

# 人副流感病毒广谱 T 细胞表位疫苗设计：一种免疫信息学方法

陈苓苓<sup>1</sup>, 李旻<sup>2</sup>, 曹赫男<sup>1</sup>, 江晓<sup>1</sup>, 聂嘉琪<sup>1</sup>, 贾书磊<sup>1\*</sup>

1 天津医科大学 基础医学院, 天津

2 生物芯片北京国家工程研究中心, 北京

陈苓苓, 李旻, 曹赫男, 江晓, 聂嘉琪, 贾书磊. 人副流感病毒广谱 T 细胞表位疫苗设计：一种免疫信息学方法[J]. 微生物学报, 2026, 66(1): 456-475.

CHEN Lingling, LI Yang, CAO Henan, JIANG Xiao, NIE Jiaqi, JIA Shulei. Designing a broad-spectrum multi-epitope vaccine against human parainfluenza virus: an immunoinformatics approach[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(1): 456-475.

**摘要：**【目的】人副流感病毒 3 型(human parainfluenza virus type 3, HPIV-3)是全球获得性呼吸道感染的关键致病因素，目前尚无特异性治疗药物。鉴于该病原体抗原具有复杂性和变异性，其疫苗开发进展较为滞后。设计具有广谱特性的新型疫苗，对于为持续突变的野生型毒株提供全面防护至关重要。【方法】为克服病毒的抗原性变异，从 NCBI 下载不同的 HPIV-3 抗原蛋白(F、M、N 和 HN 蛋白)序列，并通过序列比对分别生成共识序列，进一步运用反向疫苗学方法，预测并设计了一种针对 HPIV-3 的广谱 T 细胞表位疫苗。【结果】该多表位疫苗包含来自 F、M、N 和 HN 蛋白的 11 个 CTL 表位(9-mer)和 11 个 HTL 表位(15-mer)，由 355 个氨基酸组成，不含佐剂。预测的 T 细胞表位具备可溶性、非致敏性、高抗原性及免疫原性。设计的疫苗能有效结合天然免疫中的 Toll 样受体，具有较好的稳定性和亲水性，且人口覆盖度较高。【结论】本研究设计的 HPIV-3 多表位疫苗有望成为预防 HPIV-3 感染的候选疫苗，为疫苗的设计与开发提供了一种新颖的免疫信息学方法。

**关键词：**人副流感病毒 3 型；免疫信息学；多表位疫苗；反向疫苗学

资助项目：天津市自然科学基金青年基金(24JCQNJC00460)

This work was supported by the Tianjin Natural Science Foundation Youth Project (24JCQNJC00460).

\*Corresponding author. E-mail: jiashu320lei@126.com

Received: 2025-07-21; Accepted: 2025-10-22; Published online: 2025-11-14

# Designing a broad-spectrum multi-epitope vaccine against human parainfluenza virus: an immunoinformatics approach

CHEN Lingling<sup>1</sup>, LI Yang<sup>2</sup>, CAO Henan<sup>1</sup>, JIANG Xiao<sup>1</sup>, NIE Jiaqi<sup>1</sup>, JIA Shulei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin, China

<sup>2</sup> National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology (CapitalBio), Beijing, China

**Abstract:** [Objective] Human parainfluenza virus type 3 (HPIV-3) is a key factor in global acquired respiratory infections, and there is no specific therapy available. Due to the complexity and variability of the pathogen antigen, the development of vaccines against HPIV-3 is lagging behind. It is crucial to design a novel broad-spectrum vaccine for comprehensive protection against continuously mutated wild-type strains. [Methods] To overcome the antigenic variation of the virus, we downloaded different HPIV-3 antigen proteins (F, M, N, and HN proteins) from NCBI and generated consensus sequences through sequence alignment. Furthermore, a broad-spectrum T cell epitope vaccine targeting HPIV-3 was predicted and designed *via* methods of reverse vaccinology. [Results] The multi-epitope vaccine (MEV) incorporated 11 cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes (9-mer) and 11 helper T lymphocyte (HTL) epitopes (15-mer) from the F, M, N and HN proteins, being composed of 355 amino acid residues without adjuvant. The predicted T cell epitopes had solubility, no allergenicity, high antigenicity, and immunogenicity. The designed vaccine can effectively bind to Toll-like receptors in natural immunity, with good stability, hydrophilicity, and high population coverage. [Conclusion] The designed vaccine could be a candidate vaccine against HPIV-3 infection. We provide a novel immunoinformatics approach for vaccine design and development.

**Keywords:** human parainfluenza virus type 3; immunoinformatics; multi-epitope vaccine; reverse vaccinology

人副流感病毒 (human parainfluenza virus, HPIV) 是有包膜的负链单链 RNA 病毒, 属于副黏病毒科, 这些病毒是所有年龄段人群, 尤其是婴儿、幼儿和免疫系统受损个体发生急性呼吸道感染 (acute respiratory infections, ARIs) 的主要且常见病因<sup>[1-2]</sup>。HPIV 基因组包含 6 个转录基因单元, 其翻译的蛋白质包括核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和大蛋白(L)<sup>[2]</sup>。F 和 HN 蛋白是 HPIV 的表面蛋白, 前者负责将病毒结合到细胞膜表面的唾液酸, 后者介导病毒与宿主细胞膜的融合, 二者的结合是呼吸道上皮

细胞感染的第一步, 这 2 种蛋白是该病毒的主要保护性抗原<sup>[2-3]</sup>。M 蛋白对病毒粒子的组装和释放至关重要, 它覆盖在包膜的内表面; N 蛋白包裹病毒 RNA, 形成稳定的核衣壳; P 和 L 蛋白则与 N 蛋白结合并相互作用形成病毒 RNA 聚合酶<sup>[2-4]</sup>。HPIV 有 4 种主要类型(HPIV 1-4), 其中 HPIV-1 和 HPIV-2 是已知引起哮吼(croup)的最主要原因, 而 HPIV-3 则通过引发支气管炎和肺炎成为下呼吸道感染的常见病因<sup>[5]</sup>。在不同类型的 HPIV 中 HPIV-3 是导致住院的主要原因, 也是免疫功能低下个体发病和死亡的主要原因之一<sup>[2,5-6]</sup>。在罕见情况下, 也有报道称与

HPIV-3 感染相关的急性脑脊髓炎和脑膜炎<sup>[7-8]</sup>。因此, 控制该病毒感染对婴幼儿、成人及免疫功能低下者均至关重要。目前尚无特定的抗 HPIV 药物或获批疫苗用于预防和控制该病毒<sup>[9]</sup>。多项人体和动物研究表明, 针对 HPIV 抗原的体液免疫和细胞免疫对于提供针对该病毒的保护性免疫和控制感染是有效且必要的<sup>[5,10-11]</sup>。

靶向 F 和 HN 表面糖蛋白的中和抗体在长期防护 HPIV 中起着重要作用<sup>[10]</sup>。值得注意的是, 只有在 CD4<sup>+</sup> 辅助性 T 淋巴细胞存在时才会发生有效且持久的体液免疫及 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应<sup>[10,12]</sup>。因此, 在设计有效疫苗时纳入 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应似乎对于诱导针对这种病毒感染的细胞和体液免疫反应是必要的。对于存在免疫缺陷的人群, 目前白血病患者以及遗传性免疫缺陷个体的一种候选治疗方法是造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT), 在此治疗中受者患者的血细胞被完全清除, 然后将造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 注入患者体内<sup>[13-15]</sup>。然而, 该治疗存在一个问题, 即具有抗感染能力的免疫细胞再生缓慢且薄弱, 在 HSC 注射后到免疫细胞分化与重建的期间, 潜伏病毒感染的再激活或机会性感染威胁着患者的生命<sup>[13-15]</sup>。这个问题在接受实体器官移植的患者中也同样存在, 这是由于他们需要接受免疫抑制剂以防止移植排斥<sup>[13-15]</sup>。对抗移植患者中常见病毒感染 (如 HPIV-3) 的一种新治疗策略是过继转移病毒特异性 T 细胞, 以在移植时间与免疫系统重建之间的间隔期建立抗病毒免疫力<sup>[14-15]</sup>。在此方法中, 供体白细胞在体外暴露于病毒抗原, 待病毒抗原特异性 T 细胞被刺激和增殖后将病毒特异性 T 细胞注射到移植受者体内<sup>[14-15]</sup>。因此, 设计一种抗 HPIV-3 的预防性疫苗是针对免疫系统健全人群的有效策略, 而转移用 HPIV-3 病毒抗原刺激的特异性 T 细胞是针对存在免疫缺陷人群的有效策略。目前, 利用表位设计疫苗已成为传染病防治的一个重点领域<sup>[16]</sup>。表位疫苗能够同时激发免疫系统的体液免疫和细胞免疫分支, 其由高免疫原

性的 T 细胞表位构成, 可特异性激活细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 及辅助 T 淋巴细胞 (helper T lymphocyte, HTL), 从而诱导针对特定表位的免疫应答<sup>[17]</sup>。在许多细菌感染中 HTL 会显著刺激保护性免疫反应, 识别负责 T 细胞反应的肽对于创建强大的基于表位的肽疫苗至关重要<sup>[17]</sup>。利用表位的肽疫苗可以提供诸如可负担的生产、选择免疫类型的能力和更好的安全性等好处。免疫信息学或计算生物学的方法在基于表位设计肽疫苗方面至关重要<sup>[10,17]</sup>。由于病原体的不断突变, 传统疫苗无法为人体提供有效的疗效保护, 有必要设计广谱疫苗来预防大量野生型病原。基于抗原保守区的疫苗设计可以有效避免因病原体突变导致的失败。因此, 本研究的目标是通过 HPIV-3 抗原蛋白的保守区域设计共识序列, 以广泛覆盖不同来源的 HPIV-3 菌株。这里提出的疫苗免疫信息学方法可以作为治疗病毒相关感染的病原体特异性疫苗的有前景的候选方案得到广泛应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 蛋白质组数据与共识序列

选择 HPIV-3 的完整生物结构蛋白, 包括 F、M、N 和 HN, 用于预测有效的 CTL 和 HTL 表位。使用 CD-HIT 以 100% 一致性对这些蛋白进行去冗余处理。采用 MAFFT v7.487 对这些蛋白进行多序列比对。在进一步验证这些比对序列后使用 Python 脚本识别它们的共有区域, 保留出现频次最高的氨基酸, 从而形成共识序列。比对不同物种或个体的基因组序列, 可以识别出共同的保守区域, 这些区域通常与基因功能密切相关。

### 1.2 MHC I 和 II 表位的预测与评估

分别使用 NetMHCIIpan-3.2 和 NetMHCpan-4.1 评估结合主要组织相容性复合体 I 类 (MHC I, 9-mer) 和 II 类 (MHC II, 15-mer) 的位点。根据 Guan 等<sup>[18]</sup>的研究选择了相应的人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 等位基因。对于

MHC I, 选择对 HLA 具有最高亲和力的表位 (<0.5%); 而对于 MHC II, 选择亲和力相对较低的表位 (<10%)。分别使用 VaxiJen v2.0、IEDB-tools 和 ToxinPred 等工具进行抗原性预测、表位保守性分析和毒性肽预测<sup>[18]</sup>。

### 1.3 MHC I 类肽的免疫原性

使用 IEDB 免疫表位数据库 (<https://www.immuneepitope.org/>) 中的 Class I Immunogenicity 在线工具 (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>) 预测 MHC I 类肽的免疫原性。该工具通过分析氨基酸的理化特性及其序列特异性定位来评估免疫原性表位。预测为阳性的肽可能具有免疫原性, 保留得分超过 0.12 的表位。

### 1.4 抗原性和致敏性分析

对肽进行进一步研究以验证其诱导过敏和免疫原性的潜力。对于抗原性预测, 使用 VaxiJen v2.0 (阈值 $\geq 0.4$ ) 确定多表位引发免疫反应的能力, 并使用 AllerTOP v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) 评估其致敏性。

### 1.5 MHC II 类肽的细胞因子诱导

通过评估 MHC II 类表位诱导细胞因子 IFN- $\gamma$  产生的能力及致敏性, 对 MHC II 类表位进行评估。在此情况下, 使用 IFNepitope 服务器以默认参数预测这些表位的特性<sup>[18]</sup>。

### 1.6 人群覆盖率预测

使用 T 细胞表位及其相应的 HLA 结合等位基因计算人群覆盖率。使用 Population Coverage 工具 (<http://tools.immuneepitope.org/population>) 预测每个表位的人群覆盖率。

### 1.7 多表位疫苗构建

使用在先前的预测和序列筛选中显示出最佳抗原性和免疫原性的表位构建多表位疫苗 (multi-epitope vaccine, MEV)。具体而言, HTL 表位通过柔性连接子“GPGPG”连接, 线性 CTL 表位则通过柔性 AAY 连接子连接<sup>[18]</sup>。有效的连接子可以防止蛋白质错误折叠和功能区域重叠。

### 1.8 理化特性和溶解性

理化特性是蛋白质的重要特征, 使用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析预测表位的理化特性, 以深入了解疫苗的基本性质。此外, 通过 Protein-Sol 网站 (<http://protein-sol.manchester.ac.uk>) 分析疫苗的溶解性。

### 1.9 二级结构、三维结构优化与验证

在 PSIPRED 服务器 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 上预测疫苗的二级结构, 该服务器提供了一系列蛋白质结构预测方法。使用 AlphaFold 3.0 网站 (<https://alphafoldserver.com/>) 预测所开发疫苗的三维(3D)结构。随后, 通过 GalaxyRefine 服务器 (<http://galaxy.seoklab.org/refine>) 对已识别的 3D 结构进行优化。根据最低能量得分和最高 RMSD 值确定所选结构, 优化和识别后使用 PyMOL v2.5.7 对结构进行可视化。

3D 模型评估通过 PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) 和 ProSA 在线网站 (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), 分析其与平均值间的偏差<sup>[18]</sup>。

### 1.10 潜在二硫键预测

二硫键通常通过减少结构无序性和增强能量稳定性在稳定蛋白质折叠状态中起关键作用。为增强疫苗的稳定性和使用 Disulfide by Design 2.0 网站 (<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>) 来预测构建疫苗的二硫键。利用该结构来仔细检查潜在的半胱氨酸突变, 这导致在疫苗内形成二硫键。选择残基对能量 $\leq 2.2$  kcal/mol 作为阈值<sup>[18-19]</sup>。

### 1.11 疫苗-受体分子对接

分子对接用于解释疫苗蛋白与受体分子的结合情况。由于病毒糖蛋白和 dsRNA 总能识别 Toll 样受体 TLR4 (PDB 编号为 2Z63) 和 TLR3 (PDB 编号为 1ZIW), 因此选择这 2 种受体作为免疫受体。在此情况下, 将优化后的 3D 模型作为配体提交至 ClusPro v2.0 (<https://cluspro.bu.edu/>) 进行分子对接。对接前, 用 PyMOL v2.5.7 去除配体和受体中的水分子, 同时添加氢离子。

## 1.12 疫苗的稳定性评估

在内(二面角)坐标系中, 正态模式分析(normal mode analysis, NMA)能自然地再现生物大分子的集体功能运动。使用 iMODS 工具(<http://imods.chaconlab.org/>)探索疫苗-受体对接复合物的稳定性和物理运动。该工具可使用内部坐标中的 NMA 来预测蛋白质的集体运动。iMODS 工具能计算疫苗-受体复合物的可变形性、特征值、方差、协方差图、B 因子和弹性网络。

## 1.13 *In silico* 疫苗克隆

利用优化的密码子可最大限度地提高宿主中疫苗抗原的产量。由此, 使用 EMBOSS backtranseq ([https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss\\_backtranseq](https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_backtranseq))反向翻译疫苗蛋白。使用 JCat 网站(<http://www.jcat.de/>)获取蛋白质表达水平。本研究选择大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12 作为宿主表达生物。通过密码子适应指数(codon adaptation index, CAI)和 G+C 含量推断蛋白质表达水平。据报道, CAI $\geq$ 0.8 通常处于合理范围, 而 30%–70% 的 G+C 含量意味着较高的基因翻译和转录效率<sup>[20]</sup>。

## 1.14 实验动物与细胞系

6–8 周龄的雌性 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有不涉及致病性病原体的动物研究均在 SPF 级设施中开展。HEK-293 细胞在生长培养基(杜尔贝科改良伊格尔培养基, 含 10% 胎牛血清及抗生素)中培养, 并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育。本研究所有动物实验均通过深圳灵赋拓普生物科技有限公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批, 编号为 TOP-2PZ-GM250808。

## 1.15 小鼠免疫接种及特异性抗体水平检测

基于设计的序列构建并合成重组质粒 pET-29a(+)-HPIV-3。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 构建重组菌 pET-29a(+)-HPIV-3。pET-29a(+)-HPIV-3 和弗式佐剂混合比为 1:1, 充分涡旋乳化, 制备 pET-29a(+)-HPIV-3

亚单位疫苗。将小鼠分为 2 组并标记, 小鼠经腹腔注射三溴乙醇麻醉后, 通过滴鼻方式给予 20  $\mu$ g 疫苗, 对照组给予安慰剂(PBS)。在实验终点, 通过颈椎脱位法处死小鼠收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)或肺组织。

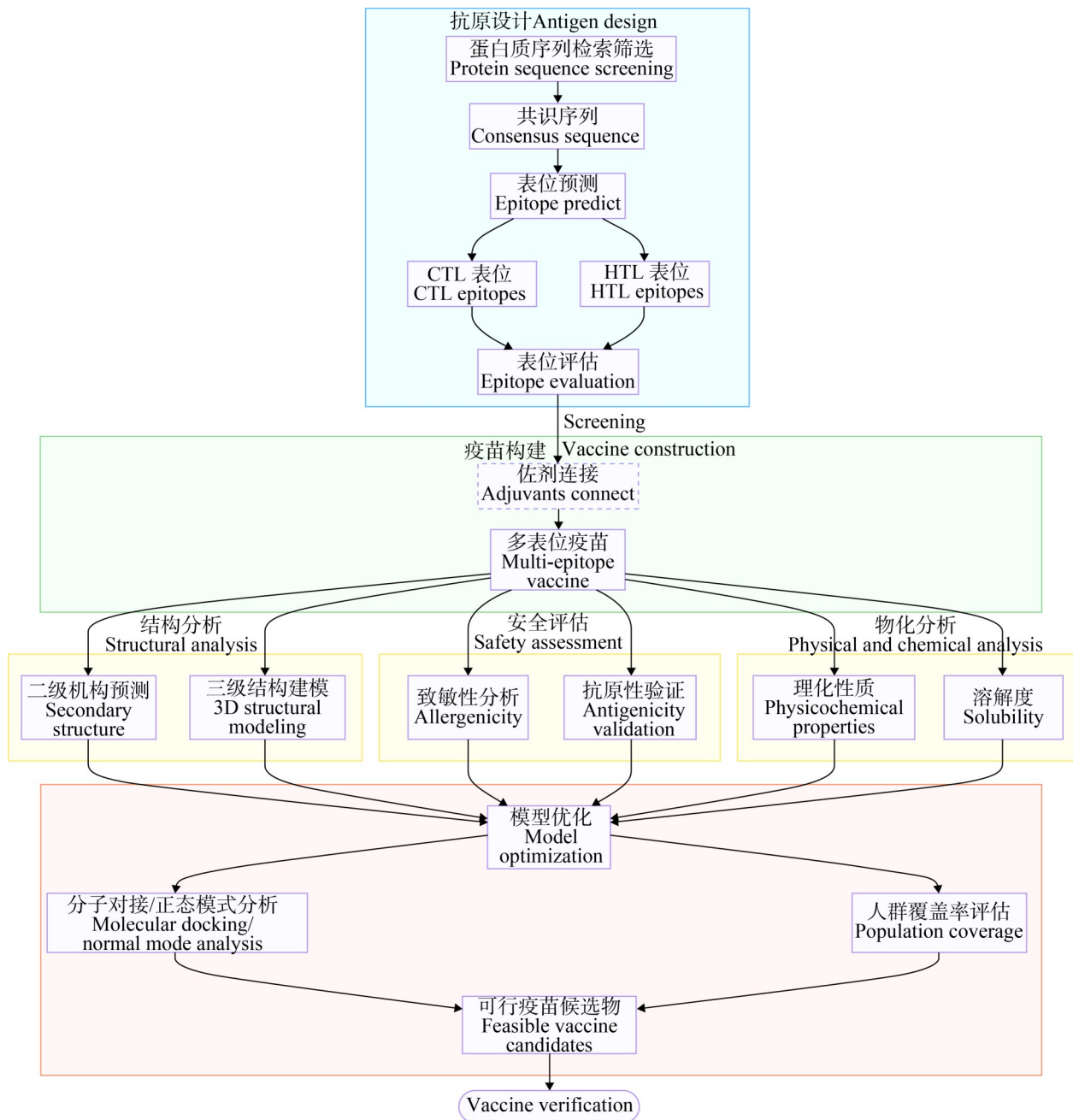
通过 ELISA 检测小鼠血清和支气管肺泡灌洗液中的 IgG 和 IgA 抗体水平。对于 IgG 检测, 血清样品以 1:400 为起始稀释度进行 3 倍系列稀释, 肺泡灌洗液样品以 1:5 为起始稀释度进行 2 倍系列稀释。对于 IgA 检测, 肺泡灌洗液样品使用未稀释的原液作为起始稀释度进行 2 倍系列稀释。在 37 °C 孵育 2 h 后, 加入二抗: HRP 标记的抗小鼠 IgG 抗体(1:100 000 稀释); HRP 标记的抗小鼠 IgA 抗体(1:5 000 稀释)。再次在 37 °C 孵育 1 h, 随后加入 TMB 底液(苏州新赛美生物科技有限公司)。结合抗体的终点滴度定义为产生的吸光度值高于免疫前样品吸光度值至少 0.1 OD 单位的最高血清稀释度的倒数。

# 2 结果与分析

## 2.1 疫苗设计流程

抗原肽疫苗由 T 细胞表位组成。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)选择并下载了结构蛋白, 包括 F 蛋白( $n=143$ )、M 蛋白( $n=102$ )、N 蛋白( $n=118$ )和 HN 蛋白( $n=533$ ) (图 1)。生成的共识序列与参考序列[如 F (NP\_067151.1)、M (NP\_067150.1)、N (NP\_067148.1) 和 HN (NP\_067152.1)]分别显示出 96.47%、98.30%、98.25% 和 94.25% 的氨基酸序列相似性。然后选择共识序列来预测用于疫苗设计的假定 T 细胞表位。疫苗设计逻辑是先连接 CTL 表位, 再连接 HTL 表位。佐剂应连接在 N 端, 使用 AAY 连接子连接 CTL 表位, 使用 GPGPG 连接子连接 HTL 表位, 然后用于进一步的疫苗评估。

利用 IEDB 数据库工具(<http://tools.iedb.org/>)从 HPIV-3 的结构蛋白中识别潜在的 CTL 和 HTL 表位。在选定的 F、M、N 和 HN 蛋白中共



**图1 HPIV-3疫苗构建流程。** 候选T细胞疫苗通过将CTL和HTL表位组合进行结构设计，并在疫苗的C端添加了6×His (组氨酸)标签。

Figure 1 The pipeline of the HPIV-3 vaccine construction. The candidate T cell vaccine was structurally designed by combining CTL and HTL epitopes with the C-terminus of the vaccine being added with 6×His (histidine).

识别出 335 个 CTL 表位(9-mer)。进一步筛选后，确定了 11 个最佳的 CTL 表位，这 11 个 CTL 表位表现出高抗原性、高免疫原性、无毒性

和非致敏性，被选用于最终的疫苗开发(表 1)。类似地，使用 IEDB 数据库工具共识别出 1 144 个 HTL 表位(15-mer)，其中只有 11 个最佳 HTL 表

表1 用于构建候选疫苗的CTL和HTL表位列表

Table 1 List of the CTL and HTL epitopes selected to construct the candidate vaccine

类别	蛋白	总平均疏水指数(GRAVY)	蛋白肽	长度	位置	等位基因	抗原得分	I类肽免疫原性	IFN- $\gamma$ 得分	人群覆盖度
Types	Protein	Grand average of hydrophobicity (GRAVY)	Peptide sequence	Length (mer)	Location	Alleles	Antigenicity score	Immunogenicity of class I epitope	IFN- $\gamma$ score	Population coverage (%)
CTL epitopes	F	1.722	AQITAAVAL	9	126-135	HLA-B*15:01	0.673	0.215	N/A	8.44
		1.333	AAVALVEAK	9	130-139	HLA-A*11:01	1.399	0.188	N/A	15.53
		0.056	VTSDIVPRY	9	368-377	HLA-A*11:01	0.615	0.158	N/A	15.53
		2.111	ITIITIAIK	9	509-518	HLA-A*11:01	1.612	0.451	N/A	15.53
	M	-0.911	SENGHIEPL	9	17-26	HLA-B*39:01	1.068	0.267	N/A	2.75
		0.756	GSLPIGLAK	9	90-99	HLA-A*11:01	0.981	0.160	N/A	15.53
		0.778	VEITRVDAI	9	318-327	HLA-B*40:01	1.227	0.213	N/A	7.81
		-0.789	PSLPGEFRY	9	329-338	HLA-A*01:01	0.955	0.242	N/A	17.34
		-0.589	RYYPNIIAK	9	336-345	HLA-A*03:01	0.797	0.242	N/A	16.81
		-0.444	IRYGIETRM	9	272-281	HLA-B*27:05	1.035	0.320	N/A	4.78
HTL epitopes	HN	0.144	PSVGPPIYY	9	320-329	HLA-A*01:01	0.767	0.179	N/A	17.34
	F	-0.827	QIYKVDSISY	15	292-307	HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*04:01	0.706	N/A	0.204	27.97
		0.500	SHIMTKGAF	15	314-329	HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*07:01	0.487	N/A	0.256	34.02
		0.400	SVALDPIDISI	15	448-463	HLA-DRB1*03:01	1.366	N/A	0.259	17.84
		1.160	INITIITIAIKY	15	507-522	HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*15:01	1.381	N/A	0.420	49.02
	M	-0.493	HIKTGVQTD	15	209-224	HLA-DRB1*03:01	0.641	N/A	0.132	17.84
		0.147	MVHLGLIKR	15	236-251	HLA-DRB1*03:01	0.592	N/A	0.418	17.84
		-0.433	KVGRMY	15	334-349	HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*07:01	0.831	N/A	0.484	56.72
		0.827	PAIWSYAMG	15	329-344	HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*09:01	0.592	N/A	0.302	34.02
		0.633	VAVVQN	15	331-346	HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*09:01	0.646	N/A	0.532	34.02
-1.153		IWSYAMGVA	15	443-458	HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*04:01	0.440	N/A	0.233	17.24	
HN	0.587	VVQNRA	15	330-345	HLA-DRB1*15:01	0.673	N/A	0.935	18.41	
			GKIIFLGYG	15						
			NRSDDR	15						
			GLEHPI	15						

N/A: 未检测到; 百分比等级: MHC I&lt;0.5%, MHC II&lt;10%。

N/A: Not detected; % rank: MHC I&lt;0.5%, MHC II&lt;10%.

位能触发产生特异性细胞因子 IFN- $\gamma$  (表 1), 被选用于疫苗设计。最终, 构建的疫苗由 355 个氨基酸组成, 基于 22 个表位设计, 包括 11 个 CTL 表位和 11 个 HTL 表位(表 1)。

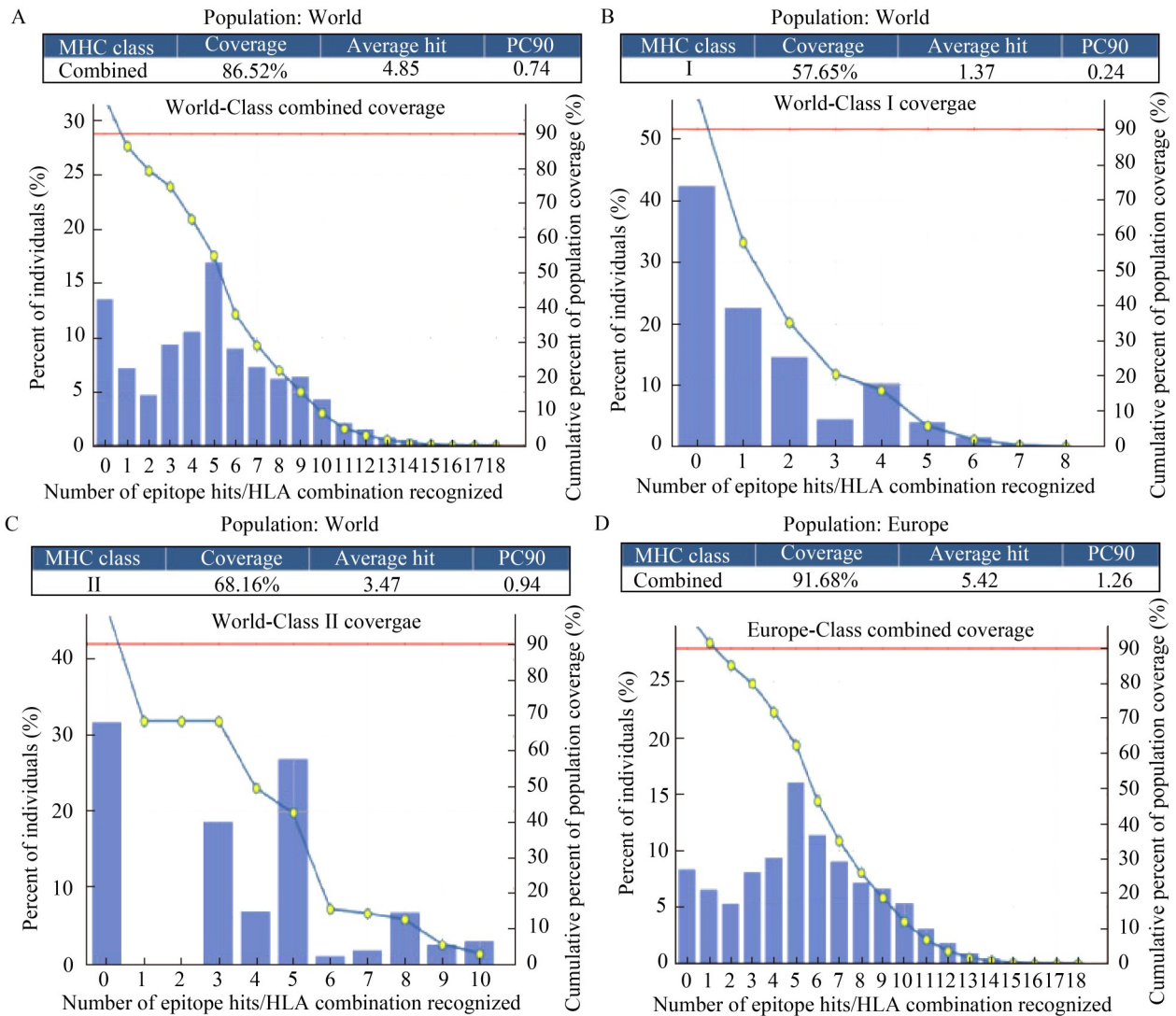
## 2.2 全球人群覆盖度

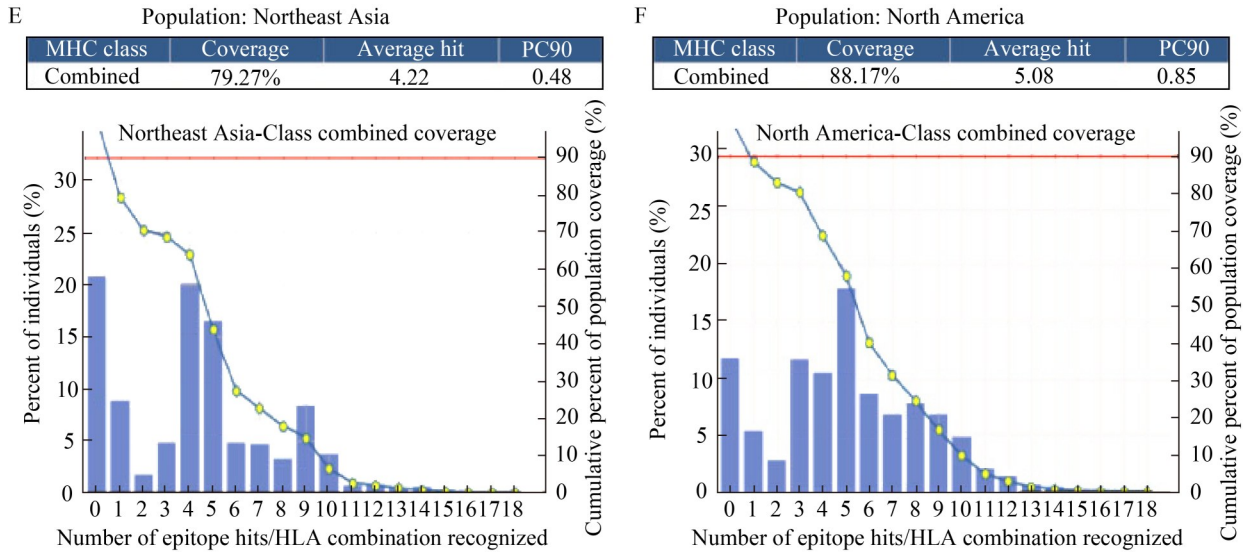
如表 1 所示, 评估了所选 CTL 和 HTL 表位的人群覆盖度。在全球范围内, CTL 和 HTL 表位的人群覆盖度为 86.52%。其中, CTL 表位的全球平均人群覆盖度为 57.65%, HTL 表位为 68.16% (图 2A)。所选表位能与多个地理区域[包括东北亚 (79.27%)、欧洲 (91.68%) 和北美 (88.17%)]的多种 HLA 等位基因结合(图 2B)。全

球人群覆盖度表明, 用这些表位设计的疫苗可能对全球大多数人群有效。

## 2.3 理化特性和免疫学评估

本研究评估了未连接任何佐剂的疫苗的物理和化学特性。结果显示, 疫苗的分子量为 37 049.6 Da, 抗原性评分为 0.67 (参考值: 0.40), 免疫原性评分为 5.48, 表明其具有显著的抗原性和较强的免疫原性(表 2)。此外, 还评估了其他特性, 如理论等电点 pI (9.42)、不稳定指数(25.67)、脂肪族指数(90.79)、亲水性总平均值 GRAVY (0.037) 和标准化溶解度(0.43), 显示出高溶解度和亲水性(表 2)。在 PSIPRED 网站上





**图2** 候选疫苗的人群覆盖度。A: MHC I和MHC II类表位的全球人群覆盖度; B: MHC I类表位的全球人群覆盖度; C: MHC II类表位的全球人群覆盖度; D: MHC I和MHC II类表位的欧洲人群覆盖度; E: MHC I和MHC II类表位的东北亚区域人群覆盖度; F: MHC I和MHC II类表位的北美人群覆盖度。90%红线表示累积人群覆盖度达到90%, 它用于衡量疫苗诱导的免疫表位覆盖目标人群的程度, 有助于评估疫苗对人群的保护范围和潜力, 可作为与疫苗相关的免疫表位使90%目标人群产生免疫识别和反应的参考标准。

Figure 2 Population coverage of the candidate vaccine. A: Global coverage of MHC class I and II epitopes; B: Global coverage of MHC class I epitopes; C: Global coverage of MHC class II epitopes; D: European population coverage of MHC class I and II epitopes; E: Northeast Asian regional population coverage of MHC class I and II epitopes; F: North American population coverage of MHC class I and II epitopes. The 90% red line represents that the cumulative population coverage reaches 90%; It is used to measure the extent of coverage of vaccine-induced immune epitopes in the target population, with the reference standard being the ability of relevant vaccine immune epitopes to elicit immune recognition and response in 90% of the target population, thereby assisting in evaluating the vaccine's protective scope and potential for the population.

对疫苗的二级结构(如 $\beta$ -折叠、 $\alpha$ -螺旋和无规卷曲)进行分析。结果显示, 其二级结构包含 21% (73/349)  $\alpha$ -螺旋, 25% (86/349)  $\beta$ -折叠和 54% (190/349) 无规卷曲(表 2)。通过 IEDB 数据库 (<http://tools.iedb.org/>)进一步分析表明, 串联后的疫苗未产生新的抗原表位。

## 2.4 多表位疫苗的 3D 结构、验证与优化

对疫苗的 3D 结构进行结构优化以进行评估和验证(图 3A)。优化后疫苗模型的 Ramachandran 图显示, 88.2% 的残基位于有利

区域, 11.8% 位于允许区域, 无残基位于不允许区域(图 3B)。类似地, ProSA 服务器生成的 Z-score 值表明了模型的整体质量, 该 Z-score 与核磁共振(NMR)光谱和 X 射线区域相似, 表明结构质量优异。结果显示, 优化后的模型 Z-score 值为-2.86(图 3C), 更接近于 NMR 和 X 射线产生的区域。

## 2.5 二硫键工程

二硫键通过减少构象熵、增加变性状态下的自由能来增强许多胞外和分泌蛋白的稳定性, 从而稳定其折叠形式<sup>[19]</sup>。本研究依靠残基间建立的二硫键来维持疫苗结构的稳定性。使用

**表2** 多表位疫苗的理化特性、免疫反应性和二级结构

Table 2 Physicochemical properties, immuno-reactivity and secondary structure of the multi-epitope vaccine

Item	Results
理化性质 Physical and chemical properties	
Number of amino acids	335
Molecular weight	37 049.6 Da
Predicted scaled solubility	0.43
总平均疏水指数 Grand average of hydropathicity (GRAVY)	0.037
不稳定性和理论等电点 Instability and theoretical pI	
Instability index (II)	25.67
Aliphatic index	90.79
Theoretical pI	9.42
免疫反应性 Immuno-reactivity	
Non-allergen	
Immunogenicity	5.48
Antigen	0.67
二级结构 Secondary structure	
$\alpha$ -helix	21% (73/349)
$\beta$ -strand	25% (86/349)
Random coils	54% (190/349)

Disulfide by Design 2.0 网站 (<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>) 进行研究后, 结果表明在疫苗构建体中包含 32 个潜在的残基对, 它们具有形成二硫键的潜力(表 3)。总共有 5 对残基可以突变为半胱氨酸, 包括 Gly112–Met117、Ser141–Met158、Thr201–Ile204、Val228–Gly234、Gly268–Gly274, 这些残基对具有较低的结合能 (<2.20 kcal/mol) (图 4, 表 3)。

## 2.6 疫苗分子对接

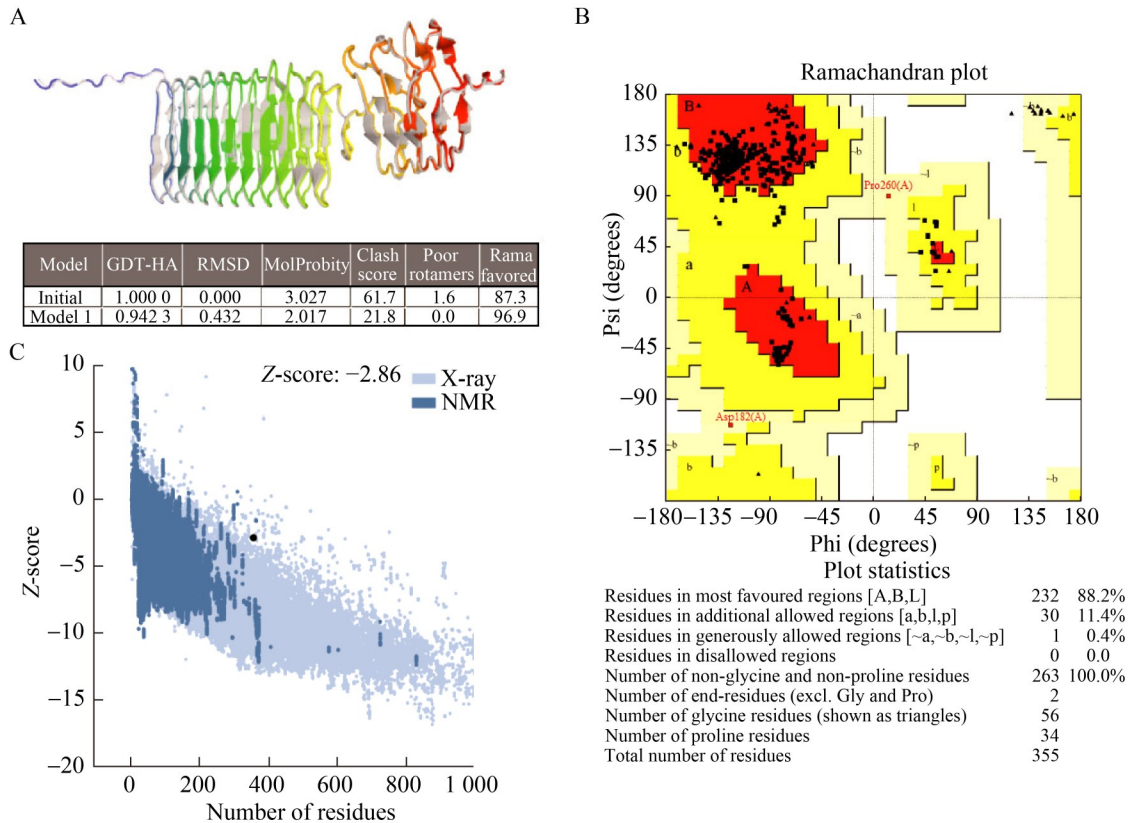
将疫苗作为配体与 TLR4/3 受体进行分子对接, 以预测它们的相互作用和结合亲和力。在此场景中, ClusPro v2.0 服务器生成了 30 个具

有不同构象的对接复合物。本研究进行了疫苗及 TLR4 激动剂与 TLR4 的对接, 从生成的 30 个聚类结果中选择了具有优异综合评估(氢键、范德华力)的 cluster 7。Benchmarking 基准测试表明, 在 cluster 7 中疫苗与 TLR4 对接的最低结合能为  $-1\ 299.7$  kcal/mol (表 4)。相比之下, 糖蛋白 LPS 与 TLR4 对接的最低结合能为  $-1\ 027.0$  kcal/mol, 两者非常接近(图 5A), 表明疫苗-TLR4 复合物具有相对紧凑的构象和稳定的结合相互作用。对所选复合物的结合相互作用进行了分析, 并探索了其参与活性位点残基的情况。在相互作用平面上, 疫苗-TLR3 复合物显示出 1 个范德华力和 6 个氢键的相互作用。疫苗的 Ile65、Val7、Asn196、Ser155、Thr159、Ile181 残基分别能与 TLR3 的 Tyr436、His513、Lys174、Glu101、Asn226、Tyr276 残基形成氢键。类似地, 在范德华力方面, 疫苗的 Arg92 残基可以与 TLR3 受体的 Glu434 残基发生强相互作用(图 5B)。

HPIV-3 作为单链 RNA 病毒, TLR7/8 (识别 ssRNA)也可能是天然免疫受体。因此, 进一步将疫苗分别与 TLR7 (编号为 Q9NYK1)、TLR8 (编号为 3W3J)受体进行分子对接, 结果显示疫苗与 TLR7/8 受体分子对接具有较低的结合能, 表明对接效果良好(图 6A、6B)。

## 2.7 正态模式分析

使用 iMODS 工具进一步探索疫苗-TLR4/TLR3 对接复合物的稳定性和运动。采用正态模式分析(NMA)对接复合物的慢动力学及其表现出大幅度构象变化进行研究。结果显示, 受体和配体倾向于聚集在一起(图 7A、图 8A), 协方差图显示结合区域覆盖了许多红色, 表明疫苗蛋白的关键区域具有协调的氨基酸运动和稳定的配体结合(图 7B、图 8B)。可变形性通过链铰链方法描绘了每个残基的独立扭曲(图 7C、图 8C)。疫苗-TLR4/TLR3 复合物的整体结合峰适中, 表明具有一定的灵活性, 但不会过度扭曲, 这是对对接结果的良好体现。对接后, B 因子在合



**图3 HPIV-3疫苗的三级结构优化与评估。** A: 设计疫苗的3D结构优化; B: Ramachandran图统计, 指示最可接受、不允许和有利的区域; C: ProSA-web结果, 优化疫苗模型的Z-score值为-2.86。

Figure 3 3D refinement and validation of the HPIV-3 vaccine. A: The optimized 3D structure of the designed vaccine; B: The statistics of Ramachandran plot, indicating the most acceptable, disallowed and favorable regions; C: The ProSA-web result, with a Z-score of -2.86 for the optimized vaccine model.

理范围内波动, 不影响蛋白质的自然运动模式(图 7D、8D)。特征值(eigenvalue)是稳定结构的关键参数, 必须较高才能拥有稳定的复合物。研究发现该复合物的特征值分别为  $2.56 \times 10^{-5}$  (疫苗-TLR4)和  $1.22 \times 10^{-5}$  (疫苗-TLR3), 且每个典型模式的方差逐渐减小(图 7E、7F; 图 8E、8F), 这些速率对于结构稳定性显著较高。适中的特征值表明疫苗蛋白在结合后保持了其生物活性并适应了配体结合。

## 2.8 密码子优化与疫苗克隆

为确保疫苗实现高水平表达且易于生产, 通过 JCat 网站对疫苗进行密码子优化。设计的疫苗 cDNA 长度为 1 065 bp, 在 cDNA 末端

添加了终止密码子。该疫苗的 CAI 值(score: 1)和 G+C 含量(50.73%)均较为理想, 这表明其在模式菌株 *E. coli* K12 中具有较高的基因表达潜力和优异的表达能力。使用 SnapGene v5.2.3 软件将疫苗的 cDNA 序列克隆到 pET29a(+)载体中(图 9)。在 pET-29a(+)载体中 T7 启动子和 T7 终止子分别如同“开关”和“刹车”。插入它们之间的基因即为想要表达的疫苗相关序列(图中标记为 HPIV-3)。该序列将在 T7 启动子的驱动下进行转录, 并最终用于后续的疫苗合成。

## 2.9 初次免疫诱导的体液免疫反应

本研究评估了 HPIV-3 疫苗作为鼻内疫苗的体液免疫原性, 采用 ELISA 法检测了小鼠血清

表3 设计疫苗中的潜在二硫键残基对列表

Table 3 List of potential disulfide bond residues in the designed vaccine

氨基酸残基1 Residues 1 (AA)	氨基酸残基2 Residues 2 (AA)	第三侧链二面角 Chi3 (°)	能量 Energy (kcal/mol)
Leu57	Ala83	77.89	2.82
Gly61	Pro85	111.13	3.20
Ala83	Ala107	119.49	5.04
Gly112	Thr115	117.51	3.27
Gly112	Met117	-76.38	0.46
Ser122	Ser143	115.82	5.07
Gly126	Ile146	117.22	6.44
Tyr128	Gly134	-111.98	7.39
Tyr129	Arg149	117.18	6.33
Ser141	Met158	-82.66	1.63
Asn148	Gly154	73.85	2.51
Thr159	Asp179	-104.54	6.01
Asp168	Gly174	-79.29	2.56
Pro180	Ser184	-116.27	3.30
Thr198	Thr218	-90.14	4.78
Thr201	Ile204	122.44	2.19
Ile209	Gln229	126.76	6.77
Ser224	Lys244	92.61	5.47
Val228	Gly234	-92.28	1.46
His237	Arg257	125.12	6.92
Leu240	Pro260	-114.54	2.52
Glu255	Pro275	-96.09	5.96
Tyr259	Ser279	109.26	6.19
Asn261	Ala264	91.88	4.16
Ala264	Val284	-95.05	5.17
Gly268	Gly274	-105.30	1.16
Ala276	Trp296	91.26	3.62
Gly283	Ala303	87.11	3.94
Tyr298	Gly301	-116.05	5.15
Val305	Arg325	125.54	6.80
Asn307	Asp327	124.32	6.41
Tyr318	Ala321	-74.97	4.97

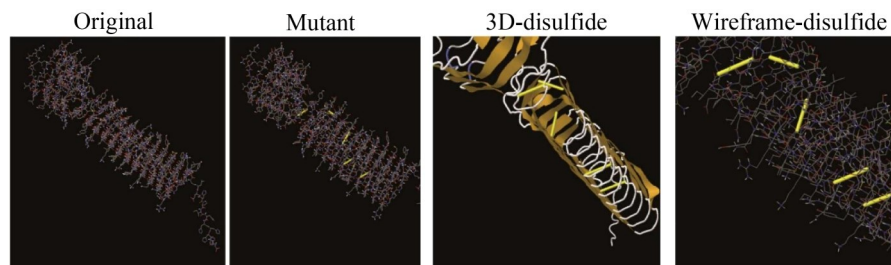


图4 设计疫苗的二硫键设计。突变体包含Gly112–Met117、Ser141–Met158、Thr201–Ile204、Val228–Gly234、Gly268–Gly274，这些残基已被突变为半胱氨酸残基，形成由黄色棒表示的二硫键。

Figure 4 Disulfide bond design in the designed vaccine. The mutant variant features Gly112–Met117, Ser141–Met158, Thr201–Ile204, Val228–Gly234, Gly268–Gly274 that have been mutated into cysteine residues, which form disulfide bonds represented by yellow sticks.

表4 疫苗与TLR4受体对接结合能

Table 4 The binding energy between the vaccine and TLR4 receptor

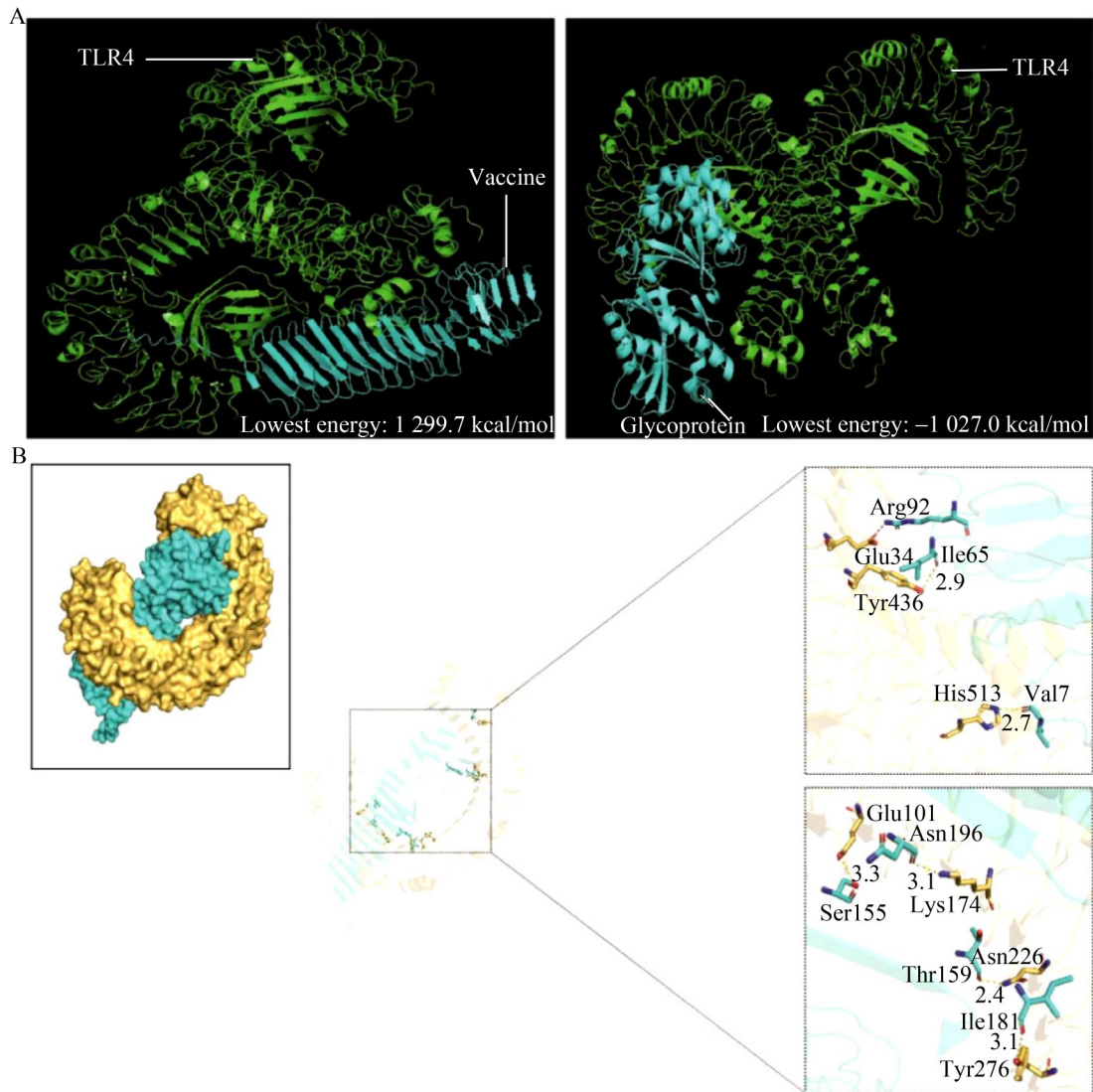
Cluster	Members	Representative	Weighted score
0	136	Lowest energy	-1 287.6
1	118	Lowest energy	-1 287.0
2	51	Lowest energy	-1 220.5
3	49	Lowest energy	-1 247.5
4	46	Lowest energy	-1 255.8
5	32	Lowest energy	-1 187.4
6	26	Lowest energy	-1 289.0
7	26	Lowest energy	-1 299.7
8	24	Lowest energy	-1 202.6
9	22	Lowest energy	-1 143.1
10	21	Lowest energy	-1 274.7
11	21	Lowest energy	-1 112.7
12	20	Lowest energy	-1 210.2
13	19	Lowest energy	-1 191.4
14	16	Lowest energy	-1 194.7
15	15	Lowest energy	-1 097.2
16	15	Lowest energy	-1 138.9
17	14	Lowest energy	-1 291.1
18	14	Lowest energy	-1 057.1
19	14	Lowest energy	-1 183.7
20	14	Lowest energy	-1 116.5
21	13	Lowest energy	-1 151.3
22	13	Lowest energy	-1 059.1
23	12	Lowest energy	-1 040.9
24	12	Lowest energy	-1 092.6
25	12	Lowest energy	-1 070.2
26	11	Lowest energy	-1 115.4
27	11	Lowest energy	-1 068.6
28	11	Lowest energy	-1 065.8
29	10	Lowest energy	-1 063.3

和支气管肺泡灌洗液中的 IgG 与 IgA 抗体水平。如图 10 所示，通过中和抗体 (neutralizing antibodies, NABs) 和结合抗体 (binding antibodies, BAbS) 来评估疫苗接种后的体液免疫反应。接种后 3 周，初次免疫后的小鼠在血清和支气管肺泡灌洗液中均能诱导产生 HPIV-3 特异性的免疫球蛋白 (Ig) G 抗体 (图 10)。对于支气管肺泡灌洗液中的黏膜 IgA，免疫后的小鼠也能够激发产生一定量的抗 HPIV-3 的 IgA 抗体，这表明疫苗的免疫效果良好，疫苗总体设计合理。

### 3 讨论

人类副流感病毒 3 型 (HPIV-3) 是引发儿童下呼吸道感染的一种病毒，其致病性仅次于呼吸道合胞病毒 (RSV)，目前尚无可用的疫苗或抗病毒药物<sup>[18]</sup>。当代免疫信息学工具为传统疫苗开发提供了一种实用且高效的替代方案，其劳动强度较低，是一种有效的筛选方法，疫苗在预防传染病方面始终展现出高安全性和有效性，能够提供针对疾病的获得性免疫力<sup>[21-22]</sup>。理想的靶标应高度保守，能够诱导产生中和性细胞免疫，并生成针对 HPIV-3 的抗体，这对于开发有效疫苗尤为重要。

HPIV-3 的膜相关蛋白和细胞黏附蛋白在疾病进展过程中广泛存在，且表现出高度的保守性和免疫原性，使其成为触发体液和细胞介导免疫反应的最佳免疫原。由于野生型病毒持续发生突变，本研究通过开发一种基于 T 细胞表位的疫苗，以提供针对各种野生型的交叉保护。尽管疫苗有潜力成为未来流行病发生的预防工具，但在当前情况下开发有效的广谱疫苗仍是一项具有挑战性的任务，需要新的疫苗开发方法来应对紧迫的公共卫生威胁。鉴于 F、M、N 和 HN 作为免疫逃避和人际传播关键决定因素的确立作用，本研究优先设计了多表位疫苗构建体<sup>[23-24]</sup>。这涉及通过严格的多序列比对生成目标结构蛋白的共识序列，以最大限度地覆盖流行临床分离株中进化保守的残基，从而靶向具有高人群覆盖频率的免疫优势表位。此外，本研究通过识别抗原上便于体液免疫和细胞免疫系统识别的表面抗原区域，采用免疫信息学驱动的方法筛选针对 HPIV-3 的重要优势免疫原，结果表明所有膜结合蛋白和细胞黏附蛋白均具有良好的抗原性，抗原评分较高。前瞻性筛选和鉴定有效的 HTL 及 CTL 表位是疫苗理性设计的关键基础。尽管 CD8<sup>+</sup> T 细胞 (CTL) 介导的免疫反应是清除病毒的核心机制，但有关 HPIV-3 感染在人与小鼠体内诱导 CTL 应答的研究报道



**图5 HPIV-3与受体的分子对接。**A: HPIV-3疫苗、LPS糖蛋白分别与TLR4受体分子对接；选择能量最低的模型作为最佳结合模式；B: HPIV-3与TLR3受体的分子对接。黄色虚线表示氢键，红色虚线表示范德华力。

Figure 5 Molecular docking between HPIV-3 and the receptors. A: Molecular docking between HPIV-3 vaccine, glycoprotein and the TLR4 receptor, respectively; The model with the lowest energy was selected as the optimal binding mode; B: Molecular docking of the HPIV-3 with TLR3 receptor. The yellow dashed lines indicate hydrogen bonds, while the red dashed lines represent van der Waals forces.

仍显不足<sup>[25-26]</sup>。在此背景下，深入发掘能够驱动强效 CTL 应答的特异性表位，对于开发新一代抗 HPIV-3 疫苗具有重要的科学价值与应用前景。本研究在最终疫苗中采用综合排序过程，对包括表位(HTL 和 CTL)和所需连接子在内的

各项内容进行了评估。疫苗开发过程对于增强表达谱、疫苗折叠特性和稳定性至关重要。通过 EAAAK 连接子连接佐剂和 CTL 表位可增加疫苗的稳定性和持久性，这有助于引发针对特定抗原的强细胞和体液免疫<sup>[27-28]</sup>。然而，在本

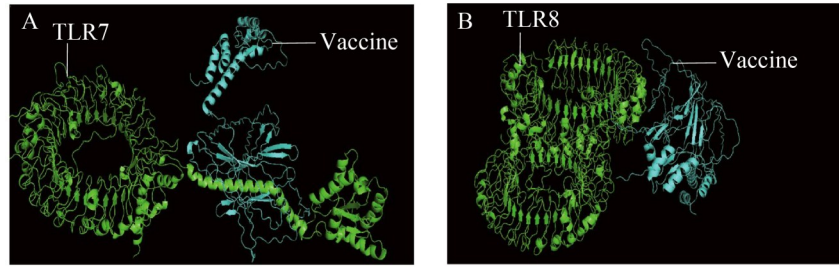


图6 HPIV-3与TLR7/8受体分子对接。A: HPIV-3与TLR7受体的分子对接, 最低结合能为 $-2\ 485.6$  kcal/mol; B: HPIV-3与TLR8受体的分子对接, 最低结合能为 $-1\ 310.3$  kcal/mol。

Figure 6 Molecular docking between HPIV-3 and the TLR7/8 receptors. A: Molecular docking between HPIV-3 and the TLR7 receptor, with the lowest energy of  $-2\ 485.6$  kcal/mol; B: Molecular docking between HPIV-3 and the TLR8 receptor with the lowest energy of  $-1\ 310.3$  kcal/mol.

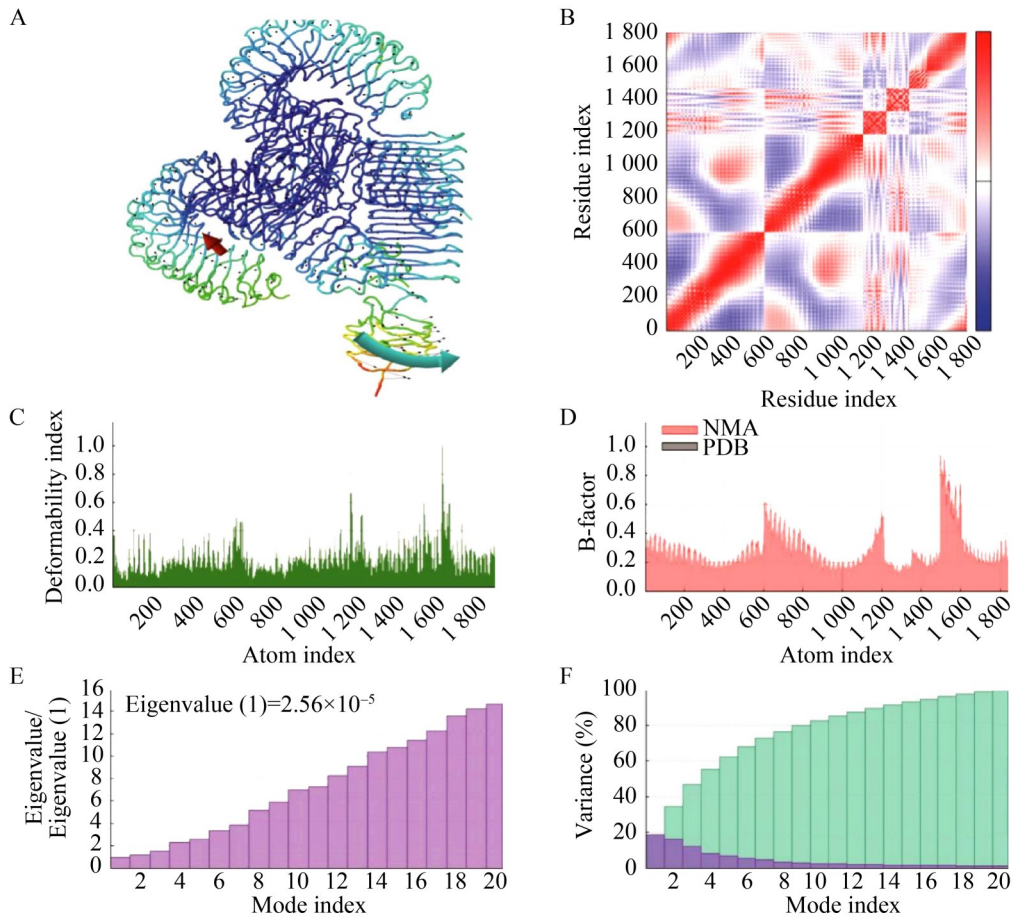
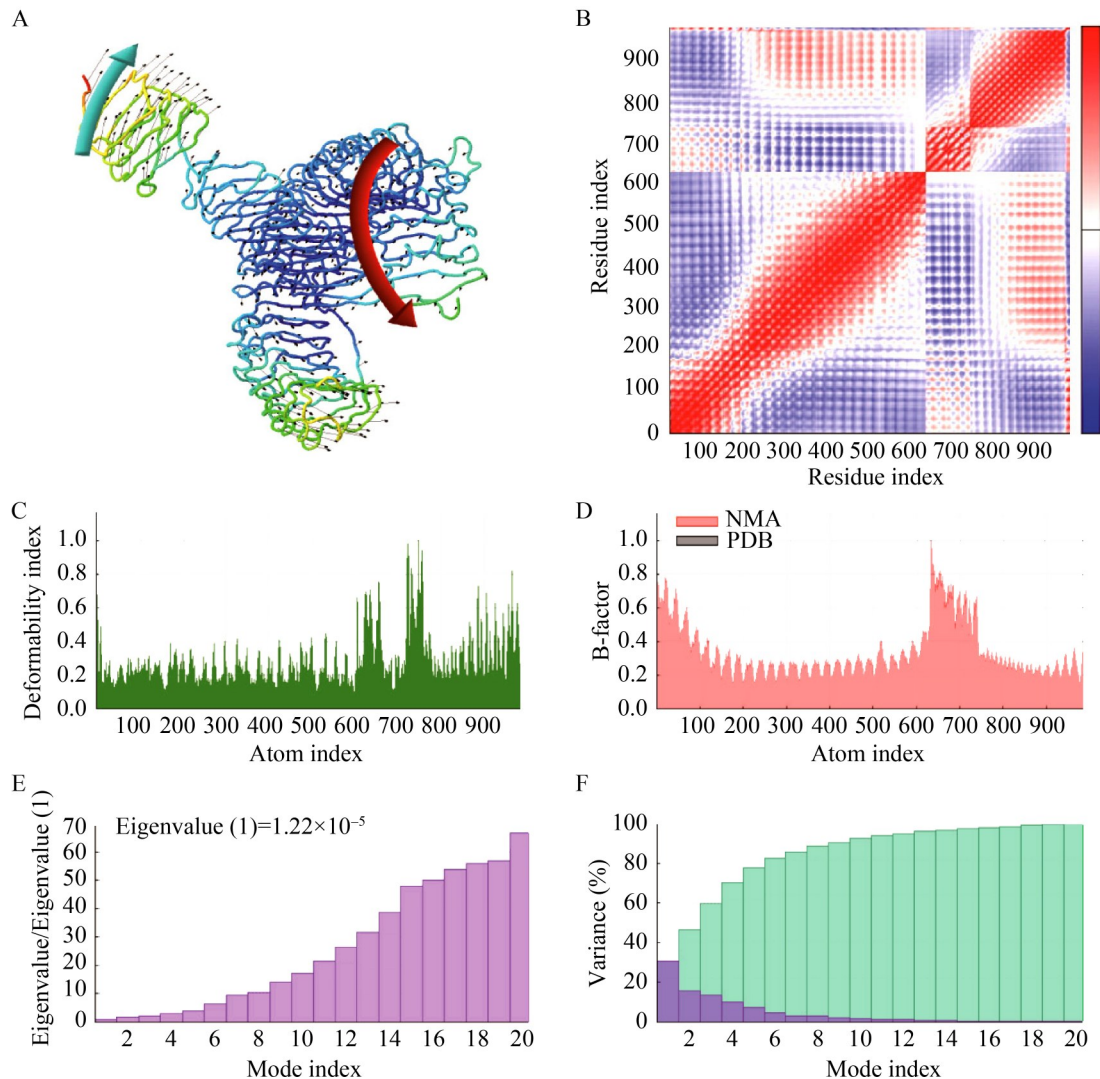


图7 疫苗-TLR4复合物的正态模式分析。A: 疫苗-TLR4复合物的仿射箭头; B: 复合物的协方差图[协方差矩阵表示残基对之间的耦合, 即它们经历的是相关(红色)、不相关(白色)还是反相关(蓝色)运动]; C: 可变形性指数; D: B因子柱状图; E: 特征值; F: NMA方差。

Figure 7 Normal mode analysis of the vaccine-TLR4 complex. A: Affine-arrows of the vaccine-TLR4 complex; B: Covariance map of the complex [Covariance matrix indicates coupling between pairs of residues, i.e. whether they experience correlated (red), uncorrelated (white) or anti-correlated (blue) motions]; C: Deformability index; D: B-factor column; E: Eigenvalue; F: NMA variance.



**图8** 疫苗-TLR3复合物的正态模式分析。A: 疫苗-TLR3复合物的仿射箭头; B: 复合物的协方差图[协方差矩阵表示残基对之间的耦合, 即它们经历的是相关(红色)、不相关(白色)还是反相关(蓝色)运动]; C: 可变形性指数; D: B因子柱状图; E: 特征值; F: NMA方差。

Figure 8 Normal mode analysis of the vaccine-TLR3 complex. A: Affine-arrows of the vaccine-TLR3 complex; B: Covariance map of the complex [Covariance matrix indicates coupling between pairs of residues, i.e. whether they experience correlated (red), uncorrelated (white) or anti-correlated (blue) motions]; C: Deformability index; D: B-factor column; E: Eigenvalue; F: NMA variance.

研究中未评估连接佐剂后的疫苗效力, 这是因为不同佐剂可能对疫苗效力产生不同影响。疫苗蛋白本身的特性似乎更受关注, 这有助于对设计的疫苗进行合理调整。此外, 溶解性是任何潜在疫苗的基本理化特性, 是重组疫苗的重要特征<sup>[29]</sup>。溶解性评估工具可用于预测疫苗的

溶解质量, 本研究通过该方法证实设计的多表位疫苗具有良好的溶解性。同时, 根据理论 pI 值发现疫苗特性呈碱性。分析表明, 该蛋白质在合成后将保持其稳定性。相反, 疫苗能够耐受高温且具有亲水性, 这得到了 GRAVY 值和脂质指数的数据支持。综上所述, 设计疫苗预测

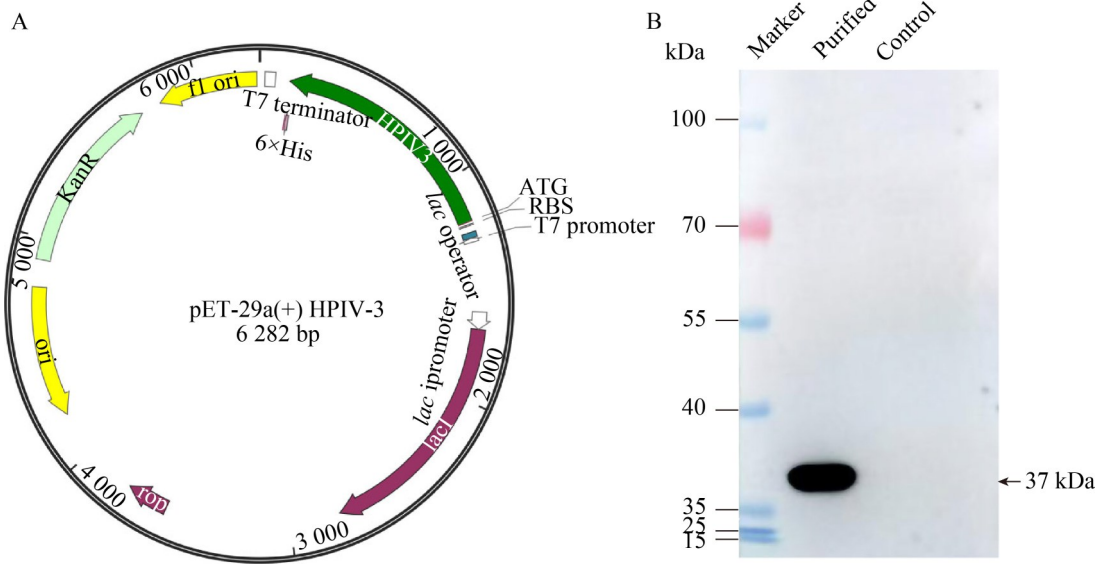


图9 将设计的疫苗虚拟克隆到pET-29a(+)载体。A: 设计的疫苗虚拟克隆到pET-29a(+)载体; B: 蛋白表达纯化图(重组载体插入了疫苗构建体,并在载体内以绿色突出显示,采用大肠杆菌表达系统表达HPIV-3疫苗)。Figure 9 The designed vaccine was virtually cloned into the pET-29a(+) vector. A: Virtual cloning of designed vaccine into the pET-29a(+) vector; B: Purification diagram of protein expression (The recombinant product, with the vaccine construct inserted and highlighted in green within the vector, was shown; The *E. coli* expression system was used to express the HPIV-3 vaccine).

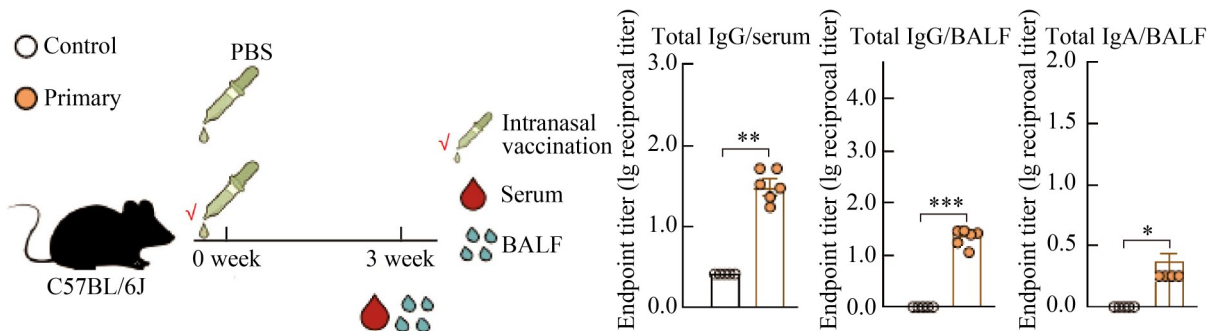


图10 疫苗免疫小鼠诱导的体液免疫反应。每组小鼠( $n=12$ )通过鼻内接种方式接种疫苗;对照组小鼠则接种安慰剂(PBS);血清(serum)和支气管肺泡灌洗液(BALF)样本在疫苗接种后第3周采取;针对人副流感病毒3型的结合抗体滴度结果以lg表示,从左至右依次为血清总IgG、肺泡灌洗液总IgG和肺泡灌洗液总IgA;每个数据点代表两只小鼠的混合样本数据(包括支气管肺泡灌洗液、血清);统计学显著性采用单因素方差分析(ANOVA)并进行Tukey校正检验, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$ 。

Figure 10 Humoral immune responses induced by vaccination in mice. Mice ( $n=12$ ) in each group were immunized *via* intranasal inoculation with the vaccine, while control mice received a placebo (PBS); Serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were collected at three weeks post-vaccination; The titers of binding antibodies against the HPIV-3 virus are presented as lg values, showing from left to right: total IgG in serum, total IgG in BALF, and total IgA in BALF; Each data point represents pooled samples from two mice (including BALF and serum); Statistical significance was determined by one-way ANOVA with Tukey's correction test: \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$ .

的有利理化特性和相关参数评分表明其可能成为抗感染的有效候选疫苗。通过本研究的方法, 最佳人群的全球覆盖率已达到较高比例, 因此所设计的疫苗将成为极具潜力的竞争者。Ramachandran 图用于评估蛋白质构象的合理性, 它不考虑能量问题, 仅评估构象是否合理。同源建模后模型质量的评估显示, 落在允许区域和最大允许区域的氨基酸残基比例接近 90%, 进一步表明模型的构象合理。此外, 分子对接后肽疫苗显示出通过与有利受体 TLR3/TLR4 相互作用来抑制感染的潜力。疫苗模型可能作为配体, 通过 TLR3/TLR4 受体表面发生的重要相互作用发挥作用。此外, 还对疫苗-TLR3/TLR4 对接复合物进行了正态模式分析以确定其稳定性, 结果显示疫苗能够适应配体而不会发生剧烈波动, 显示出稳定的结合力。CAI 值和 G+C 含量用于评估疫苗开发过程的有效性。预测设计的疫苗在 *E. coli* K12 系统中表达良好。为控制呼吸道病毒感染, 感染部位的黏膜免疫应答(包括中和抗体、免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 G)至关重要<sup>[30]</sup>。免疫球蛋白 A 是黏膜免疫的标志性抗体, 它通过中和黏膜表面的病毒来阻止病毒进入宿主细胞, 从而建立第一道防御屏障<sup>[31]</sup>。在本研究中, 经 HPIV-3 疫苗免疫后除了能够诱导产生中和抗体 IgG 外, 黏膜免疫 IgA 也能够被激活, 由此弥补了现有疫苗在诱导黏膜免疫方面的不足。

本研究在疫苗设计方法上体现了多项技术创新。与传统依赖单一毒株序列的疫苗设计策略不同, 本研究采用共识序列法, 通过对大量临床分离株进行多序列比对, 获得代表多个 HPIV-3 流行株共同特征的保守序列, 从而在源头上增强疫苗的广谱性与交叉保护潜力。在表位筛选阶段, 本研究整合了多重免疫信息学工具, 系统评估表位的抗原性、免疫原性、毒性、致敏性及人群覆盖度, 实现了从海量候选表位中高效、精准地筛选最优组合, 显著提升了疫苗设计的理性化与可控性。此外, 本研究在疫

苗结构优化中引入了二硫键工程与正态模式分析, 从构象稳定性角度进一步优化疫苗蛋白, 其效果显著优于现有的免疫信息学研究。尽管免疫信息学方法在表位疫苗设计中已广泛应用, 但本研究在表位组合策略、连接子选择、受体对接广度(TLR3/4/7/8)以及动态稳定性评估等方面均有所突破, 体现了多维度、多层次的设计理念, 为复杂病原体的疫苗开发提供了更为系统的技术框架。

## 4 结论

本研究利用共识序列预测了结构蛋白中的潜在 T 细胞表位, 确保了抗原的广谱性和保守性。这种设计的广谱保护性疫苗具备显著的免疫原性优势、广泛的人群覆盖率, 以及能够有效激活 TLR3/4 和 TLR7/8 受体的能力, 从而诱导机体产生特异性的免疫保护。将这款候选疫苗与已上市的流感疫苗组成异源接种方案有望提升基础免疫所诱导的适应性免疫应答, 从而产生全面的免疫保护效果。

## 致谢

本研究得到了天津医科大学高性能计算平台的支持。

## 作者贡献声明

陈苓苓: 设计研究方案、撰写初稿; 李旻: 数据收集与监管; 曹赫男: 执行调研, 协助数据分析, 软件程序; 江晓: 协助数据分析, 软件程序; 聂嘉琪: 协助论文的最终修改; 贾书磊: 数据分析, 对论文进行审阅和修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] MAVKOWSKI P, SMITHGALL M, ZACHARIAH P, OBERHARDT M, VARGAS C, REED C, DEMMER RT,

- STOCKWELL MS, SAIMAN L. Seasonality and clinical impact of human parainfluenza viruses[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2018, 2(6): 706-716.
- [2] 邱陈晨, 李秀玲. 人3型副流感病毒疫苗研究进展[J]. *国际生物制品学杂志*, 2022, 45(6): 343-348.
- QIU CC, LI XL. Research progress of human parainfluenza virus type 3 vaccine[J]. *International Journal of Biologicals*, 2022, 45(6): 343-348 (in Chinese).
- [3] MOSCONA A. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(7): 1688-1698.
- [4] HENRICKSON KJ. Parainfluenza viruses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16(2): 242-264.
- [5] SHAO N, LIU B, XIAO Y, WANG X, REN L, DONG J, SUN L, ZHU Y, ZHANG T, YANG F. Genetic characteristics of human parainfluenza virus types 1-4 from patients with clinical respiratory tract infection in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 679246.
- [6] GREIFF DRL, PATTERSON-ROBERT A, BLYTH CC, GLASS K, MOORE HC. Epidemiology and seasonality of human parainfluenza serotypes 1-3 in Australian children[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2021, 15(5): 661-669.
- [7] OLIVARES F, SALINAS M, SOTO A, DABANCH J, FICA A. Encefalomiелitis aguda diseminada grave: Comunicaci3n de un caso asociado a infecci3n por virus parainfluenza 3[J]. *Revista Chilena de Infectologіa*, 2015, 32(4): 476-481.
- [8] 周杉杉, 毛乃颖, 姬奕昕, 张燕, 崔爱利, 许文波, 扈瑞平. 2017-2018年河南省漯河市儿童严重急性呼吸道感染病例中人副流感病毒3型基因特征分析[J]. *病毒学报*, 2019, 35(5): 730-740.
- ZHOU SS, MAO NY, JI YX, ZHANG Y, CUI AL, XU WB, HU RP. Genetic characterization of human parainfluenza virus type 3 among children with severe acute respiratory infections in Luohe, Henan Province, China, 2017-2018[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2019, 35(5): 730-740 (in Chinese).
- [9] LIU WK, CHEN DH, TAN WP, QIU SY, XU D, ZHANG L, GU SJ, ZHOU R, LIU Q. Paramyxoviruses respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and human metapneumovirus infection in pediatric hospitalized patients and climate correlation in a subtropical region of Southern China: a 7-year survey[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2019, 38(12): 2355-2364.
- [10] SCHMIDT AC, SCHAAP-NUTT A, BARTLETT EJ, SCHOMACKER H, BOONYARATANAKORNKIT J, KARRON RA, COLLINS PL. Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines[J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2011, 5(4): 515-526.
- [11] KOBAYASHI H, IWATSUKI-HORIMOTO K, KISO M, URAKI R, ICHIKO Y, TAKIMOTO T, KAWAOKA Y. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine[J]. *Vaccine*, 2013, 31(52): 6239-6246.
- [12] SLOBOD KS, ALLAN JE. Parainfluenza type 1 virus-infected cells are killed by both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cell precursors[J]. *Clinical And Experimental Immunology*, 1993, 93(3): 363-369.
- [13] de ZWART A, RIEZEBOS-BRILMAN A, LUNTER G, VONK J, GLANVILLE AR, GOTTLIEB J, PERMPALUNG N, KERSTJENS H, ALFFENAAR JW, VERSCHUUREN E. Respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus infections in lung transplant recipients: a systematic review of outcomes and treatment strategies[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2022, 74(12): 2252-2260.
- [14] TABATABAI J, SCHNITZLER P, PRIFERT C, SCHILLER M, WEISSBRICH B, von LILIENFELDT-OAL M, TESCHNER D, JORDAN K, MÜLLER-TIDOW C, EGERER G, GIESEN N. Parainfluenza virus infections in patients with hematological malignancies or stem cell transplantation: analysis of clinical characteristics, nosocomial transmission and viral shedding[J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0271756.
- [15] USTUN C, SLABY J, SHANLEY RM, VYDRA J, SMITH AR, WAGNER JE, WEISDORF DJ, YOUNG JA. Human parainfluenza virus infection after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, management, mortality, and changes over time[J]. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2012, 18(10): 1580-1588.
- [16] YANG XD, YU XL. An introduction to epitope prediction methods and software[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2009, 19(2): 77-96.
- [17] KANSE S, KHANDELWAL M, PANDEY RK, KHOKHAR M, DESAI N, KUMBHAR BV. Designing a multi-epitope subunit vaccine against VP1 major coat protein of JC polyomavirus[J]. *Vaccines*, 2023, 11(7): 1182.
- [18] GUAN PB, QI CY, XU GJ, SHENG C, SUN SQ, ZHOU ZC, JIA SL. Designing a T cell multi-epitope vaccine against hRSV with reverse vaccinology: an immunoinformatics approach[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2025, 251: 114599.
- [19] CRAIG DB, DOMBKOWSKI AA. Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 346.
- [20] FU HG, LIANG YB, ZHONG XQ, PAN ZL, HUANG L, ZHANG HL, XU Y, ZHOU W, LIU Z. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 17617.
- [21] AFROZ S, SAUL S, DAI J, SURMAN S, LIU XQ, PARK HS, Le NOUËN C, LINGEMANN M, DAHAL B, COLEMAN JR, MUELLER S, COLLINS PL, BUCHHOLZ UJ, MUNIR S. Human parainfluenza virus 3 vaccine candidates attenuated by codon-pair deoptimization are immunogenic and protective in hamsters[J]. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America, 2024, 121(25): e2316376121.
- [22] 庄敏, 李迪. 病毒嵌合疫苗的研究进展[J]. 国外医学(免疫学分册), 2004, 27(3): 137-141.  
ZHUANG M, LI D. Research progress on viral chimeric vaccines[J]. Foreign Medicine (Immunology Volume), 2004, 27(3): 137-141 (in Chinese).
- [23] ANTON-VAZQUEZ V, SMITH M, MEHRA V, AVENOSO D, KRISHNAMURTHY P, KULASEKARARAJ A, POTTER V, PAGLIUCA A, ZUCKERMAN M. Human parainfluenza virus type 3 infections in a haemato-oncology unit: social distancing measures needed in outpatient clinics[J]. Journal of Hospital Infection, 2021, 116: 60-68.
- [24] STEARNS K, LAMPE G, HANAN R, MARCINK T, NIEWIESK S, STERNBERG SH, GRENINGER AL, POROTTO M, MOSCONA A. Human parainfluenza virus 3 field strains undergo extracellular fusion protein cleavage to activate entry[J]. mBio, 2024, 15(11): e0232724.
- [25] McLAUGHLIN LP, LANG HL, WILLIAMS E, WRIGHT KE, POWELL A, CRUZ CR, COLBERG-POLEY AM, BARESE C, HANLEY PJ, BOLLARD CM, KELLER MD. Human parainfluenza virus-3 can be targeted by rapidly *ex vivo* expanded T lymphocytes[J]. Cytotherapy, 2016, 18(12): 1515-1524.
- [26] AGUAYO-HIRALDO PI, ARASARATNAM RJ, TZANNOU I, KUVALEKAR M, LULLA P, NAIK S, MARTINEZ CA, PIEDRA PA, VERA JF, LEEN AM. Characterizing the cellular immune response to parainfluenza virus 3[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 216(2): 153-161.
- [27] BONAM SR, PARTIDOS CD, HALMUTHUR SKM, MULLER S. An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2017, 38(9): 771-793.
- [28] SAMAD A, AHAMMAD F, NAIN Z, ALAM R, IMON RR, HASAN M, RAHMAN MS. Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2022, 40(1): 14-30.
- [29] KHATOON N, PANDEY RK, PRAJAPATI VK. Exploring *Leishmania* secretory proteins to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using immunoinformatics approach[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 8285.
- [30] KNISELY JM, BUYON LE, MANDT R, FARKAS R, BALASINGAM S, BOK K, BUCHHOLZ UJ, D'SOUZA MP, GORDON JL, KING DFL, LE TT, LEITNER WW, SEDER RA, TOGIAS A, TOLLEFSEN S, VAUGHN DW, WOLFE DN, TAYLOR KL, FAUCI AS. Mucosal vaccines for SARS-CoV-2: scientific gaps and opportunities-workshop report[J]. npj Vaccines, 2023, 8(1): 53.
- [31] CARSETTI R, QUINTI I. Editorial: IgA and mucosal immunity in vaccinology and in protection from infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 14: 1409111.