肽呈递 APC 表面, 激活 CD8⁺T, 达到杀伤肿瘤细胞的目的。HSP70 根据相对分子质量的不同分为 4 类, 即 HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族和最小的 HSP 家族。现在认为, HSP90 家族和 HSP70 家族与外来抗原的摄入及参与 MHC-I

类分子的结合有关。HSP70 家族的成员还参与新生肽的折叠, 并协助表位肽与 TAP (transporter associated with antigen processing) 的结合。Ren 等^[17]将 HSP 与人乳头瘤病毒 HPB-16E7 的 CTL 表位多肽偶联, 并以腺病毒作为多肽 DNA 的载体, 形成的 DNA 疫苗能够很好地清除动物模型中的肿瘤细胞, 并可诱导 CTL 细胞的活化。

另外, 卵清蛋白 (OVA)^[18]、牛血清蛋白 (BSA)^[19]、钥孔血蓝蛋白 (KLH)^[20] 等也可作为表位疫苗的蛋白载体。

2.3 佐剂

为了加强多肽疫苗的免疫效果, 有时候使用佐剂与多肽疫苗一起进行免疫。目前最常用的是弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

弗氏佐剂是一种经典的免疫佐剂, 分为完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA)。Tigno-Aranjuez 等^[21]将两种 MHC I 类分子限制性的多肽经 CFA 乳化后接种 C57BL/6J 小鼠, 然后检查细胞因子分泌、增殖、体内的细胞毒性反应以及迟发型变态反应 (DTH)。结果表明 CFA 作为佐剂能够诱导 CD8⁺T 细胞产生明显的增殖和 DTH, 并能诱导产生 γ -干扰素、IL-2 和 IL-17。氢氧化铝可以吸附表位多肽, 也可作为一种载体用在表位疫苗的研制上。最近, Wang 等^[22]报道将 C 型肝炎病毒抗原多肽与氢氧化铝佐剂混合免疫 BALB/c 小鼠, 结果显示氢氧化铝佐剂能够诱导明显的抗体滴度产生, 抗体效价达到 1:51 200, 而且还能引起 CD19⁺CD38 产生, 及引起 IL-6 和 IL-10 分泌产生。最后得出结论: 氢氧化铝作为佐剂能够引起一种潜在的由 Th2 细胞介导的免疫反应, 同时表现为特异性的脾脏抗体分泌性细胞增加以及 CD19⁺CD27⁺ 细胞比率的增加。

3 表位疫苗的设计

在实际的应用中, 为增强表位疫苗的免疫活性, 还需要采用各种方式对表位疫苗进行优化设计。

3.1 抗原表位线性串联

抗原表位线性串联是指采用人工合成的方法将多个不同的抗原表位串联起来, 构建具有多种表位肽的复合多价表位疫苗, 该方法可以有效增强抗原表位多肽的免疫原性, 同时也能够避免载体的引入可能造成的不确定影响。吴绍强等^[23]报道利用分子生物学软件分析了 FMDV 结构蛋白 VP1~VP3 上可能的抗原表位, 并人工合成了 8 条表位多肽。通过采用 SAT II 型 FMDV 阳性血清进行 ELISA 反

应,检测其反应原性,然后通过采用与载体蛋白偶联的合成肽免疫小鼠,测定小鼠血清中抗体效价,检测合成肽的免疫原性。结果表明,合成的8条多肽均能与SAT II型FMDV阳性血清结合,其中的6条多肽免疫小鼠后能产生针对多肽的抗体。最新的研究报道,当表位串联时一般要串联30个以上的氨基酸才具有较好的免疫原性^[24]。

3.2 MAP空间构象结合模式

多价抗原肽(multiple antigen peptide, MAP)是将病原微生物蛋白表面的多种B细胞或T细胞表位的氨基酸连接于树枝状的多聚赖氨酸结构上,构建一种立体结构的多价表位疫苗,这种方式链接的表位多肽具有较好的方向性,但是赖氨酸骨架的化学合成成本较高。Mahajan等^[25]最近报道了恶性疟原虫MAP疫苗的设计策略。他们设计了恶性疟原虫三种MAP疫苗,这些疫苗的多肽表位分别来自于疟原虫的孢子阶段、肝组织和血液等生命周期中表达的蛋白。分别在C57BL/6、BALB/c和A/J系的小鼠,HLA-A2基因转导的C57BL/6小鼠和杂交品系(CD1)小鼠展开抗体和细胞免疫反应检测。结果显示所有三种MAP疫苗均能诱导明显的抗体和细胞免疫反应,但由于小鼠的MHC背景不同,免疫效果有所区别。其中,MAP-1可以阻断*Plasmodium alciparum* sporozoites在HepG2肝细胞的入侵(在HLA-A2 C57BL/6小鼠中最高,达到95.16%;在BALB/c小鼠中最低,达到11.21%),而MAP-2和MAP-3疫苗均能够不同程度减少疟原虫在血液阶段的繁殖。该研究为今后开展人类抗疟原虫MAP表位疫苗的研制提供了丰富的数据。

3.3 表位修饰

在表位串联时,可能会在连接处产生新的表位,从而影响原表位的免疫活性。娄加陶^[26]把结核杆菌抗原Rv0309、Rv0173的HLA-A~*0201限制性CD8⁺CTL表位与其他已知抗原表位优化组合,并引入PADRE及“木马肽”序列,采用furin肽酶识别基序RVKR作为接头,构建并重组表达、纯化“串珠式”表位肽疫苗,并在细胞水平上对其免疫原性进行分析。结果表明:重组表达的“串珠式”表位肽在细胞水平上能诱导出更强的CTL保护性应答反应。石统东等^[27]研究发现,设计HBV治疗性表位多肽疫苗时,在CTL表位的基础上引入“Th+B”细胞表位以及三个丙氨酸的间隔序列,可以增强CTL表位肽的免疫原性。虽然MHC分子与表位的结合是特异性的,但这种特异性不是指只能与单一

的肽段结合,而是指可以识别一系列具有某些共同特性的肽段,其中包括一些经过修饰的非天然肽段,即修饰的肽配体(altered peptide ligand, APL)。通过对肽分子进行修饰,在特定的位置替换成与MHC有较高亲和力的氨基酸,有利于表位肽与MHC分子的结合。唐艳^[28]将黑色素瘤相关抗原MART1/MelanA₍₂₇₋₃₅₎(AAGIGILTV)表位的P₁位由L替换为A,提高了表位的免疫原性。

4 表位疫苗的应用现状

与传统疫苗相比,表位疫苗有着明显的优势。目前,表位疫苗在肿瘤以及病毒性疾病的预防方面已经有了较广泛的应用,同时在细菌、寄生虫等引起的疾病的防治中也取得了一定的进展。

4.1 肿瘤多肽疫苗

肿瘤多肽表位疫苗是来自肿瘤特异性抗原、病毒相关抗原、癌基因或癌基因突变蛋白的多肽组成的疫苗。Thomann等^[29]最近将ErbB2 p63-71细胞毒性T细胞及HA307-31辅助性T细胞表位及TLR蛋白用脂质体包裹后免疫小鼠,结果发现在表达ErbB2蛋白的肿瘤细胞上产生了明显的抗肿瘤效果。最近Mine等^[30]报道,关于治疗癌症和黑色素瘤的多肽表位疫苗在日本出现,目前已进入临床应用阶段。但肿瘤表位疫苗目前由于宿主的免疫逃避机制等,其临床应用效果仍然不是特别理想。

4.2 病毒表位疫苗

20世纪80年代,Strohmaier等^[31]发现口蹄疫病毒含有免疫学位点的氨基酸序列,即病毒表位,从而开始了病毒表位疫苗的研究。目前,病毒表位的研究已经在国内外广泛展开,并且取得了很大的进展。最近,Zhou等^[32]报道了典型猪瘟病毒表位疫苗的研究。该研究小组将猪瘟病毒E2糖蛋白的两个线性B细胞表位在大肠杆菌中表达,制成多表位疫苗。然后接种15头6周龄的SPF小猪,所有接种的小猪都能表现出抗体再生反应,抗体滴度达到1:16至1:256。经10⁶个TCID₅₀剂量的CSFV强毒攻毒,疫苗免疫组小猪全部健康存活,并且未表现出任何典型猪瘟症状,而对照组的小猪发病严重。今后,猪瘟病毒的免疫防疫有可能从传统疫苗过渡到表位疫苗阶段。另外,病毒表位疫苗在HIV、HCV等的研究也取得了进展,并逐渐向临床应用阶段发展。

4.3 细菌表位疫苗

表位疫苗在抗菌方面的应用也较为广泛。周维

英等^[33]构建了幽门螺旋杆菌黏附素和尿素酶 B 亚单位双亚基多表位疫苗, 免疫检测有较好的免疫原性。另外, Chen 等^[34]构建了铜绿假单胞菌多表位 MyD88 基因疫苗, 成功地刺激小鼠产生高度特异性的抗体, 气管接种该疫苗的小鼠肺匀浆细菌计数明显低于对照组。

4.4 寄生虫表位疫苗

抗寄生虫的表位疫苗相对较少, 但关于寄生虫表位疫苗的研究已经展开。最近, Curtidor 等^[35]通过表位预测及化学合成恶性疟原虫的高结合性多肽表位从而制成初步的表位疫苗, 该疫苗接种夜猴后能够引起高的、持久的抗体滴度。另外, 抗日本血吸虫病表位疫苗的研究也正在开展。

5 面临的问题和展望

表位疫苗的研究尽管近年来发展迅速, 但其应用仍面临一些亟待解决的问题。(1) 表位多肽分子较小, 免疫原性较弱, 临床免疫效果与常规疫苗仍然有一定的差距; (2) 目前表位疫苗的研究多集中于线性表位, 而缺乏对构象表位的研究和筛选; (3) 佐剂的使用一定程度上会增加表位疫苗的副作用; (4) 多肽合成以及纯化技术的局限性也增加了表位疫苗的使用风险; (5) 表位研究的不均衡也是目前表位疫苗研究中存在的一个主要问题, 尤其对于动物病毒。譬如口蹄疫病毒, 此前过多的表位研究主要集中于 B 细胞表位和 Th 细胞表位, 而缺乏对 CTL 细胞表位的研究, 导致表位疫苗中表位的组成缺乏必要的 CTL 表位。

针对上述问题, 表位疫苗在今后的研究中还需要开展多方面的工作, 包括要探索新的更加有效的筛选表位的方法, 同时开展表位组合免疫及更加安全有效的分子佐剂的研究, 另外要更加注重构象表位研究及 CTL 表位的研究。

尽管存在一些问题, 但表位疫苗作为一种新型疫苗, 其安全、无毒、稳定等优势非常明显, 可以预见表位疫苗在今后的应用前景将越来越广阔。

[参 考 文 献]

- [1] Zhou WY, Shi Y, Wu C, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine*, 2009, 27(36): 5013-9
- [2] 方钟, 罗文新, 夏宁邵, 等. 中国生物工程杂志. 表位疫苗研究进展, 2007, 27(11): 86-91
- [3] 罗以勤, 王梁华, 焦炳华, 等. 小分子活性肽筛选方法. 生命的化学, 2004, 24(1): 16-18
- [4] Axelsson-Robertson R, Ahmed RK, Weichold FF, et al. Human leukocyte antigens A*3001 and A*3002 show distinct peptide-binding patterns of the *Mycobacterium tuberculosis* protein TB10.4: consequences for immune recognition. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(1): 125-34
- [5] Gazarian K, Gazarian T, Betancourt JI, et al. Immunogenic peptides from phage display libraries with potential of protecting mice against the *Pseudorabies* virus. *Vet Microbiol*, 2011, 154(1-2): 29-36
- [6] Karosiene E, Lundegaard C, Lund O, et al. NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics*, 2011[Epub ahead of print]
- [7] El-Manzalawy Y, Honavar V. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. *Immunome Res*, 2010, 6 Suppl 2: S2
- [8] Godeau F, Luescher IF, Ojcius DM, et al. Purification and ligand binding of a soluble class I major histocompatibility complex molecule consisting of the first three domains of H-2Kd fused to beta 2-microglobulin expressed in the baculovirus-insect cell system. *J Biol Chem*, 1992, 267(34): 24223-9
- [9] Oleksiewicz MB, Kristensen B, Ladekjaer-Mikkelsen AS, et al. Development of a rapid *in vitro* protein refolding assay which discriminates between peptide-bound and peptide-free forms of recombinant porcine major histocompatibility class I complex (SLA-I). *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 86(1-2): 55-77
- [10] Mao D, Kai G, Gaofu Q, et al. Intramuscular immunization with a DNA vaccine encoding a 26-amino acid CETP epitope displayed by HBc protein and containing CpG DNA inhibits atherosclerosis in a rabbit model of atherosclerosis. *Vaccine*, 2006, 24(23): 4942-50
- [11] Kim S, Li L, McMurtrey CP, et al. Single-chain HLA-A2 MHC trimers that incorporate an immunodominant peptide elicit protective T cell immunity against lethal West Nile virus infection. *J Immunol*, 2010, 184(8): 4423-30
- [12] Zeng W, Horrocks KJ, Robevska G, et al. A modular approach to assembly of totally synthetic self-adjuvanting lipopeptide-based vaccines allows conformational epitope building. *J Biol Chem*, 2011, 286(15):12944-51
- [13] Cobb A, Roberts LK, Palucka AK, et al. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine. *J Immunol Methods*, 2011, 365(1-2): 27-37
- [14] Solano-Parada J, Gonzalez-Gonzalez G, Torro LM, et al. Effectiveness of intranasal vaccination against *Angiostrogylus costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2 A synthetic peptide and recombinant antigens. *Vaccine*, 2010, 28(32): 5185-96
- [15] Schotsaert M, De Filette M, Fiers W, et al. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(4): 499-508
- [16] Zhou G, Ma Y, Jia P, et al. Enhancement of IL-10 bioactivity using an IL-10 peptide-based vaccine exacerbates *Leishmania major* infection and improves airway inflamma-

- tion in mice. *Vaccine*, 2010, 28(7):1838-46
- [17] Ren F, Xu Y, Mao L, et al. Heat shock protein 110 improves the antitumor effects of the cytotoxic T lymphocyte epitope E7(49-57) in mice. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2): 134-41
- [18] 肖志军, 张改平, 杨汉春, 等. 传染性法氏囊病毒VP2蛋白B细胞抗原表位免疫小鼠试验. *华北农学报*, 2010, 25(2): 233-5
- [19] 宋幸辉, 王睿, 王选年, 等. 染性法氏囊病毒VP2蛋白抗原表位多肽P22的免疫原性及生物学功能鉴定. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(5): 692-97
- [20] 朱彦彩, 王选年, 银梅, 等. His6免疫原的制备及免疫小鼠抗体效价检测. *河南农业科学*, 2007, 12: 116-8
- [21] Tigno-Aranjuez JT, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Dissociated induction of cytotoxicity and DTH by CFA and CpG. *J Immunother*, 2009, 32(4): 389-98
- [22] Wang S, Han Q, Zhang G, et al. CpG oligodeoxynucleotide-adjuvanted fusion peptide derived from HBcAg epitope and HIV-Tat may elicit favorable immune response in PBMCs from patients with chronic HBV infection in the immunotolerant phase. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 406-11
- [23] 吴绍强, 李雅静, 王彩霞. 南非II型口蹄疫病毒抗原表位的筛选及抗原性分析. *中国兽医学报*, 2010, 30(12): 1638-41
- [24] 石晓妮, 窦永喜, 才学鹏. 表位疫苗的研究进展. *中国兽医科学*, 2011, 41(4): 422-6
- [25] Mahajan B, Berzofsky JA, Boykins RA, et al. Multiple antigen peptide vaccines against *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*, 2010, 78(11): 4613-24
- [26] 娄加陶. 结核杆菌抗原CD8⁺T细胞多表位“串珠式”肽疫苗研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2007
- [27] 石统东, 吴玉章, 周伟, 等. 多表位组合肽诱导HLA-A2人PBMC产生抗原特异性CD8⁺T细胞应答的研究. *第三军医大学学报*, 2003, 25(12): 1045-8
- [28] 唐艳. TRP-2_(180-188)CTL表位之APL的设计和评价[D]. 重庆: 第三军医大学, 2006
- [29] Thomann JS, Heurtault B, Weidner S, et al. Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials*, 2011, 32(20): 4574-83
- [30] Mine T, Terazaki Y, Itoh K. Current status and prospects of cancer vaccine therapy. *Nihon Rinsho*, 2011, 69(9): 1651-6
- [31] Strohmaier K, Franze R, Adam KH. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol*, 1982, 59(Pt 2): 295-306
- [32] Zhou B, Liu K, Jiang Y, et al. Multiple linear B-cell epitopes of classical swine fever virus glycoprotein E2 expressed in *E. coli* as multiple epitope vaccine induces a protective immune response. *Virology*, 2011, 8: 378
- [33] 周维英, 吴超, 石云, 等. 幽门螺旋杆菌双亚单位表位疫苗的构建及免疫原性研究. *中国人兽共患病研究*, 2008, 24(1): 33-8
- [34] 陈建国, 苏兆亮, 柳迎昭, 等. MyD88-铜绿假单胞菌表位核酸疫苗的构建及其真核表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(3): 193-5
- [35] Curtidor H, Vanegas M, Alba MP, et al. Functional, immunological and three-dimensional analysis of chemically synthesised sporozoite peptides as components of a fully-effective antimalarial vaccine. *Curr Med Chem*, 2011, 18(29): 4470-502