

HPV16 E7 抗原 CTL 表位拟肽设计及活性评价*

王娟^{1, 2)} 舒茂¹⁾ 林勇³⁾ 胡勇¹⁾ 韩英子¹⁾ 林治华^{1, 4)**}

⁽¹⁾ 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054;

⁽²⁾ 重庆大学生物工程学院, 生物材料与仿生工程中心, “生物流变科学与技术”教育部重点实验室, 重庆 400044;

⁽³⁾ 重庆理工大学化学化工学院, 重庆 400054; ⁽⁴⁾ 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044)

摘要 人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)早期基因 E7 是致癌的关键基因, 其表达在宫颈癌细胞癌变进程及维持癌细胞恶性表型方面发挥重要作用, 已成为宫颈癌治疗的理想靶标。目前, 基于 HPV16 E7 抗原细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)表位设计多肽疫苗是抗宫颈癌治疗发展的重要方向, 但天然 CTL 表位肽普遍存在体内半衰期短、激发 CTL 反应效果不佳等缺点。因此, 本研究基于前期 HPV16 E7 抗原 CTL 表位鉴定的基础, 结合多肽酶解实验结果, 进行分子动力学模拟及结合自由能计算, 初步筛选了 3 条表位模拟肽。人工合成相关待测表位肽, 并利用 T2 细胞株测定各肽与 HLA-A2 分子的结合力。研究结果表明, 3 条表位模拟肽体外抗酶解能力较天然 HPV16 E7 抗原 CTL 表位肽均有提高, 以(d)RAHYNIVTF 表位模拟肽的效果最为明显。此外, (d)RAHYNIVTF 表位模拟肽与 HLA-A2 分子的结合力也有所提高(荧光系数为 2.06)。以上结果表明, 基于 HPV16 E7 抗原 CTL 表位模拟肽进行结构修饰有望为宫颈癌治疗性疫苗的设计奠定基础。

关键词 人乳头瘤病毒, CTL 表位, 结构修饰

学科分类号 R392, Q51

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0172

宫颈癌是引起妇女死亡的第二大病因, 每年全球范围约有 51 万新发现患者, 约 20 万死亡。在中国, 每年约有 13.5 万人被确诊为宫颈癌, 占全球发病人数的 1/3^[1-2]。大量研究证实人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是宫颈癌致病的首要因素^[3]。目前被发现的 HPV 亚型约有 120 种, 其中大部分已完成了分类和测序^[4-5]。根据 HPV 病毒危险程度, 可分为低危型(LR-HPV)和高危型(HP-HPV)。前者包括 HPV6、11、40、42、43、70 等, 可引起常见的皮肤黏膜病变和生殖器疣^[6]; 后者包括 HPV13、16、18、19、52、58 等, 可引起宫颈癌、阴道癌、头颈癌、肛门癌等^[7-8]。在众多 HPV 亚型中, HPV16 亚型约与 70% 以上的宫颈癌密切相关。HPV 早期转录区(E 区)主要编码 E1~E7 早期蛋白, 涉及病毒 DNA 复制、转录、翻译和有关细胞转化等^[9]。E7 作为重要的细胞转化蛋白, 是致癌的关键基因, 其在 HPV 相关疾病发生发展中发挥重要作用, 已成为 HPV 感染相关疾病免疫治疗理想靶标^[10-11]。

自 20 世纪 70 年代 Castle, Mizuuchi 等^[12-13]从宫

颈癌标本中发现 HPV DNA 以来, 人们对 HPV 疫苗的研究已取得巨大进展。基于 HPV16 E7 靶抗原 DNA 疫苗^[12, 14]、病毒样颗粒疫苗(virus-like particle vaccines, VLPs)^[15]、树突状细胞(dendritic cells, DC)疫苗^[16]以及基于 CTL 表位多肽疫苗^[17]是在体激活抗 HPV 感染 CTL 应答较为有效的形式。其中, 基于 CTL 表位肽多肽疫苗, 它作为完整抗原一部分, 不具备传染疾病危险性, 并可大量合成生产, 已成为未来抗病毒感染及肿瘤疫苗发展重要方向之一。目前, 国内外许多实验室已开展了 CTL 表位鉴定及基于 CTL 表位多肽疫苗设计工作^[18-21]。而基于 HPV16 E7 抗原 CTL 表位肽设计抗 HPV 感染的多肽疫苗, 也将有望成为最为理想的抗 HPV 感染疫苗形式。本研究在前期发现 HPV16 型 E7 抗原

* 国家自然科学基金(81171508, 31170747), 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC 2013 JJB10004)和重庆市教委科技项目(KJ130809, KJ1400946)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 023-68667306, E-mail: zhlin@cqut.edu.cn

收稿日期: 2015-06-10, 接受日期: 2015-09-22

第 49~57 位氨基酸所构成九肽(RAHYNIVTF)是其 HLA-A2 限制性 CTL 表位. 体内外免疫学效应实验表明: 该天然 CTL 表位肽虽然在一定程度上能激发抗 HPV 免疫应答, 但效果欠理想. 究其原因可能是: 该天然 HPV16 型 E7 抗原 CTL 表位肽 RAHYNIVTF 与 HLA-A2 分子的亲和力不够高^[22-23]; 且天然 CTL 表位肽在体内易被多种肽酶降解、半衰期短, 使其在体内激发 CTL 反应效果并不理想^[24-25]. 为此, 本研究拟在前期 HPV16 E7 抗原 CTL 表位鉴定基础上, 选择恰当的非天然氨基酸对天然 CTL 表位肽特定位置的氨基酸进行改造, 借助 AMBER 分子模拟软件进行分子动力学和结合自由能计算, 通过计算得到结合自由能来筛选高亲和性、高特异性非天然氨基酸 HPV16 型 E7 抗原 CTL 模拟表位. 采用固相合成技术合成 CTL 表位肽模拟物, 进行体外亲和性实验、模拟表位肽在血浆中稳定性实验, 为进一步探讨以 HPV16 型 E7 抗原为靶标基于 CTL 模拟表位疫苗设计奠定基础.

1 材料与方法

1.1 蛋白质序列

HLA-A2 晶体结构从 PDB(Protein Data Bank at Brookhaven National Laboratories) 结构数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)中获取, 编号为 3TO2.

1.2 表位模拟肽的设计与分子动力学模拟

本研究使用 sybyl 2.1 的 biochem 模块进行氨基酸突变, 搭建天然表位肽及表位模拟肽, 并获取抗原肽和晶体蛋白复合物. 选用 Amber 11.0 进行分子动力学模拟, 具体步骤如下: 先优化体系, 再对体系升温, 最后在平衡状态模拟一段时间. 优化体系大致分成 3 步: 先限制蛋白质结构, 只优化抗原肽和水分子; 再限制蛋白质骨架, 优化蛋白质侧链, 抗原肽和水分子; 最后不加任何限制, 优化整个体系. 整个过程使用 Tleap 程序为复合物加氢, 复合物加入 10 Å 边界的 TIP3PBOX 水分子, 并加入抗衡离子. 最终加入了 8 个 Na⁺ 保持体系的电中性. 在本研究中 Amber 的标准力场 ff99SB 力场被用于定义蛋白质受体的分子参数, PME (particle meshewald) 方法计算体系间静电相互作用. 采用最陡下降法 (steepest descent) 和共轭梯度法 (conjugate-gradient) 进行能量最小化, 其目的是去除由于加水后的不合理分布, 使分子体系中的分子碰撞几率减少到最低. 优化完成后, 将温度从 0 K 升到 300 K 并维持 300 K 进行 8 ns 的动力学模拟,

模拟步长设为 2 fs, 每隔 2 ps 进行一次取样, 取能量稳定阶段平均构象作为复合物最终构象. 随后对最终构象采用 MM-PBSA 方法计算晶体蛋白(受体)与天然表位肽或模拟表位肽(配体)之间的结合自由能(ΔG).

1.3 多肽的合成、纯化、分析及鉴定

本实验所选用多肽均采用标准 Fmoc 方案, 在上海紫域多肽合成公司合成、纯化、分析及鉴定. 合成多肽冻干粉, 以 1 g/L 浓度溶于超纯水中, 置于 -70℃ 保存备用.

1.4 天然表位肽及表位模拟肽在血浆中稳定性实验

将 25% 人血浆置于 37℃ 活化 30 min. 随后在 50 μ l 天然表位肽及表位模拟肽溶液(浓度为 1 g/L)中各加 250 μ l 活化后的血浆, 并于指定时间加入 500 μ l TFA(终浓度为 1%)终止反应. 置于 4℃ 放置 30 min 后, 12 000 r/min 离心 30 min, 取其上清. 用 LC/MS/MS(ESI: 135 V, Analyst1.4)及 RP-HPLC (均进样 10 μ l, 流动相 A: 0.1% TFA 乙腈, 流动相 B: 0.1% TFA 三蒸水. 流动相流速: 0.4 ml/min, 检测波长: 220 nm)进行分析.

1.5 细胞株及单克隆抗体

TAP 缺陷 T2 细胞系由第三军医大学万瑛教授惠赠, T2 细胞培养于含 10% 胎牛血清(FBS 购于 Hyclone 公司)的 1640 培养基(购于 Hyclone 公司)中, 培养条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度, 每隔 2~3 天传代 1 次. FITC 标记的抗人 HLA-A2 BB7.2 抗体, 购于 BD 公司.

1.6 表位模拟肽与 HLA-A2 的亲和力分析

待测表位肽只有在能与 HLA-A2 稳定结合情况下, 才能被视为免疫治疗有效的潜在抗原. 为此, 选用亲和力实验来评估上述表位模拟肽. 简述如下: a. T2 细胞多肽处理. T2 细胞经 PBS 洗涤 2 次后, 以 1×10^5 /孔接种于 24 孔板中, 以 100 mg/L 浓度加入各表位模拟肽及天然表位肽. 各孔中加入 3 μ l (1 mg/L) β 2 微球蛋白, 将 T2 细胞于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 18 h 后, 收集细胞作流式细胞术检测. b. T2 细胞表面 HLA-A2 分子表达的流式细胞术检测. 将与多肽共同孵育 18 h 后的 T2 细胞 1 000 r/min、5 min 离心, 收集细胞并用 PBS 洗涤. 同样条件离心后, 用 PBS 重悬细胞. 在细胞沉淀中加入 2 μ l FITC 标记的 BB7.2 来源抗人 HLA-A2 抗体溶液, 4℃ 避光孵育 30 min, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次后, 在流式细胞仪上检测平均荧光强度(mean florescence intensity, MFI). 结果以

荧光指数(florescence index, *FI*)作为衡量指标, 计算公式如下:

荧光指数(*FI*)=
$$\frac{\text{样本 } MFI - \text{背景 } MFI}{\text{背景 } MFI}$$

FI>1.5 视为多肽与 HLA-A2 分子的高结合力, 1.0<*FI*<1.5 则为中等结合力, 0.5<*FI*<1.0 为低结合力.

1.7 统计学分析

数据统计分析采用单因素方差分析检验, *P*<0.05 具有统计学意义, 利用 SPSS13.0 软件完成.

2 结果与讨论

2.1 分子动力学模拟结果

本研究通过分子动力学模拟天然表位肽及表位模拟肽与 HLA-A2 分子结合, 并通过计算结合自由能来考察复合物结合状态. 天然表位肽及各模拟肽均能很好地结合到抗原结合槽中, 且每个复合物均能很快达到能量平衡和稳定(图 1, 2). 分析天然

表位肽及各模拟肽与 HLA-A2 分子最终构象, 分别计算受体与配体间氢键数目、锚定残基(P2, P9)距离, 结果见表 1. 从图 2 中可看出, 天然表位肽在与 HLA-A2 结合时, 其两端深深地嵌入到结合口袋中, 并形成 8 个氢键: 在 N 端主要与 Glu63、Tyr99、Tyr159 等残基形成氢键, 落在 A 结合口袋中, 而在 C 端则主要与 His70、Thr73 残基形成氢键, 其与 Trp147 残基所形成氢键符合 F 口袋结合规律. 天然表位肽锚定残基间距离为 20.62Å, 结合自由能为-51.18 KJ/mol, 说明该体系已达到稳定状态, 表位肽与受体结合较为合理. 在 3 条模拟肽中, 每条模拟肽的 N 端均与 Glu63 中的羧基形成氢键, 表明 Glu63 残基在抗原结合槽部位发挥着重要作用. 3 条模拟表位锚定残基间距离除(d)RAH(d)YNIVTF 之外均在 20Å 左右, 基本符合 HLA-A2 分子与抗原肽结合规律.

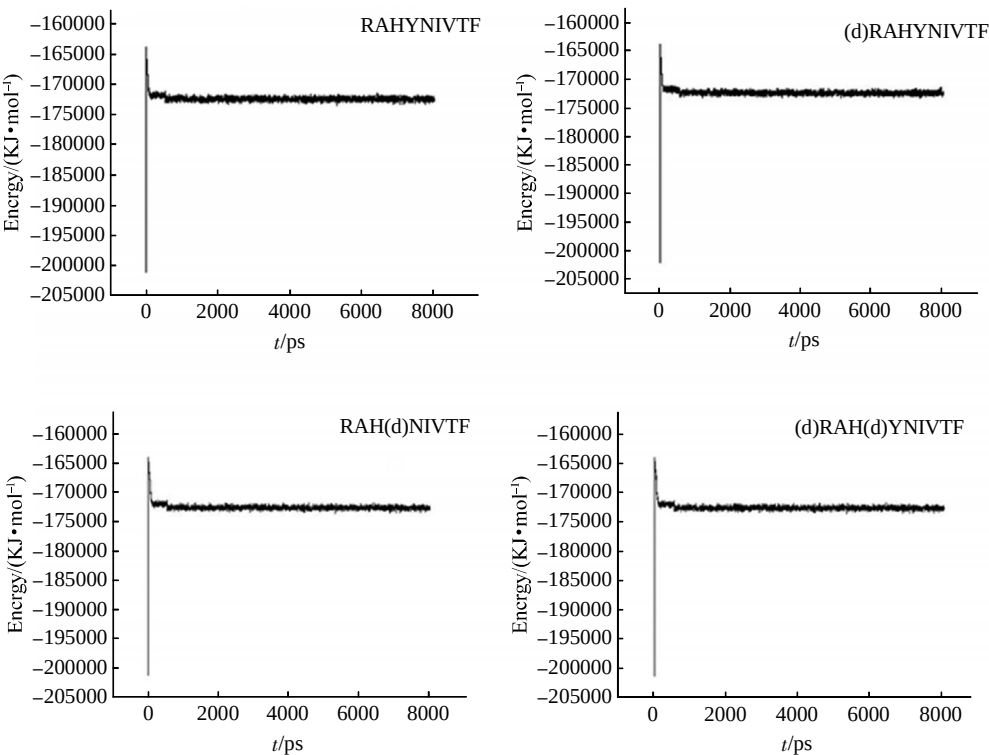


Fig. 1 Dynamics simulations of epitope peptides energy versus time

Table 1 Characteristics of candidate epitope bound to the modeled HLA-A2 molecule

No.	Peptide	Distance/Å	H-bond number	Δ <i>G</i> /(KJ·mol ⁻¹)
1	RAHYNIVTF	20.62	8	-51.18
2	(d)RAHYNIVTF	20.46	5	-44.59
3	RAH(d)NIVTF	19.58	10	-58.15
4	(d)RAH(d)YNIVTF	22.10	6	-60.96

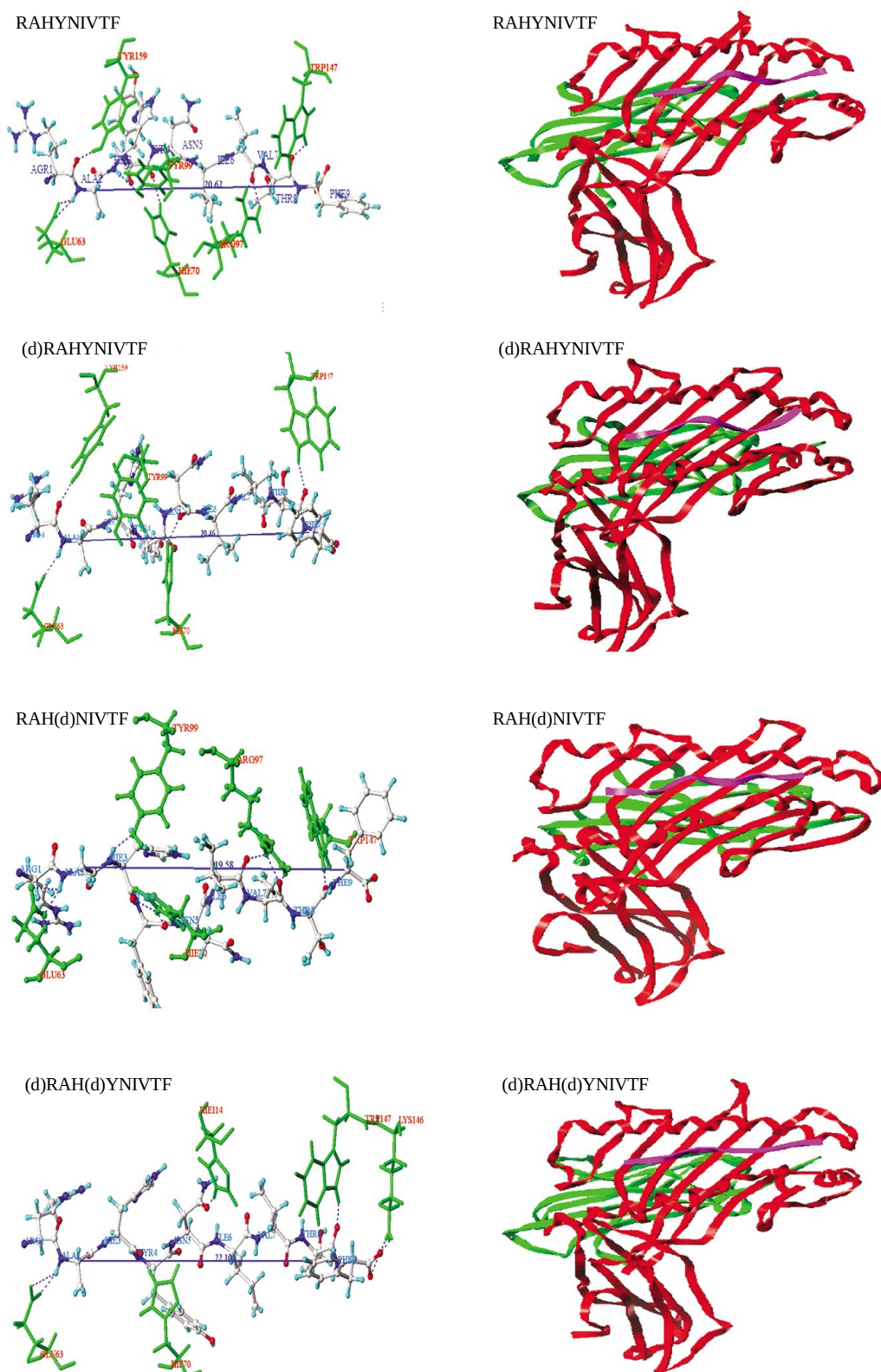


Fig. 2 Computer models depicting the association of each candidate epitope peptide with the HLA-A2 molecule

Left: Average conformation of epitope peptide determined by molecular dynamics simulation. Right: The binding models for epitope peptide and HLA-A2. Red double helix as epitope peptides' binding site, purple as epitope peptides' secondary structure.

2.2 表位肽的纯化和质谱鉴定结果

高纯度多肽是后续研究基础. 本研究所选用的多肽利用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析其纯度并使用质谱测定相关分子质量. 鉴定结果表明: 多肽纯度均大于 95%, 相对分子质量测定值与理论值基本相符, 可确定所合成多肽即为高纯度目的肽(谱图见图 S1, S3~S5), 可供后续实验使用.

2.3 天然表位肽及表位模拟肽在血浆中的稳定性

分别对天然表位肽及表位模拟肽进行体外稳定性研究, 结果如图 3 所示. 在 0 min 时, 所检测到化合物只含一个单峰, 为天然表位肽高纯品(纯度 >95%), 其相对分子质量为 1 119.3. 质谱结果

(图 S2)显示, 质荷比(m/z)为 561.0($M+2$). 天然表位肽在血浆中极不稳定, 其体外半衰期介于 2~4 min, 在 16 min 以后, 可观察到该表位肽被水解. 其断裂位置为 4 位与 5 位之间, 即 RAHY-NIVTF. 在各表位模拟肽中(图 4), (d)RAHYNIVTF 模拟肽的抗酶解能力最强, 体外半衰期超过了 1 h. RAHY(d)NIVTF 模拟肽与天然表位肽相比, 其体外半衰期约提高了 4 倍(> 8 min), 但与(d)RAHYNIVTF 模拟肽相比, 其抗酶解能力仍相对较弱. 双突变(d)RAH(d)YNIVTF 模拟肽体外半衰期超过了 30 min.

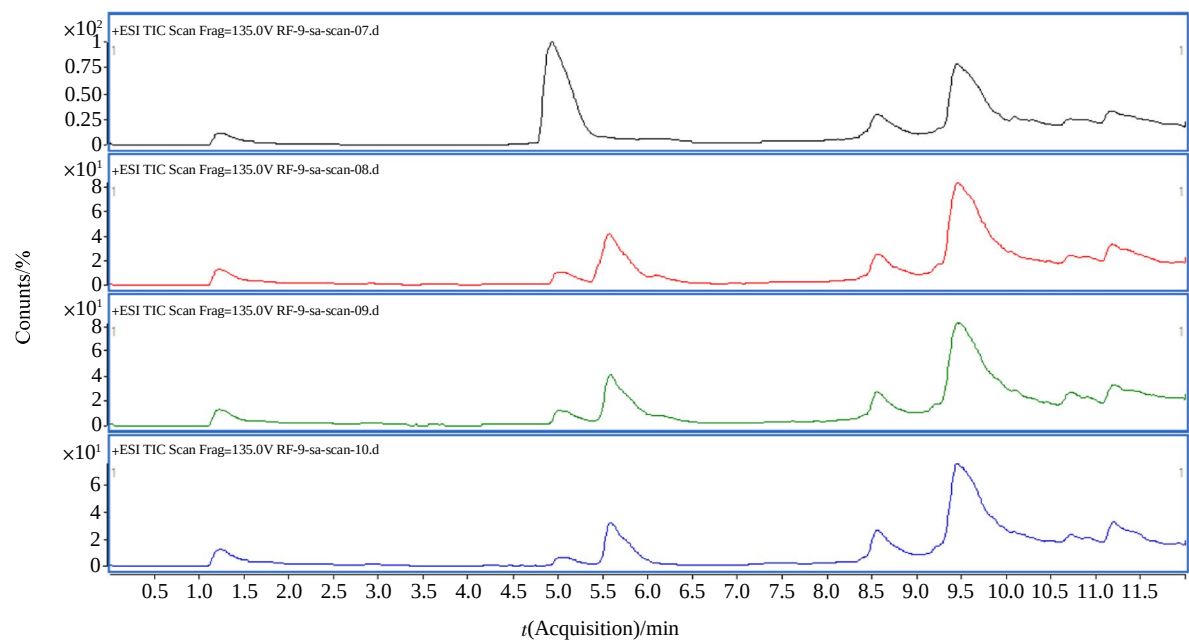


Fig. 3 The total ion chromatogram of the native epitope peptide RAHYNIVTF reaction in plasma at different times (0, 15, 30, 60 min)

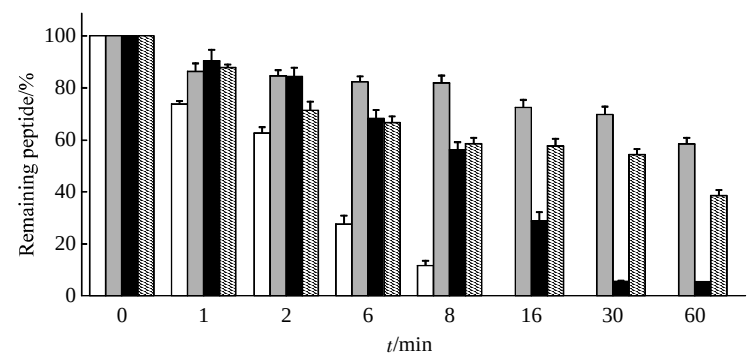


Fig. 4 The residual amount of epitope peptide in plasma at different time
□: RAHYNIVTF; ■: (d)RAHYNIVTF; ■: RAHY(d)NIVTF; ▨: (d)RAH(d)YNIVTF.

2.4 表位模拟肽与 HLA-A2 分子亲和力分析结果

选用流式细胞术检测天然表位肽及表位模拟肽与 HLA-A2 分子的结合情况, 每组均设置 3 个复孔. 亲和力分析流式结果见图 5, 各肽与 HLA-A2 分子结合荧光强度比较见图 6, 三次结果平均活性值列于表 2. 结果显示: 天然表位肽可使 T2 细胞表面 HLA-A2 分子表达上调, 换算成荧光系数(*FI*)

表示, 其 *FI* 值为 1.14, 符合中等亲和力条件. (d)RAHYNIVTF 模拟肽 *FI* 值为 2.06, 远高于天然表位肽的结合能力. 说明该肽可以很好地和 T2 细胞表面的空载 HLA-A2 分子结合, 使其表达量明显上升. 而本研究所设计的另外两条表位模拟肽则与 HLA-A2 呈低结合力.

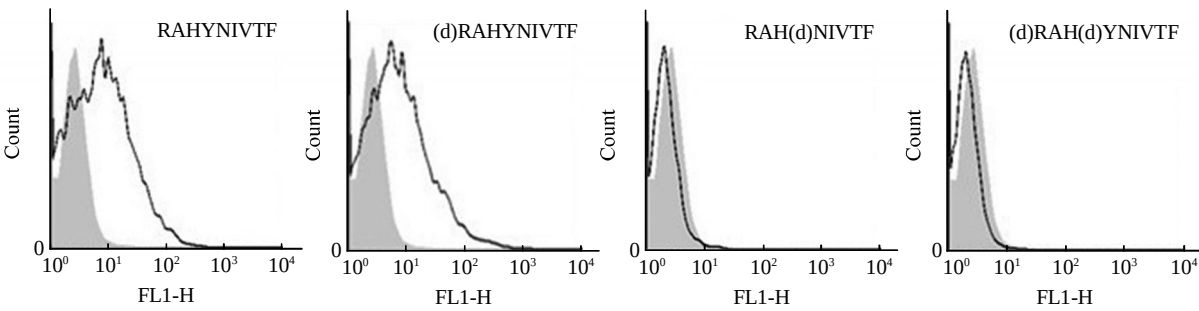


Fig. 5 FACS analysis of HLA-A2 expression on T2 cells induced by individual peptides

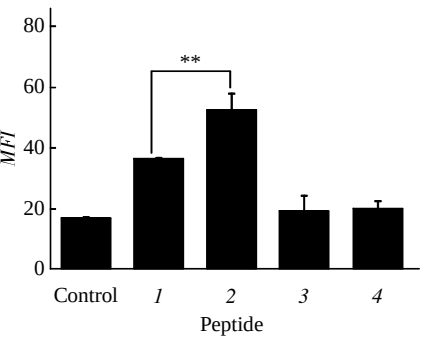


Fig. 6 Mean florescence intensity of individual peptide bind with HLA-A2

Data were expressed as the mean $\pm$ SD from three independent experiments (***P* < 0.01). 1: RAHYNIVTF; 2: (d)RAHYNIVTF; 3: RAHY(d)NIVTF; 4: (d)RAH(d)YNIVTF.

Table 2 HLA-A2 binding affinity to each candidate epitope peptide

No.	Peptide	<i>MFI</i>	<i>FI</i>
Control	—	17.16 $\pm$ 0.15	—
1	RAHYNIVTF	36.64 $\pm$ 0.17	1.14
2	(d)RAHYNIVTF	52.53 $\pm$ 5.33	2.06
3	RAHY(d)NIVTF	19.59 $\pm$ 5.12	0.14
4	(d)RAH(d)YNIVTF	20.27 $\pm$ 2.37	0.18

3 讨 论

自 20 世纪 90 年代首次鉴别出 E7 49-57 (RAHYNIVTF)为 CTL 表位肽^[12], 现已有诸多研究证实该表位作为抗原靶标有效性. Harro, Chen 等^[18,26]从 HVP16 E7 感染细胞株中发现了 E7 49-57 肽, 并证实 HPV16 在感染细胞后可表达病毒相关蛋白, 可将有效抗原肽 E7 49-57 提呈于细胞表面. 研究者在探讨该天然 CTL 表位肽在体内外免疫学效应时发现, 此表位肽虽能在一定程度上激发抗 HPV 免疫应答, 但效果欠佳. 其原因主要是: 该天然 HVP16 E7 抗原 CTL 表位肽 RAHYNIVTF 与 HLA-A2 分子亲和力不高, 且在体内易被肽酶降解、半衰期短, 故在体内激发 CTL 反应效果欠佳^[27-28]. 目前, 关于 CTL 模拟表位的筛选主要采取氨基酸替换技术或用组合肽库方法^[29-30], 但由于筛选到的仍是天然表位多肽, 不能从根本上克服天然 CTL 表位肽易被肽酶水解而造成其在体内半衰期短的问题, 故难以筛选到理想的 CTL 模拟表位. Parker 等^[31]曾尝试用多聚 N- 乙酰胺代替肽骨架, 研究 CTL 表位非肽模拟物(non-peptide mimetics)在体内激发 CTL 反应的能力. 尽管所筛选到的非肽模拟物体内半衰期大大提高, 但其在体内激发 CTL 反应的能力却不如原天然 CTL 表位, 这可能

是由于刚性改造所获得的非肽模拟物免疫原性降低所致。也有人尝试对特定位点氨基酸进行修饰(如甲基化、糖基化等)来筛选 CTL 模拟表位^[32-33], 但由于没有深入研究 CTL 表位与 MHC I 类分子相互作用并被 T 细胞受体(TCR)识别的结构基础, 这种结构改造具有一定局限性, 难以筛选到有效的高亲和性 CTL 模拟表位, 这也是目前国内外有关 CTL 模拟表位筛选普遍存在的问题。基于上述问题, 本研究通过对天然表位肽 RAHYNIVTF 的结构及血浆实验结果分析, 确定 1 位点和 4 位点为表位肽易水解部位。在使用非天然氨基酸对 1 位点和 4 位点进行改造后, 发现表位肽体外稳定性有所提高, 其中以(d)RAHYNIVTF 最为明显, 体外半衰期超过了 1 h。此外, 进一步研究发现, 该表位模拟肽能与 HLA-A2 分子有效地结合, 且达到高亲和力和标准, 荧光系数 *FI* 值为 2.06, 远高于天然表位肽的结合能力。说明本研究所采用的思路, 运用非天然氨基酸对生物活性肽进行化学修饰, 研究其构效关系, 有助于进一步发展高效的肽类似物, 必将成为多肽化学研究的重要手段和方向之一, 为宫颈癌治疗性疫苗的设计奠定基础。

附件 图 S1~S5, 表 S1 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Julius J M, Ramondeta L, Tipton K A, *et al.* Clinical perspectives on the role of the human papillomavirus vaccine in the prevention of cancer. *Pharmacotherapy*, 2011, **31**(3): 280-297
- [2] Ramakrishnan S, Patricia S, Mathan G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, **70**: 103-110
- [3] Jo V Y, Mills S E, Stoler M H, *et al.* Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: frequent association with human papillomavirus infection and invasive carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2009, **33**(11): 1720-1724
- [4] Kahn J A, Hillard P A. Human papillomavirus and cervical cytology in adolescents. *Adolescent Medicine Clinics*, 2004, **15**(2): 301-321
- [5] Yao Y, Huang W, Yang X, *et al.* HPV-16 E6 and E7 protein T cell epitopes prediction analysis based on distributions of HLA-A loci across populations: an in silico approach. *Vaccine*, 2013, **31**(18): 2289-2294
- [6] Moscicki A B. HPV Vaccines: today and in the Future. *The Journal of Adolescent Health: Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*, 2008, **43**(4 Suppl): S26-40
- [7] Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, *et al.* A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(12): 3812-3815
- [8] Baez-Astua A, Herraiz-Hernandez E, Garbi N, *et al.* Low-dose adenovirus vaccine encoding chimeric hepatitis B virus surface antigen-human papillomavirus type 16 E7 proteins induces enhanced E7-specific antibody and cytotoxic T-cell responses. *Journal of Virology*, 2005, **79**(20): 12807-12817
- [9] Chung C H, Gillison M L. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2009, **15**(22): 6758-6762
- [10] Castle P E, Schiffman M, Wheeler C M, *et al.* Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2010, **19**(7): 1675-1681
- [11] Song L, Yang M C, Knoff J, *et al.* Cancer immunotherapy using a potent immunodominant CTL epitope. *Vaccine*, 2014, **32** (46): 6039-6048
- [12] Castle P E, Shaber R, Lamere B J, *et al.* Human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical precancer and cancer at Kaiser Permanente Northern California. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2011, **20**(5): 946-953
- [13] Mizuuchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, *et al.* Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Experimental and Molecular Pathology*, 2012, **92**(1): 185-190
- [14] Bahrami A A, Ghaemi A, Tabarraei A, *et al.* DNA vaccine encoding HPV-16 E7 with mutation in L-Y-C-Y-E pRb-binding motif induces potent anti-tumor responses in mice. *Journal of Virological Methods*, 2014, **206**: 12-18
- [15] Porras C, Rodriguez A C, Hildesheim A, *et al.* Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2009, **18**(3): 863-865
- [16] Bristol J A, Schlom J, Abrams S I. Development of a murine mutant Ras CD8+ CTL peptide epitope variant that possesses enhanced MHC class I binding and immunogenic properties. *Journal of Immunology*, 1998, **160**(5): 2433-2441
- [17] Middleton K, Peh W, Southern S, *et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of Virology*, 2003, **77**(19): 10186-10201
- [18] Harro C D, Pang Y Y, Roden R B, *et al.* Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001,

- 93(4): 284–292
- [19] Pinto L A, Edwards J, Castle P E, *et al.* Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, **188**(2): 327–338
- [20] Fujie T, Tahara K, Tanaka F, *et al.* A MAGE-1-encoded HLA-A24-binding synthetic peptide induces specific anti-tumor cytotoxic T lymphocytes. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer*, 1999, **80**(2): 169–172
- [21] Tanaka F, Fujie T, Tahara K, *et al.* Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24. *Cancer Research*, 1997, **57**(20): 4465–4468
- [22] Huang Y H, Wu J C, Peng W L, *et al.* Generation of cytotoxicity against hepatitis delta virus genotypes and quasispecies by epitope modification. *Journal of Hepatology*, 2009, **50**(4): 779–788
- [23] Tang Y, Lin Z, Ni B, *et al.* An altered peptide ligand for naive cytotoxic T lymphocyte epitope of TRP-2 (180-188) enhanced immunogenicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 2007, **56**(3): 319–329
- [24] Rosenberg S A, Yang J C, Schwartzentruber D J, *et al.* Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine*, 1998, **4**(3): 321–327
- [25] Kawana K, Adachi K, Kojima S, *et al.* Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*, 2014, **32**(47): 6233–6239
- [26] Chen S, Ou R, Tang J, *et al.* Enhanced anti-tumor effects of HPV16E7 (49-57)-based vaccine by combined immunization with poly(I:C) and oxygen-regulated protein 150. *Cancer Epidemiology*, 2013, **37**(2): 172–178
- [27] Manici S, Sturniolo T, Imro M A, *et al.* Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, **189**(5): 871–876
- [28] Daemi A, Bolhassani A, Rafati S, *et al.* Different domains of glycoprotein 96 influence HPV16 E7 DNA vaccine potency *via* electroporation mediated delivery in tumor mice model. *Immunology Letters*, 2012, **148**(2): 117–125
- [29] Matsumoto H, Rogi T, Yamashiro K, *et al.* Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 2000, **267** (1): 46–52
- [30] McKeage K, Romanowski B. AS04-adjuvanted human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 vaccine (Cervarix (R)): a review of its use in the prevention of premalignant cervical lesions and cervical cancer causally related to certain oncogenic HPV types. *Drugs*, 2011, **71**(4): 465–488
- [31] Parker K C, Bednarek M A, Coligan J E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *Journal of Immunology*, 1994, **152**(1): 163–175
- [32] Spearman P, Kalams S, Elizaga M, *et al.* Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial. *Vaccine*, 2009, **27**(2): 243–249
- [33] Tourdot S, Oukka M, Manuguerra J C, *et al.* Chimeric peptides: a new approach to enhancing the immunogenicity of peptides with low MHC class I affinity: application in antiviral vaccination. *Journal of Immunology*, 1997, **159**(5): 2391–2398

HPV16 E7 CTL Epitope Antigen Peptide Design and Activity Evaluation*

WANG Juan^{1,2)}, SHU Mao¹⁾, LIN Yong³⁾, HU Yong¹⁾, HAN Ying-Zi¹⁾, LIN Zhi-Hua^{1,4)**}

¹⁾ School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

²⁾ Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Ministry of Education), Research Center of Bioinspired Material Science and Engineering, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

³⁾ School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

⁴⁾ College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Human papillomavirus E7 gene is the key to cancer, which expressed in most HPV-contains cervical cancers. E7 plays an important role in the induction and maintenance of cellular transformation, and it was regarded as the ideal target in cervical cancer treatment. An important development direction of cervical cancer therapy is based on HPV16 E7 antigen CTL epitope peptide vaccine design, but Short half-life *in vivo* and poor stimulation effect are the major therapeutic obstacles for native CTL epitope peptide. In this study, three epitope peptides were screened by molecular dynamics simulations with MM-PBSA method, associated with previous research results and polypeptide enzymolysis experiment. These predicted peptides were synthesized, examining the affinity between HLA-A2 molecule and each peptide by T2 cell line. The result showed synthesized peptides had a great improvement on enzyme-resistant ability comparing with natural HPV16 E7 CTL epitope antigen peptide, and (d)RAHYNIVTF was the most obvious epitope peptide. Meanwhile, the affinity was improved between (d)RAHYNIVTF and HLA-A2 (fluorescence indexes was 2.06). The method of structural modification in this study is expected to lay the foundation for cervical cancer therapeutic vaccine design.

Key words human papillomavirus, CTL epitope, structural modification

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0172

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81171508, 31170747), Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2013 JJB10004), Science and Technology project of Chongqing Education Commission (KJ130809, KJ1400946).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68667306, E-mail: zhlin@cqut.edu.cn

Received: June 10, 2015 Accepted: September 22, 2015

附录

(a)

HPLC Analysis Report

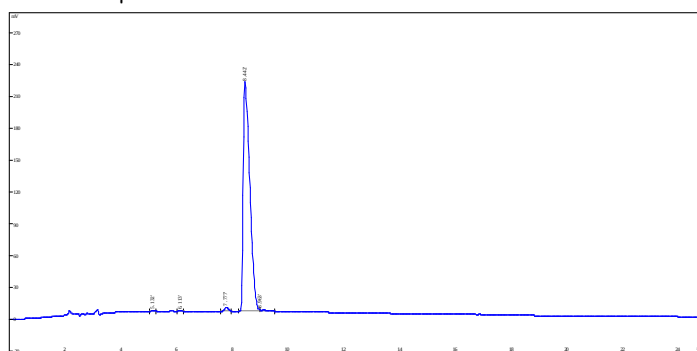
Structure : RF-9
Number : 0200056
Column : Symmetrix ODS-R, 4.6*250 mm, 5 µm
Solvent A : 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile
Solvent B : 0.1% trifluoroacetic in 100% water
Gradient :

	A	B
0.01 min	22%	78%
25 min	47%	53%
25.1 min	100%	0%
30.0 min	STOP	

Flow rate : 1.0 ml/min

Wavelength : 220 nm

Volume: 10 μ l



Peak No.	Ret Time	Conc.	Area	Height
1	5.132	0.1186	4188	639
2	6.113	0.1051	3712	581
3	7.777	0.9235	32605	3526
4	8.442	98.28	3469795	216829
5	8.963	0.5786	20428	1134
Total		100	3530728	222709

(b)

MS Analysis Report

26-Dec-2011
08:59:23
P111220-XP051582 MW:1120.29
111226-RF-9 9 (0.751)

Probe: ESI Capillary: 3.00KV
Cone: 50v Extractor: 5v
Desolvation Temp: 350 Gas Flow: 350
Scan ES+
3.48e7

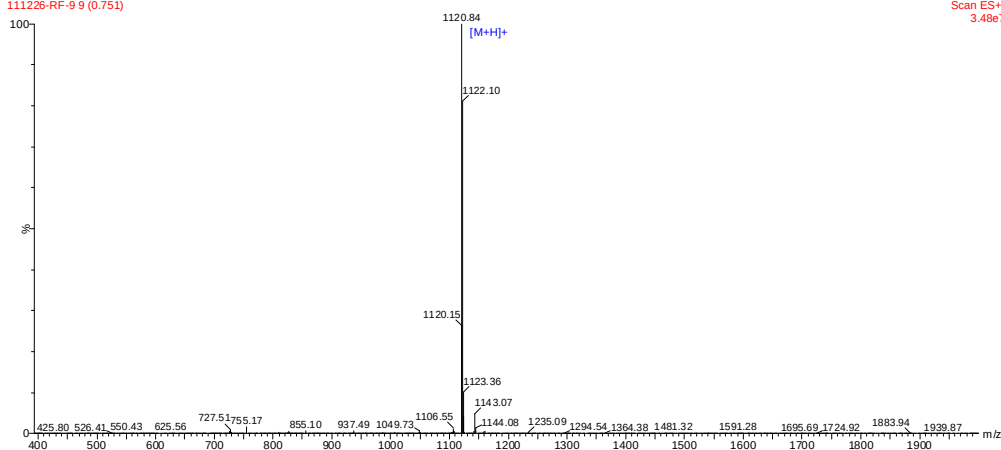


Fig. S1 Purity analysis and MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptide

(a) Purity analysis of RAHYNIVTF antigen peptide (b) MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptide.

Table S1 Basic information of synthetic peptide				
No.	Peptide	Main peak retention time/min	Purity/%	m/u
1	RAHYNIVTF	12.18	95.09	1119.5
2	(d)RAHYNIVTF	13.24	95.39	1119.5
3	RAHY(d)NIVTF	11.72	98.91	1119.5
4	(d)RAH(d)YNIVTF	11.95	99.70	1119.5

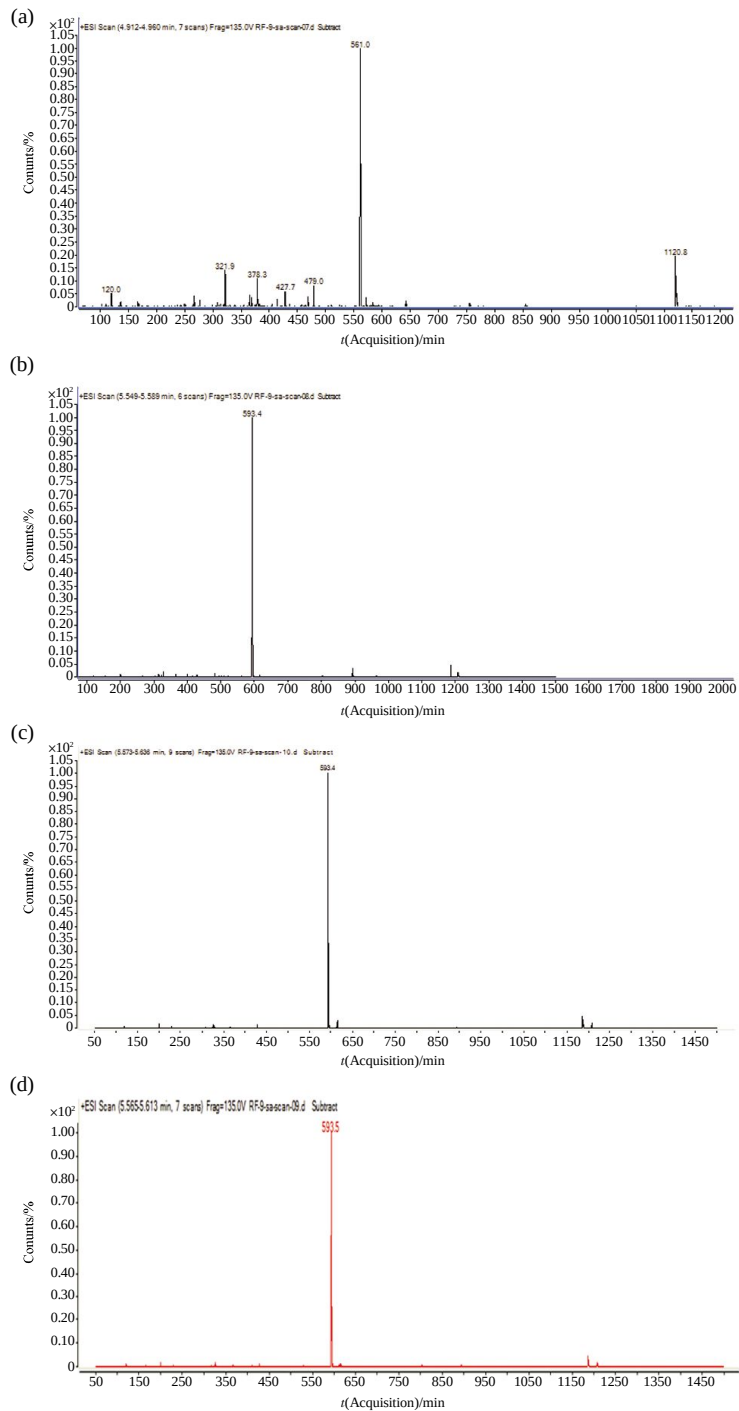
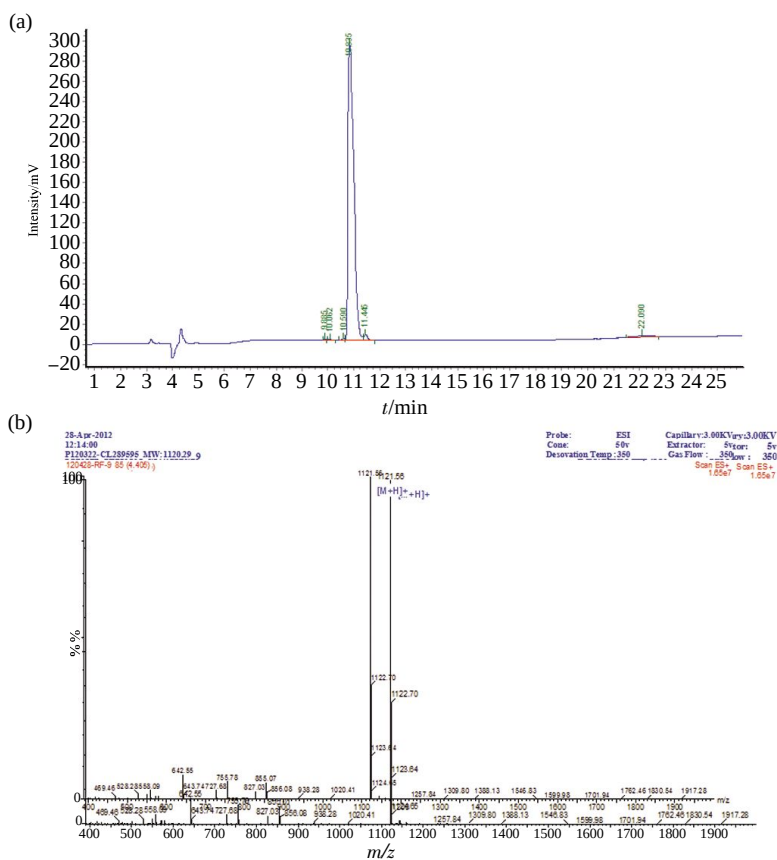


Fig. S2 MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptides in the blood plasma
(a) The MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptides in the blood plasma at 0 min. (b) The MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptides in the blood plasma after 15 min. (c) The MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptides in the blood plasma after 30 min. (d) The MS analysis of RAHYNIVTF antigen peptides in the blood plasma after 60 min.



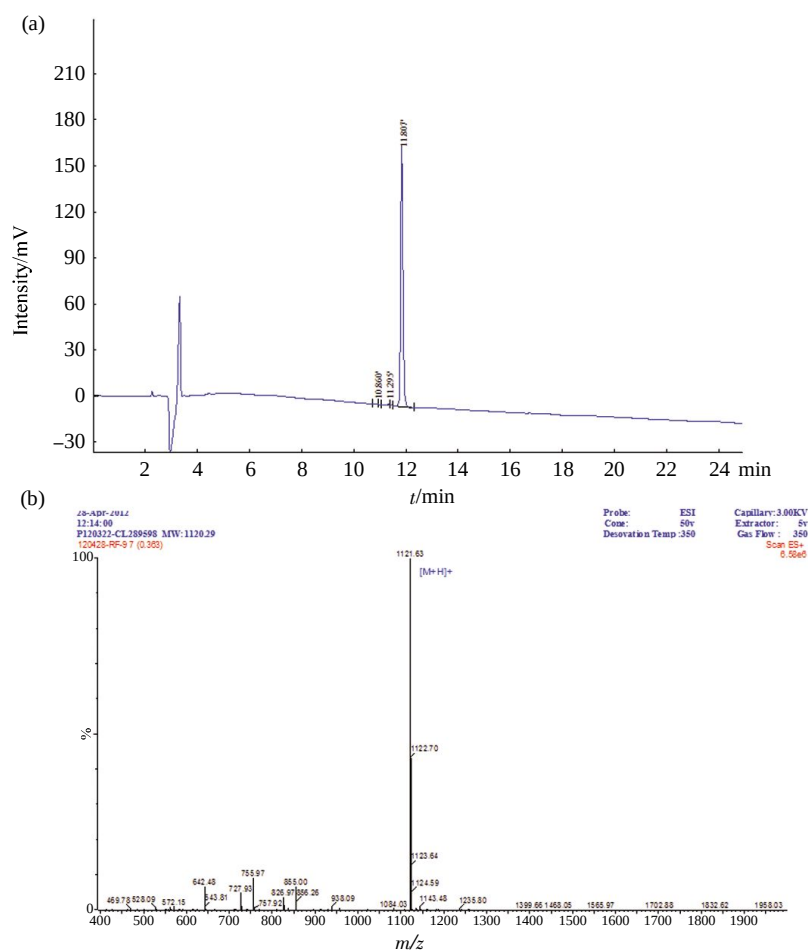


Fig. S5 Purity analysis and MS analysis of (d) RAH (d) YNIVTF antigen peptides

(a) Purity analysis of (d)RAH(d)YNIVTF antigen peptides. (b) MS analysis of (d)RAH(d)YNIVTF antigen peptides.