

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)24-2222-04

# 肿瘤抗原 MAGE-A 亚家族 HLA-A2 限制性 CTL 表位的预测及分析

张秀敏<sup>1</sup> 隋延仿<sup>1</sup> 罗二平<sup>2</sup> 李增山<sup>1</sup> 黄亚渝<sup>1</sup> 司少艳<sup>1</sup>(第四军医大学<sup>1</sup>基础部病理学教研室,<sup>2</sup>生物医学工程系军队卫生装备与计量学教研室,陕西 西安 710033)

## Prediction and analysis of HLA-A2-restricted CTL epitopes derived from the tumor antigen MAGE-A sub-family

ZHANG Xiu-Min<sup>1</sup>, SUI Yan-Fang<sup>1</sup>, LUO Er-Ping<sup>2</sup>, LI Zeng-Shan<sup>1</sup>, HUANG Ya-Yu<sup>1</sup>, SI Shao-Yan<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pathology, School of Basic Medicine, <sup>2</sup>Department of Military Medical Equipment & Metrology, School of Biomedical Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】**AIM: To predict the HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes of tumor antigen MAGE-A sub-family so as to provide appropriate CTL epitope for tumor immunotherapy. **METHODS:** The CTL epitopes of tumor antigen MAGE-A sub-family were predicted by SYFPEITHI prediction method combined with the polynomial method. The amino acid sequence and the candidate CTL epitopes of the member of MAGE-A sub-family were analyzed by DNASTAR software. **RESULTS:** Fifty HLA-A2-restricted CTL epitope candidates (nonamers) derived from the tumor antigen MAGE-A sub-family were selected and some epitopes were highly similar or completely identical. **CONCLUSION:** The combination of SYFPEITHI prediction method and polynomial method can improve the prediction efficiency and accuracy. Analyzing the homology of CTL epitopes and finding common epitopes help to develop some promising antigen peptide tumor vaccines.

**【Keywords】** antigens, neoplasms; MAGE-A sub-family; T-lymphocytes, cytotoxic; epitopes; forecasting; sequence analysis

**【摘要】**目的:预测肿瘤抗原 MAGE-A 亚家族的 HLA-A2 限制性 CTL 表位,为肿瘤治疗选择合适的 CTL 表位提供依据。方法:用 SYFPEITHI 超基序法远程预测系统和量化基序多项式结合的预测方法进行 HLA-A2 限制性 CTL 表位预测,采用 DNASTAR 软件提供的蛋白质核酸序列编辑、分析工具,对

收稿日期 2004-08-24; 修回日期 2004-10-20

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目(39830420)

通讯作者 隋延仿. Tel.(029)83374597 Email. suiyanf@fmmu.edu.cn

作者简介 张秀敏(1976-),女(汉族),河北省保定市人,硕士生(导师 隋延仿,罗二平). Tel.(029)83374541 Ext. 211 Email. zhangxiu@tom.com

MAGE-A 亚家族成员进行 CTL 序列同源性分析。结果:共预测出了 50 个 HLA-A2 限制性 CTL 表位,且部分 CTL 表位高度相似或一致。结论:SYFPEITHI 超基序法和量化基序多项式结合的预测方法是一种高效、准确的表位预测方法,结合 CTL 表位的同源性分析,可为肿瘤治疗性疫苗的制备中选择合适的 CTL 表位提供依据。

**【关键词】** 抗原 肿瘤; MAGE-A 亚家族; T 淋巴细胞 细胞毒性; 表位; 预测 序列分析

【中图分类号】R392.11; R394.2

【文献标识码】A

## 0 引言

肿瘤抗原是指细胞在癌变过程中出现的特异性抗原物质的总称,是肿瘤治疗的主要靶分子。MAGE 作为人类肿瘤特异性抗原,在肿瘤生物治疗及肿瘤疫苗的研制方面发挥着重要作用。近年研究发现在不同肿瘤或同一肿瘤中 MAGE-A 亚家族成员的表达上存在差异<sup>[1]</sup>,仅诱发针对单一 MAGE-A 亚家族成员的 CTL 反应并不能杀伤所有肿瘤细胞。我们利用 CTL 表位预测的最新方法对 MAGE-A 亚家族成员的 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行预测,并用 DNASTAR 软件对预测出的 CTL 表位进行分析,旨在寻找其共有表位及相似表位,为进一步研制更具广谱性的肿瘤疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** MAGE-A 家族序列: MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-8, MAGE-9, MAGE-10, MAGE-11, MAGE-12 编码蛋白氨基酸全长序列(由 Genbank 获得)。

### 1.2 方法

**1.2.1 SYFPEITHI 超基序法远程预测 CTL 表位** 我们拟预测由 9 个氨基酸残基组成的 CTL 表位,具体方法:利用 Internet 网络进入 SYFPEITHI 主页([www.uni-tuebingen.de/uni/kxi](http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi)),参照文献[2,3]介绍的方法,对 MAGE-A 亚家族成员 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行远程预测。

**1.2.2 候选表位限制性抗原肽多项式方案分析** 当某残基 R 出现在某肽的第一位时,在不考虑其他肽

序列的情况下,该残基对于整个肽与 MHC-I 类分子的结合自由能提供了一个常量  $R_i$ , 用在第 I 位为残基 R 大量多肽的抑制浓度 (Inhibiting concentration, IC)  $IC_{50}$  的负  $\log_{10}$  值的平均值来估计此常量<sup>[4]</sup>. 分别将初步预测的九肽氨基酸残基对应的  $R_i$  值相加, 选择分值大于选定阈值的抗原肽作为可能的候选肽. 本研究选择阈值为 -23.

1.2.3 利用 DNASTar 软件对 CTL 表位进行同源性分析, 利用 EqitSep 程序对预测出的 MAGE-A 家族成员的 HLA-A2 限制性 CTL 表位的氨基酸序列进行编

辑建立 pro 文档, 然后利用 MegAlign 程序提供的 Clustal 序列对齐法进行 HLA-A2 限制性 CTL 表位比较分析.

## 2 结果

2.1 MAGE-A 亚家族 CTL 表位远程预测结果 通过 Internet 网络采用 SYFPEITHI 法初步得到多条可能结合的九肽. 分别选取 MAGE-A 亚家族成员中预测分值最高的 10 条九肽为候选肽 (Tab 1). 其预测分值均较高 (Score > 20).

表 1 人 HLA-A2 结合肽表位预测

Tab 1 Epitope prediction of HLA-A2 binding peptides

	AApos	Sequence	Score	Coefficient score		AApos	Sequence	Score	Coefficient score
MAGE-1	194	FLIIVLMI	27	-20.70	MAGE-8	111	ALDEKVAEL	33	-23.50
	38	LVLGTLEEV	26	-22.02		45	LIMGTLEEV	29	-21.63
	278	KVLEYVIKV	26	-21.68		204	LLIIVLMI	26	-21.58
	101	VITKKVADL	25	-24.23		115	KVAELVRFL	24	-19.70
	301	ALREEEEGV	25	-24.54		179	YILVTCLGL	24	-22.10
	187	QIMPKTGFL	24	-23.24		71	SLTVDSTL	23	-23.39
	93	ILESFRVAV	23	-21.32		203	GLLIIVLGM	23	-23.08
	105	KVADLVGFL	23	-23.20		205	LIIVLGMIL	23	-22.73
	15	ALEAQEAL	22	-25.17		20	GEAPGLMDV	21	-33.98
	89	STSCILESL	22	-23.31		25	LMDVQIPTA	21	-23.75
MAGE-2	201	LLIIVLAI	28	-22.52	MAGE-9	107	ALKLKVAEL	30	-23.53
	112	KMVELVHFL	27	-21.77		199	ALLIIVLGV	30	-21.88
	200	GLLIIVLAI	27	-22.33		200	LLIIVLGI	26	-23.41
	174	HLYILVTCL	26	-22.22		111	KVAELVHFL	25	-24.06
	220	KIWEELSM	26	-21.19		201	LIIVLGVIL	25	-24.08
	108	AISRKMVEL	25	-22.35		175	YILVTALGL	24	-22.58
	159	QLVFGIEVV	25	-22.70		223	ALSVMGVYV	24	-22.89
	271	FLWGPRAI	25	-19.87		284	KVINYLVM	24	-21.11
	176	YILVTCLGL	24	-22.10		307	VLREEEEGV	24	-24.87
	203	IIVLAI	23	-21.63		102	FMFQEALKL	23	-22.98
MAGE-3	108	ALSRKVAEL	31	-22.04	MAGE-10	310	SLLKFLAKV	33	-20.40
	201	LLIIVLAI	28	-22.52		225	GILILLSI	27	-22.64
	200	GLLIIVLAI	27	-20.23		226	ILILLSII	26	-21.53
	271	FLWGPRAI	27	-19.47		228	ILLSIIFI	26	-20.27
	220	KIWEELSVL	26	-21.92		254	GLYDGMHL	25	-20.45
	112	KVAELVHFL	25	-23.14		262	LIYGEPKRL	25	-23.31
	237	SILGDPKKL	25	-23.21		24	GLEGAQAPL	24	-23.40
	176	YIFATCLGL	23	-21.73		88	QIACSSPSV	23	-21.49
	238	ILGDPKLL	23	-23.01		183	MLLVFGIDV	23	-18.04
	174	HLYIFATCL	22	-21.30		66	LIPSTPEEV	22	-21.98
MAGE-4	109	ALSNKVEL	29	-22.91	MAGE-11	203	GLLIIVLGV	29	-21.82
	202	LLIIVLGI	28	-23.75		111	ILHDKIDL	28	-22.74
	309	ALREEEEGV	27	-23.49		115	KIDLVHLL	28	-23.41
	46	LVLGTLEKV	26	-22.66		204	LLIIVLGI	26	-23.41
	286	KVLEHVVRV	25	-21.59		311	ALREEEGV	25	-23.70
	195	QIFPKTGLL	24	-24.10		131	GLITKAEM	24	-22.26
	201	GLLIIVLGI	23	-23.82		121	HLLLRKYRV	23	-23.17
	182	CLGLSYDGL	21	-24.69		240	FLFGEPKRL	23	-23.00
	272	FLWGPRAI	21	-20.24		74	AMDAIFGSL	22	-22.95
	49	GILEKVPAA	20	-23.60		184	SLNLSYDGI	22	-23.78
MAGE-6	108	ALSRKVAEL	31	-22.68	MAGE-12	112	KMAELVHFL	29	-21.89
	201	FLIILAI	27	-22.34		201	LLIIVLAI	28	-22.52
	220	KIWEELSVL	26	-23.01		108	ALSRKMAEL	27	-21.17
	271	FLWGPRAI	25	-19.87		200	GLLIIVLAI	27	-22.33
	194	QIMPKTGFL	24	-23.24		271	FLWGPRAI	27	-19.47
	237	SIFGDPKKL	24	-23.47		174	HLYILVTCL	26	-22.22
	112	KVAKLVHFL	23	-23.42		220	KIWEELSVL	26	-23.01
	176	YIFATCLGL	23	-21.73		159	QLVFGIEVV	25	-22.70
	278	LIETSYVKV	23	-23.73		188	GLLDGNQIV	25	-20.04
	15	GLEARGEAL	21	-24.56		176	YILVTCLGL	24	-22.10

**2.2 候选表位限制性抗原肽多项式方案分析** 将初步预测得到的 100 条 HLA-A2 限制性 CTL 表位抗原肽序列与以往报道的 CTL 表位比较,其中 13 条为已被证实的抗原肽<sup>[3,5-11]</sup>。分别为 MAGE-1<sub>278-286</sub>(KVLEYVIKV), MAGE-2<sub>112-120</sub>(KMVELVHFL), MAGE-2<sub>220-280</sub>(KIWEELSML), MAGE-2<sub>271-279</sub>(FLWGPRALI), MAGE-3<sub>112-120</sub>(KVAELVHFL), MAGE-3<sub>201-209</sub>(LLIIVLAI), MAGE-3<sub>271-279</sub>(FLWGPRALV), MAGE-4<sub>272-280</sub>(FLWGPRALA), MAGE-6<sub>271-279</sub>(FLWGPRALI), MAGE-9<sub>111-119</sub>(KVAELVHFL), MAGE-10<sub>254-262</sub>

(GLYDGMEHL), MAGE-12<sub>271-279</sub>(FLWGPRALV), MAGE-n<sub>159-167</sub>(QLVFGIEVV), 我们对其余抗原肽采用多项式方案进行量化分析( Tab 1 ) 将其多项式系数 < -23 的抗原表位多肽剔除。共获得 50 条候选抗原表位。

**2.3 MAGE-A 亚家族 HLA-A2 限制性 CTL 表位比较结果** 对预测出的 HLA-A2 限制性 CTL 表位分析比较,发现肿瘤抗原 MAGE-A 亚家族成员的部分 HLA-A2 限制性 CTL 表位高度同源或完全一致( Tab 2 )。

表 2 HLA-A2 限制性 CTL 表位序列

Tab 2 Sequences of HLA-A2 restricted CTL epitopes

ME-A Sub-family	ME-1 38 ~ 46	ME-1 301 ~ 309	ME-1 187 ~ 195	ME-2 271 ~ 279	ME-3 220 ~ 228	ME-3 112 ~ 120	ME-8 205 ~ 213	ME-12 112 ~ 120
ME-1	LVLGTLIEEV	ALREEEEGV	QIMPKTGFL					
ME-2				FLWGPRALI	KIWEELSML			KMVELVHFL
ME-3				FLWGPRALV	KIWEELSVL	KVAELVHFL		
ME-4	LVLGTLIEKV	ALLEEEEGV		FLWGPRALA				
ME-6			QIMPKTGFL	FLWGPRALI	KIWEELSVL	KVAKLVHFL		
ME-8						KVAELVRFL	LIIVLGMIL	
ME-9						KVAELVHFL	LIIVLGVIL	
ME-10								
ME-11		ALREEGEGV			KIWEELSVL			
ME-12				FLWGPRALV				KMAELVHFL

Note : ME = MAGE.

### 3 讨论

近年来,肿瘤治疗性疫苗迅速发展,由于肿瘤抗原 MAGE 在肿瘤组织中特异性表达,同时可以激活免疫系统,诱导产生特异性 CTL,杀伤肿瘤细胞,而对正常组织细胞无损害,因此,以肿瘤抗原 MAGE 为基础的肿瘤疫苗是一种安全、有效的肿瘤生物治疗的方法。目前,有一些肿瘤抗原肽疫苗已进入 II 期临床,并取得了很好的疗效,所以获得更多的 MAGE CTL 表位,对于肿瘤疫苗的制备十分重要。在我国 HLA-A2 阳性人群比例较高<sup>[12]</sup>,因此,HLA-A2 限制性 MAGE CTL 表位的预测与鉴定更具现实意义。以往鉴定 CTL 表位的技术路线为:用酸洗脱法,将肿瘤细胞上与 MHC-I 类分子结合的抗原肽洗脱下来,进一步分离、

纯化并观察这些抗原肽在体外是否能诱导 CTL 反应;另一种方法是在未知肿瘤抗原的 CTL 表位时,利用合成重叠肽的方法分别诱导 CTL 的方法筛选 CTL 表位。这些方法优点是覆盖面广,漏选的可能性小,但是繁琐、费时,而且常需合成大量的肽段,代价昂贵。

自从 Boon 小组从特异性 CTL 入手,首次成功分离人黑色素瘤抗原 MAGE-1 以来,人们对 MAGE 家族的认识迅速发展。通过进一步研究发现:MAGE 是由高度同源的多个成员组成的大家族,根据其基因位于 X 染色体的不同区域分为 MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, MAGE-D 4 个亚家族<sup>[13]</sup>。由于 MAGE 的许多成员与肿瘤密切相关,引起人们广泛的关注。目前研究最多的是 MAGE-A 亚家族。肿瘤抗原 MAGE-A 亚家族位于 Xq28 上,长约 45 kb,包含 12 个家族成

员除 MAGE-5 与 MAGE-7 为假基因外,编码蛋白均为最后一个外显子,由 309~319 个氨基酸残基组成。

本研究采用超基序法与多项式系数结合的方法,预测出了 50 个理论上与 HLA-A2 分子有较高亲和力的九肽表位。在基于超基序法远程预测的 100 个表位中,有 13 条已被不同研究证实为 HLA-A2 限制性 CTL 表位,这一结果证实抗原表位预测方法可靠,与实验方法获得的结果具有平行性。其他候选表位有待进一步体外实验筛选、鉴定。通过表位预测不仅可以克服费时、费力、费钱的缺点,减少确定 CTL 表位实验的盲目性,而且可以提高实验结果的预见性和成功率。之后,我们通过 DNASTAR 分析软件提供的方法,对肿瘤抗原 MAGE-A 亚家族成员初步预测的 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行了分析,结果发现:MAGE-2(271-279)在相应区域与 MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-12 序列同源性最高, MAGE-3(112-120)在相应区域与 MAGE-6, MAGE8, MAGE9 及 MAGE-3(220-228)在相应区域与 MAGE-2, MAGE-6, MAGE-11 序列同源性也很高,且部分序列完全一致,其他 HLA-A2 限制性 CTL 表位序列除 MAGE-10 高度保守外也有一定的同源性或相似性。提示这些 HLA-A2 限制性 CTL 表位经进一步免疫学鉴定后可望用于肿瘤治疗性疫苗的设计研究。同时 MAGE-2 的 CTL 表位 271~279 以及 MAGE-3 的 271~279, 220~280, 112~120 可作为共有表位。据报道,许多肿瘤在表达黑色素瘤抗原时往往不是单一表达,而是同时表达多种 MAGE-A 亚家族抗原<sup>[14]</sup>。所以,通过 HLA-A2 限制性 CTL 表位预测结合表位序列同源性分析,有利于在肿瘤治疗性疫苗中选择合适的 CTL 表位,同时利用共有表位制成的肽疫苗可同时杀伤表达不同 MAGE-A 抗原的肿瘤细胞,为进一步研制更具广谱性的肿瘤抗原肽疫苗提供依据。

## 【参考文献】

[1] Marchand M, Weynats P, Boon T, et al. Tumor regression in melanoma patient treated with a peptide encoded by gene MAGE-3 [J]. *Int J Cancer*, 1995; 61(6): 883.

[2] Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs [J]. *Immunogenetics*, 1999; 50: 213-219.

[3] 董海龙, 隋延仿. 肝癌相关肿瘤抗原 HLA-A2 限制性 CTL 表位的预测 [J]. 第四军医大学学报, 2003 24(6): 492-494.

Dong HL, Sui YF. Prediction of HLA-A2-restricted CTL epitope derived from tumor antigens associate with hepatocellular carcinoma [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(6): 492-494.

[4] Gulukota K, Sidney J, Sette A, et al. Two complementary methods for predicting peptides binding major histocompatibility complex molecules [J]. *J Mol Biol*, 1997; 267(5): 1258-1267.

[5] Pascolo S, Schirle M, Guckel B, et al. A MAGE-A1HLA-A\*0201 epitope identified by mass spectrometry [J]. *Cancer Res*, 2001; 61: 4027-4077.

[6] Marjan JW, Sioerd H, Ellen IH, et al. Identification of HLA-A2\*0201-restricted epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product [J]. *Int J Cancer*, 1997; 73: 125.

[7] 耿森, 吴玉章, 贾正才, 等. 肿瘤抗原 MAGE-2 HLA-A2 限制性新 CTL 表位的鉴定 [J]. 第三军医大学学报, 2002; 24(10): 1156-1158.

Geng M, Wu YZ, Jia ZC, et al. Identification of novel HLA-A2-restricted CTL epitopes derived from tumor antigen MAGE-2 [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2002; 24(10): 1156-1158.

[8] Kawashima I, Hudson SJ, Tsai V, et al. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: Identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors [J]. *Hum Immunol*, 1998; 59: 1-14.

[9] 贾正才, 吴玉章, 万瑛, 等. 肿瘤抗原 MAGE-3 新的 HLA-A2 限制性 CTL 表位的发现与鉴定 [J]. 中国免疫学杂志, 2002; 18: 26-29.

Jia ZC, Wu YZ, Wan Y, et al. Finding and identification of a novel HLA-A2-restricted CTL epitope derived from the tumor antigen MAGE-A3 [J]. *Chin J Immunol*, 2002; 18: 26-29.

[10] Van Der Bruggen P, Bastin J, Boon T, et al. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cell expressing MAGE-3 [J]. *Eur J Immunol*, 1994; 24(12): 3038-3043.

[11] Huang LQ, Brasseur F, Serrano A, et al. Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma [J]. *J Immunol*, 1999; 162(11): 6849-6854.

[12] 李长秦, 周红超, 徐德忠, 等. 西安地区供血员中 HLA-A2 抗原分布和 HCV 感染关系的初步研究 [J]. 解放军预防医学杂志, 1998; 6: 415-417.

Li CQ, Zhou HC, Xu DZ, et al. A initial study of the relationship between HCV infection and HLA-A2 antigen distribution in donors in Xi'an [J]. *Prevent Med J Chin PLA*, 1998; 16: 415-417.

[13] Lucas S, Brasseur F, Boon T. A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code MAGE antigens recognized by T cell [J]. *Cancer Res*, 1999; 59: 4100.

[14] Sun ZR, Wang Y, Hu SM, et al. Study on the molecule structural evolution of serine proteinase superfamily [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1999; 15(3): 530-531.