

HPV16 E6、E7 多表位 DNA 疫苗的构建及免疫效果评估

崔湘杰, 陶玉芬, 朱兰芳, 姚宇峰, 史 荔

(中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

[摘要] **目的** 构建和评价 HPV16 E6、E7 多表位 DNA 疫苗诱导的特异性 CTL 细胞应答及其对肿瘤生长的干预作用, 从而揭示其作为候选 HPV 治疗性疫苗的潜能。**方法** 首先通过 IEDB 网站中的 MHC I Processing Predictions 和 MHC I Binding Predictions 方法, 分别预测人类 HLA-A*02:01、HLA-A*11:01、HLA-A*24:02 和 C57BL/6 小鼠 H-2b 的限制性 CTL 表位, 然后根据评分以及 ELISPOT 实验筛选出二者共同呈递的 CTL 表位, 并将其构建成多表位 DNA 疫苗(pVAX1-10P)。从预防性和治疗性两个方面研究 pVAX1-10P 对小鼠移植 TC-1 异位癌的免疫干预作用, 流式细胞术检测特异性 CTL 应答。**结果** 获得 10 条可被人与鼠 MHC 分子共呈递的 CTL 表位, ELISPOT 结果表明这 10 条 CTL 表位均能诱导小鼠淋巴细胞产生特异性免疫应答; 由此构建的多表位 DNA 疫苗 pVAX1-10P 无论在预防性实验还是治疗性实验中, 均能诱导特异性的细胞免疫并抑制肿瘤的生长。**结论** 构建的 HPV16 E6、E7 多表位 DNA 疫苗 pVAX1-10P 能够诱导特异性 CTL 应答, 显著抑制肿瘤生长, 有望作为候选 HPV 治疗性 DNA 疫苗。

[关键词] 宫颈癌; 人乳头瘤病毒 16; E6 蛋白; E7 蛋白; 多表位 DNA 疫苗

[中图分类号] R737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)05-0016-07

Evaluations of Immunogenicity and Efficacy of A Novel HPV16 E6 and E7 Multi-epitope DNA Vaccine

CUI Xiangjie, TAO Yufen, ZHU Lanfang, YAO Yufeng, SHI Li

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To construct and evaluate the specific CTL cell response induced by HPV16 E6 and E7 multi epitope DNA vaccines and their intervention effects on tumor growth so as to reveal their potential as candidate HPV therapeutic vaccines. **Methods** The CTL epitopes of human HLA-A*02:01, HLA-A*11:01, HLA-A*24:02 restriction and C57BL/6 mouse H-2b restriction were predicted by the MHC-I processing and MHC-I binding methods in the IEDB website, and then screened for co-presentation of both based on scoring as well as ELISPOT experiment. The predicted CTL epitopes obtained were constructed into a multi-epitope DNA vaccine (pVAX1-10P), and the immunological interventions were performed in the mice transplanted with TC-1 tumour cells from prophylactic and therapeutic strategies respectively, and the ability of pVAX1-10P to induce specific CTL responses was assessed by flow cytometry. **Results** Prediction and screening yielded 10 CTL antigenic epitopes co-presented by human and murine MHC molecules. ELISPOT results showed that each peptide in the experimental group induced the specific immune responses in mouse lymphocytes. The constructed multi-epitope DNA vaccine, pVAX1-10P, induced the specific cellular immunity and significantly inhibited the tumour growth

[收稿日期] 2024-01-16

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金资助项目(2021-I2M-1-004); 云南省重大科技专项基金资助项目(202002AA100009)

[作者简介] 崔湘杰(1998 ~), 女, 辽宁铁岭人, 在读硕士研究生, 主要从事感染性疾病及肿瘤的免疫遗传学研究

[通信作者] 史荔, E-mail: shili.imb@gmail.com

in both prophylactic and therapeutic experiments. **Conclusion** The constructed HPV16 E6 and E7 multi-epitope DNA vaccine, pVAX1-10P can induce specific CTL response and inhibit the tumour growth, which is expected as a promising candidate of HPV therapeutic DNA vaccine.

[**Key words**] Cervical cancer; Human papillomavirus 16; E6 protein; E7 protein; Multi-epitope DNA vaccine

高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染引起的宫颈癌是女性中第四大常见的恶性肿瘤之一^[1]。其中, 高危型 HPV16 与 50% 以上的宫颈癌的发生密切相关^[2-3], 而我国由 HPV16 型引起的子宫颈癌比例高达 78.5%^[4]。现有的 HPV 预防性疫苗能够有效预防由 HPV 高危型别感染引起的子宫颈癌^[5], 但其靶抗原是 HPV L1 衣壳蛋白。L1 在受感染的基底层细胞中并不表达, 因此对已经发生 HPV 感染的妇女, 预防性疫苗无法起到治疗和清除感染的作用^[6]。

HPV 病毒蛋白 E6 和 E7, 持续高表达于被 HPV 感染的上皮细胞中, 导致宫颈上皮内瘤样病变, 直至子宫颈癌的发生^[7]。因此, E6、E7 被认为是癌蛋白基因, 成为控制或清除感染以及防止癌变的理想靶标^[8]。在控制 HPV 感染导致的宫颈病变中, 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)介导的细胞免疫应答发挥着重要作用, 能直接杀死感染细胞和转化细胞, 因此在疫苗设计时激活有效的 CTL 应答至关重要^[9-10]。

病毒感染后, 机体识别外源性抗原的部分区域并产生细胞免疫应答, 这部分区域被称为 T 细胞表位, 由 1 组氨基酸残基组成^[11-12]。T 细胞表位需与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)形成“抗原肽-MHC”分子复合物, 再通过抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)呈递给 T 细胞, 从而激活 CTL 应答^[13]。然而, 在对特定病毒的有效应答中起着核心作用的 MHC 表现为限制性抗原呈递特征, 即特定 MHC 分子只识别特定的 T 细胞表位^[12]。其中人类的 MHC 又称为人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA), 小鼠的 MHC 称为 H-2^[14]。MHC 限制性 T 细胞表位疫苗能够迅速诱导较强的细胞免疫应答, 但其免疫原性弱。而将多个表位串联所构建的多表位疫苗能够较好地克服这一缺点, 而成为当前治疗性疫苗研发的热点之一。目前, 已报道了多种多表位 DNA 疫苗, 在黑色素瘤^[15]、利什曼原虫^[16]的小鼠模型中显示出有效的细胞免疫应答并具有良好的安全性。

因此, 本研究以 HPV16 的 E6、E7 为靶抗原, 通过生物信息学方法筛选出能被人与鼠 MHC 分

子共呈递的 CTL 表位, 构建成新型的多表位 DNA 疫苗 pVAX1-10P, 通过小鼠模型以确定该疫苗激活体内细胞免疫应答的特点和抑制肿瘤生长的效果, 为研发安全性好、免疫原性高的 HPV 治疗性疫苗提供思路和参考。

1 材料与方法

1.1 小鼠与细胞株

本研究所用的雌性 6~8 周 C57BL/6 小鼠均购于中国医学科学院医学生物学研究所啮齿动物实验动物部, 并在 SPF 级的条件下饲养。动物程序经中国医学科学院医学生物学研究所机构动物伦理委员会审定(DWSP202306008)。TC-1 细胞系来源于 C57BL/6 小鼠持续稳定表达 HPV16 E6、E7 蛋白的原始肺上皮细胞系, 由中国医学科学院医学生物学研究所马雁冰教授惠赠。

1.2 蛋白序列的获取和 CTL 表位的预测

在 NCBI 网站上(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取 HPV16(NC_001526.4)E6(Gene ID: 1489078)、E7(Gene ID: 1489079)的参考蛋白序列。在 IEDB 网站上运用 MHC I Processing Predictions(<http://tools.iedb.org/processing/>)和 MHC I Binding Predictions(<http://tools.iedb.org/mhci/>) 2 种方法, 预测人 HLA-A*02:01、HLA-A*11:01 和 HLA-A*24:02 限制性的候选 CTL 表位, 将预测所得肽段长度设定在 8~14 个氨基酸, 再分别以 Total Score ≥ -1.5 和 Rank ≤ 2 为评分标准, 找到符合 2 种条件的重叠表位。鼠 MHC-I 限制性(H-2K^b 和 H-2D^b) CTL 表位的预测和筛选同上面描述。人和鼠 MHC-I 分子共同呈递的 CTL 表位, 即为候选 CTL 表位。其中 HLA-A*02:01、HLA-A*11:01、HLA-A*24:02 3 个 HLA-A 等位基因在中国人群中具有较高人群覆盖率, 总占比约为 47.5%^[17-19]。

1.3 多表位 DNA 疫苗的设计与构建

将筛选到的人与鼠共呈递的 10 个 CTL 表位, 用丙氨酸-丙氨酸-酪氨酸(alanine-alanine-tyrosine, AAY)进行线性连接, 将其亚克隆到 pVAX1 质粒的 Kpn I 和 EcoR I 位点上构成多表位 DNA 疫苗

(pVAX1-10P)。

1.4 疫苗的免疫程序

在肿瘤的预防性研究中，将小鼠随机分为 3 组，每组 5 只，于 0、2 和 4 周，右侧腿部皮内分别注射 75 μg pVAX1-10P、阳性对照 pVAX1-E6E7Com（采用 E6 和 E7 全蛋白序列亚克隆到 pVAX1 质粒获得）、阴性对照 pVAX1，在第 7 周，接种 5×10^4 个 TC-1 肿瘤细胞。每周测量 2~3 次肿瘤大小，当肿瘤体积接近伦理值时，即肿瘤后

的第 27 天时，处死小鼠并进行流式细胞术检测。小鼠的免疫程序见图 1A。

在疫苗的治疗性评价中，将小鼠随机分为 3 组，每组 5 只，于右侧背部皮下处接种 5×10^4 TC-1 细胞后第 3、10、17 天，每只小鼠右侧腿部皮内分别注射 75 μg pVAX1-10P、pVAX1-E6E7Com 或 pVAX1，第 29 天时杀鼠进行流式细胞术实验检测小鼠体内 CTL 免疫应答情况，每周测量 2~3 次肿瘤大小。小鼠的免疫程序见图 1B。

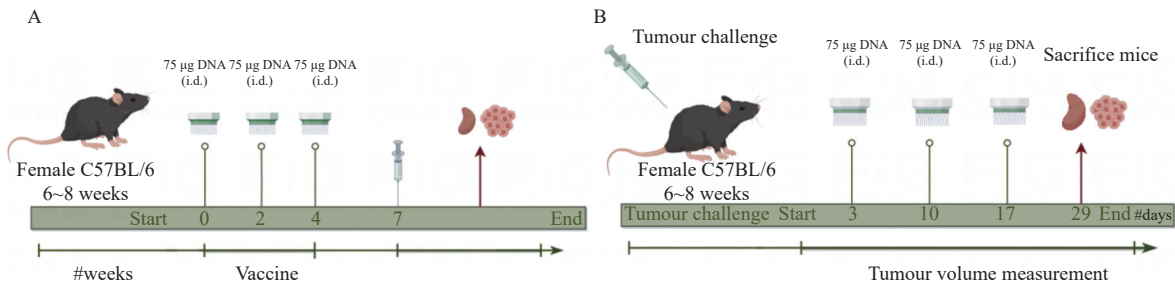


图 1 小鼠免疫程序

Fig. 1 Immunisation program in mice

A: 疫苗的预防性抗肿瘤评价中的小鼠免疫程序; B: 疫苗的治疗性抗肿瘤评价中的小鼠免疫程序。

1.5 ELISPOT 检测单个 CTL 表位刺激 T 细胞分泌 IFN- γ 的水平

无菌条件下将小鼠脾淋巴细胞重悬于广谱型 ELISPOT 专用无血清培养基，以每孔 $3 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ 转移到包被好的 ELISPOT 96 孔板中，一式 3 份加入对应刺激物培养，然后将 ELISPOT 板放置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ， $5\% \text{ CO}_2$ 细胞培养箱中培养 40 h。实验组中为分别加入预测得到的 10 个 CTL 表位作为刺激物，有细胞无刺激剂作为阴性对照，刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 作为阳性对照。每种刺激物的终浓度为 10 mg/L。孵育结束后，根据小鼠 IFN- γ 的 ELISPOT 试剂盒的说明来显示斑点。使用酶联斑点图像自动分析仪计算斑点数量。

1.6 流式细胞术分析 CTL 应答水平

无菌分离小鼠脾脏淋巴细胞，将 1×10^7 的脾淋巴细胞在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ， $5\% \text{ CO}_2$ 中用 10P 刺激 4 h (10 mg/L)，然后每孔加入阻止蛋白质运输的特定抑制剂 Brefeldin A，放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ， $5\% \text{ CO}_2$ 的细胞培养箱中继续培养 9~12 h，用细胞染色缓冲液洗涤细胞后，在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光的情况下用抗小鼠 CD8a-Brilliant Violet 510TM 和 FITC anti-mouse CD4 抗体染色 15~20 min。之后将细胞用细胞固定缓冲液固定和透化，然后在室温避光的条件下，用抗小鼠 IFN- γ -PE 抗体染色 20 min。将细胞重悬于细胞染色缓冲液中上机检测获取数据。

1.7 统计学处理

采用 Graph pad Prism 9.4.0 软件进行统计学分析，其中 ELISPOT 和流式数据采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CTL 表位的预测和筛选结果

以 HPV16 E6、E7 为靶抗原，基于人 HLA-A*02:01、HLA-A*11:01、HLA-A*24:02 和鼠 H-2b 限制性，共找到 10 个可以被人和鼠 MHC 分子共呈递的 CTL 表位，包括 6 个 E6 和 4 个 E7 表位。其中 HPV16E6⁸¹SEYRHYCYSL⁹⁰ 表位，人与鼠相差一个碱基，并非完全一致，但考虑到序列的兼容性，因此将 E6⁸¹SEYRHYCYSL⁹⁰ 表位纳入到最终的结果，见表 1。

免疫原性研究结果表明，预测得到的这 10 个 CTL 表位均能诱导小鼠产生特异性细胞免疫，见图 2。其中 E7-⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷ 是经过大多数文献验证证实过的有效 CTL 表位，为本实验的阳性参考肽。

2.2 多表位 DNA 疫苗的构建

将经过预测、筛选得到的 10 个人与鼠 MHC-I 分子共呈递 CTL 表位通过 AAY 连接，形成 10P 多肽序列，同时将 HPV16 E6 和 E7 蛋白序列也通

表 1 预测得到的人鼠共呈递的 CTL 表位

Tab. 1 Predicted human and mouse co-presented CTL epitopes

蛋白	肽名称	起始位点	结束位点	序列	总分(鼠)	总分(人)	等级排名(鼠)	等级排名(人)
E6	E6p1	38	45	VYCKQQLL	-0.81	-1.39	1.4	0.45
	E6p2	49	57	VYDFAFRDL	-1.39	-1.23	1.3	0.28
	E6p3	75	83	KFYKISEY	-0.72	-0.74或-0.75	1.5	1.6
	E6p4	124	132	RHLDKKQRF	-1.3	-1.06	1.4	0.46
	E6p5	81	90	SEYRHYCYSL	-0.29		1.7	
		82	90	EYRHYCYSL		-0.68		0.57
E6p6	86	95	YCYSLYGTTL	-0.52	-0.37	1.6	0.41	
E7	E7p1	49	57	RAHYNIVTF	0.83或-0.59	-0.3	0.01或0.6	0.54
	E7p2	7	15	TLHEYMLDL	-1.08	-0.28	1.3	0.21
	E7p3	50	57	AHYNIVTF	-0.04或-1.26	-1.12	0.23或1.2	1.2
	E7p4	77	87	RTLEDLLMGTL	-1.37	-1.36	1.3	1.2

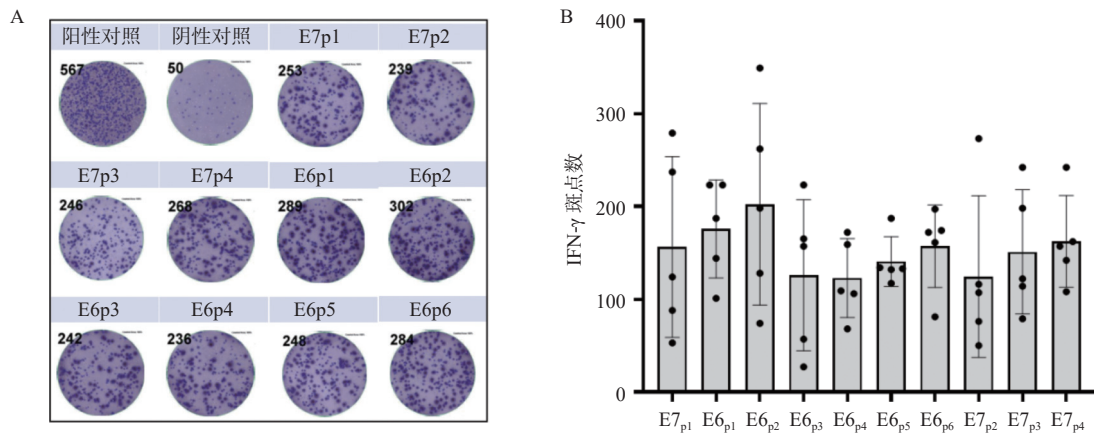


图 2 ELISPOT 检测结果

Fig. 2 ELISPOT results

A: 实验组及对照组代表性酶联免疫斑点法图; B: ELISPOT 检测 IFN- γ 斑点数统计图, 条形图以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

过 AAY 连接, 形成 E6E7Com 序列, 然后分别将 10P 和 E6E7Com 氨基酸序列亚克隆到 pVAX1, 构成 pVAX1-10P 和 pVAX1-E6E7Com 质粒, 见图 3。

2.3 多表位疫苗的预防性效果评估

首先用 pVAX1-10P 免疫 C57BL/6 小鼠以建立抗肿瘤免疫, 在第 7 周时用 TC-1 细胞挑战小鼠, 小鼠的免疫程序, 见图 1A。相比于 pVAX1 组, pVAX1-10P 免疫的小鼠的肿瘤生长速度更缓慢, 并且用 pVAX1-10P 免疫的小鼠肿瘤体积更小, 见图 4A。

流式细胞术检测特异性分泌 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞结果显示: 相比于 pVAX1 组, pVAX1-10P 组的特异性 CD8⁺T IFN- γ 的比例更高 ($P < 0.05$); 并且 pVAX1-E6E7Com 组特异性 CD8⁺T IFN- γ 比例也高于 pVAX1 组 ($P < 0.05$), 见图 4B。

以上结果说明, pVAX1-10P 多表位 DNA 疫

苗皮内免疫小鼠后, 可在小鼠体内诱导有效的细胞免疫应答, 具有抗肿瘤保护性作用。

2.4 表位疫苗的治疗性效果评估

为了评估疫苗诱导的治疗性抗肿瘤反应, 小鼠攻瘤后的第 3 天进行第 1 针免疫, 每隔 1 周免疫 1 次, 共免疫 3 针, 小鼠的免疫程序见图 1B。与 pVAX1 空载组相比, pVAX1-10P 和 pVAX1-E6E7Com 组只有 3 只小鼠荷瘤, 且肿瘤体积小, 无瘤小鼠比例可达到 40%, 而 pVAX1 组全部荷瘤, 见图 5A。

流式细胞术检测特异性分泌 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞结果显示: pVAX1-10P 组的小鼠产生的特异性 CD8⁺T IFN- γ 比例高于 pVAX1 组 ($P < 0.05$); 并且 pVAX1-10P 组的特异性 CD8⁺T IFN- γ 比例高于 pVAX1-E6E7Com 组 ($P < 0.05$); 而阳性对照 pVAX1-E6E7Com 组特异性 CD8⁺T IFN- γ 比例与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P >$

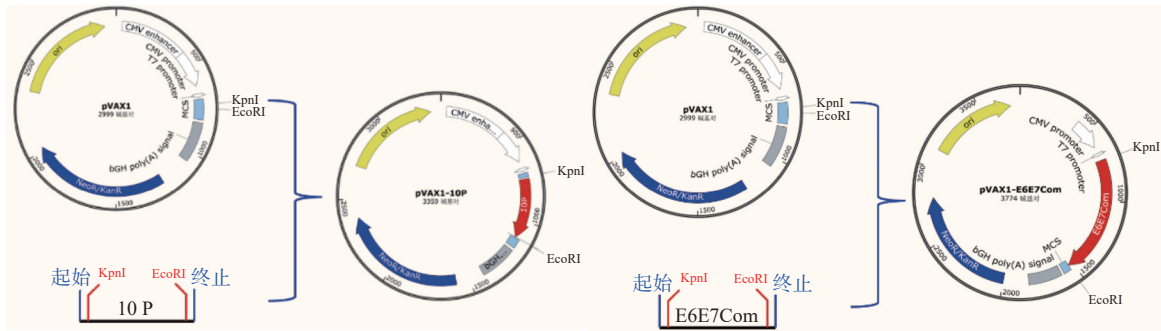


图 3 质粒构建图

Fig. 3 Plasmid construction diagram



图 4 多表位 DNA 疫苗诱导的预防性抗肿瘤免疫

Fig. 4 Prophylactic anti-tumor immunity induced by multi-epitope vaccine

A: 肿瘤解剖图; B: 流式细胞术检测的 CD8+T IFN-γ 占比; 与对照组比较, *P < 0.05。

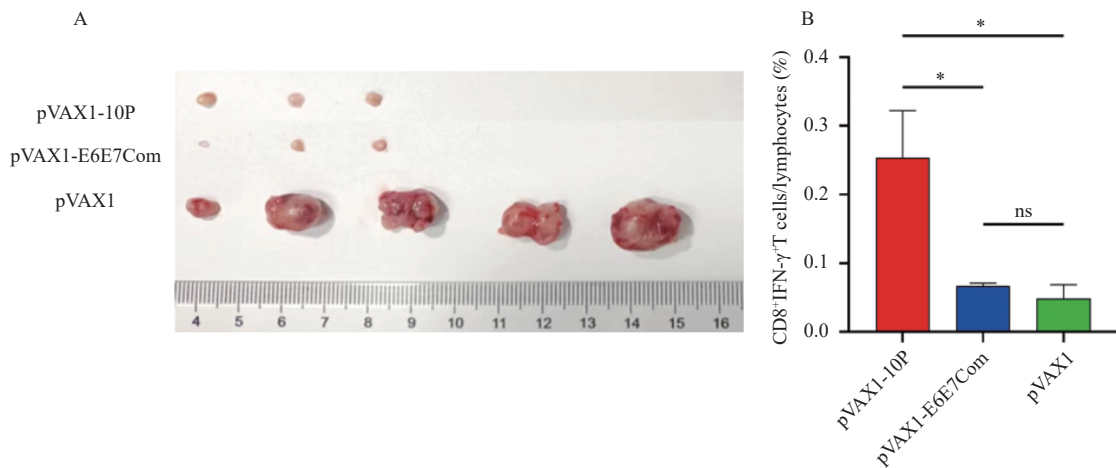


图 5 多表位 DNA 疫苗诱导的治疗性抗肿瘤免疫

Fig. 5 Therapeutic anti-tumor immunity induced by multi-epitope vaccine

A: 肿瘤解剖图; B: 流式细胞术检测的 CD8+T IFN-γ 占比; 与对照组比较, *P < 0.05, nsP > 0.05。

0.05), 见图 5B。

以上结果说明 pVAX1-10P 多表位 DNA 疫苗能够诱导特异性 CTL 应答, 抑制或消除肿瘤生长。

3 讨论

目前已经上市的 HPV 预防性疫苗主要通过诱

导机体体液免疫产生中和抗体而发挥预防 HPV 感染的作用, 但不能清除已存在的 HPV 感染, 相关的浸润性病变及肿瘤的清除仍然主要依赖于宿主有效的细胞免疫应答^[2, 20]。因此, 仍迫切需要研发新型 HPV 治疗性疫苗。

近年来, 生物信息学方法不仅可对复杂的免疫学数据进行不同方面的分析, 还能创造新的可检验假设, 在更短的时间内预测出潜在的疫苗靶点^[21]。本研究通过生物信息学方法预测 HPV16E6、E7 的 CTL 表位, 最终得到的 10 个不仅与 MHC 分子具有高亲和性, 还能在细胞内被高效地处理、加工和呈递的 CTL 表位。同时, 这些表位不仅具有人 HLA (HLA-A*02:01、HLA-A*11:01、HLA-A*24:02) 限制性, 同时具有鼠 MHC (H-2K^b 和 H-2D^b) 限制性, 具有人鼠共呈递的特性, 可使用 C57BL/6 小鼠进行评价。

ELISPOT 试验结果表明, 与经过大多数文献证实过的有效 CTL 表位 E7-⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷ 相比^[22-25], 笔者预测得到的 10 个 CTL 表位具有良好的免疫原性, 均可以诱导小鼠产生强大的抗原特异性细胞应答。研究表明, 相较于单个抗原肽构成的疫苗, 多表位疫苗可以激活识别不同靶标的 T 细胞, 能最大限度地减少抗原丢失引起的肿瘤免疫逃逸, 提高疫苗的免疫原性^[26-27]。AAY 被广泛应用于表位连接, 是蛋白酶体的切割位点或与抗原加工相关的转运蛋白结合的底物, 可以防止自折叠来提高结构的稳定性, 促进靶抗原表位之间的正确切割, 消除新抗原的形成^[28-29]。因此, 笔者将这 10 个 CTL 表位通过 AAY 连接构建成 HPV 多表位 DNA 疫苗 (pVAX1-10P)。动物实验研究表明, pVAX1-10P 能够诱导有效的细胞免疫应答, 不仅能够阻止小鼠体内肿瘤的生成, 还能够抑制肿瘤的生长。本研究结果与 Wang^[30], Gul 等^[31] 研究结果一致, 提示 CTL 多表位能够促进抗原提呈细胞对抗原高效的处理、加工和呈递, 进而更好的激发体内的 CTL 免疫应答^[32]。

综上所述, pVAX1-10P 多表位 DNA 疫苗均能够诱导相应的 CTL 应答, 阻止肿瘤的发生并能抑制肿瘤的生长, 有望作为 HPV16 相关肿瘤的候选治疗性疫苗。

[参考文献]

[1] Alay I, Kaya C, Karaca I, et al. The effect of being diagnosed with human papillomavirus infection on women's

sexual lives[J]. *J Med Virol*, 2020, 92(8): 1290-1297.

- [2] Yu L L, Majerciak V, Zheng Z M. HPV16 and HPV18 genome structure, expression, and post-transcriptional regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4943.
- [3] Williamson A L. Recent developments in human papillomavirus (HPV) vaccinology[J]. *Viruses*, 2023, 15(7): 1440.
- [4] Chen W, Sun H, Molijn A, et al. The variable characteristics of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix in China[J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2018, 22(4): 355-361.
- [5] Lei J, Ploner A, Elfstrom K M, et al. HPV vaccination and the risk of invasive cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(14): 1340-1348.
- [6] Messa L, Loregian A. HPV-induced cancers: Preclinical therapeutic advancements[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2022, 31(1): 79-93.
- [7] Yan F, Cowell L, Tomkies A, et al. Therapeutic vaccination for HPV-mediated cancers[J]. *Current Otorhinolaryngology Reports*, 2023, 11(1): 44-61.
- [8] Ortiz-Pedraza Y, Munoz-Bello J O, Ramos-Chavez L A, et al. HPV16 E6 and E7 oncoproteins stimulate the glutamine pathway maintaining cell proliferation in a SNAT1-dependent fashion[J]. *Viruses*, 2023, 15(2): 324.
- [9] Welters M J, Kenter G G, Piersma S J, et al. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(1): 178-187.
- [10] Yan F, Cowell L G, Tomkies A, et al. Therapeutic vaccination for HPV-mediated cancers[J]. *Curr Otorhinolaryngol Rep*, 2023, 11(1): 44-61.
- [11] Song X, Xu L, Yan R, et al. Construction of eimeria tenella multi-epitope DNA vaccines and their protective efficacies against experimental infection[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 166(3-4): 79-87.
- [12] Radwan J, Babik W, Kaufman J, et al. Advances in the evolutionary understanding of MHC polymorphism[J]. *Trends Genet*, 2020, 36(4): 298-311.
- [13] Chandran S S, Klebanoff C A. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance[J]. *Immunol Rev*, 2019, 290(1): 127-147.

- [14] Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes[J]. *Immunogenetics*, 2005, 56(10): 683–695.
- [15] Cho. H I, Celis E. Design of immunogenic and effective multi-epitope DNA vaccines for melanoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(3): 343–351.
- [16] Rashidi S, Faraji S N, Mamaghani AJ, et al. Bioinformatics analysis for the purpose of designing a novel multi-epitope DNA vaccine against *Leishmania major*[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 18119.
- [17] Robinson J, Barker D J, Georgiou X, et al. IPD-IMGT/HLA database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D948–D955.
- [18] Gonzalez-Galarza F F, McCabe A, Santos E, et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: Gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D783–D788.
- [19] He Y, Li J, Mao W, et al. HLA common and well-documented alleles in China[J]. *HLA*, 2018, 92(4): 199–205.
- [20] Enokida. T, Moreira A, Bhardwaj N. Vaccines for immunoprevention of cancer[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(9): e146956.
- [21] Namvar A, Panahi H A, Agi E, et al. Development of HPV(16, 18, 31, 45) E5 and E7 peptides-based vaccines predicted by immunoinformatics tools[J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(3): 403–418.
- [22] Goradel N H, Negahdari B, Mohajel N, et al. Heterologous administration of HPV16 E7 epitope-loaded nanocomplexes inhibits tumor growth in mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108298.
- [23] Zhang Y, Ren F, Ni B, et al. Tumor targeting nanoparticle E7(49–57)–HSP110–RGD elicits potent anti-tumor immune response in a CD8-dependent manner in cervical cancer-bearing mouse model[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17(10): 3529–3538.
- [24] Ghanaat M, Kaboosi H, Negahdari B, et al. Heterologous prime-boost vaccination using adenovirus and albumin nanoparticles as carriers for human papillomavirus 16 E7 epitope[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2023, 24(9): 1195–1203.
- [25] Tseng S H, Cheng M A, Farmer E, et al. Albumin and interferon-beta fusion protein serves as an effective vaccine adjuvant to enhance antigen-specific CD8+ T cell-mediated antitumor immunity[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(4): e004342.
- [26] Slingluff C L, Jr. The present and future of peptide vaccines for cancer: Single or multiple, long or short, alone or in combination?[J]. *Cancer J*, 2011, 17(5): 343–350.
- [27] Liu W, Tang H, Li L, et al. Peptide-based therapeutic cancer vaccine: Current trends in clinical application[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(5): e13025.
- [28] Pardoll D M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(4): 227–238.
- [29] Nezafat N, Sadraeian M, Rahbar M R, et al. Production of a novel multi-epitope peptide vaccine for cancer immunotherapy in TC-1 tumor-bearing mice[J]. *Biologicals*, 2015, 43(1): 11–17.
- [30] Wang Q, Li Q F, Zang J, et al. A novel multi-epitope vaccine of HPV16 E5E6E7 oncoprotein delivered by HBe VLPs induced efficient prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity in tumor mice model[J]. *Vaccine*, 2022, 40(52): 7693–7702.
- [31] Gul A, Doskaya M, Can H, et al. Immunogenicity of a xenogeneic multi-epitope HER2(+) breast cancer DNA vaccine targeting the dendritic cell restricted antigen-uptake receptor DEC205[J]. *Vaccine*, 2022, 40(16): 2409–2419.
- [32] De Oliveira L M, Morale M G, Chaves A A, et al. Design, immune responses and anti-tumor potential of an HPV16 E6E7 multi-epitope vaccine[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138686.