

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.003

· 研究快报 ·

计算机模建和点突变分析抗人 CD40 单克隆抗体 5C11 识别的抗原表位

张婷¹, 张学光^{1,2,3}, 瞿秋霞², 章良¹(1. 苏州大学 医学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 江苏省临床免疫学研究所, 江苏 苏州 215007; 3. 江苏省干细胞重点实验室, 江苏 苏州 215007)

专家点评 CD40 分子是 TNF 受体超家族成员, 在调节体液和细胞免疫应答过程中发挥重要作用。CD40 分子广泛表达于免疫细胞、造血细胞、血管内皮细胞和上皮细胞中, 同时还在很多肿瘤细胞中表达。尽管 CD40 分子本身缺少内在的激酶活性结构域, 但 CD40 可通过复杂的下游分子调节多种肿瘤相关基因的表达, 使之成为一个潜在的肿瘤治疗靶点。目前已经有 10 多个以 CD40 通路为靶点的单抗或药物分子进入临床 I 期试验, 因此, 对人 CD40 单抗的抗原识别表位的研究, 具有重要的理论意义和临床价值。

由于抗原抗体的相互作用缺少相应的晶体结构, 完全用实验方法来寻找抗原识别表位, 工作量大且费力费时。由于抗原抗体相互作用部分片段的软性问题, 复合物的结构与单体的结构相差较大, 单纯用计算机同源模拟或者其他的结构模拟方法来寻找抗原识别表位可信度不是很高。本期刊登的张婷、张学光等人的关于“计算机模建和点突变分析抗人 CD40 单抗 5C11 识别的抗原表位”的研究论文, 很好地将实验研究和计算机同源模拟结合在一起, 充分利用生物信息学得到的结果, 进一步设计和指导实验工作, 最后寻找到抗人 CD40 单抗 5C11 识别的重要位点, 是一项很有价值的探索和尝试。

随着计算机科学和生物信息学的迅速发展, 测定到的蛋白质结构数目也越来越多, 使得基于计算机模拟抗体设计成为可能。学科的交叉发展是科学发现和创新的重要动力, 该论文很好地显示了将生物信息学与实验工作紧密结合的重要性和学术意义, 相信这方面的研究将进一步加深对 CD40 分子及其激发型单抗在肿瘤治疗中作用机制的认识, 对设计更好的 CD40 分子激发型单抗具有很大的指导作用。

中国运筹学会计算系统生物学会副理事长

中国医药生物技术协会生物医学信息技术分会委员

苏州大学系统生物学研究中心主任

沈百荣

[摘要] 目的: 通过计算机模拟与点突变实验初步探讨本课题组前期研制的抗人 CD40 激发型单克隆抗体 5C11 识别的抗原表位。方法: 利用 Insight II 软件分别模拟抗原、抗体结构, 构建抗原抗体复合物模型, 通过计算推测 5C11 单抗所识别的抗原表位。构建人野生型 CD40 (wtCD40) 及其第 70 位苏氨酸突变型 (70muCD40) 和第 114 位谷氨酸突变型 (114muCD40) 的重组真核表达载体 pIRES2-EGFP/wtCD40、pIRES2-EGFP/70muCD40 和 pIRES2-EGFP/114muCD40, 脂质体转染法将重组载体导入 HEK293 细胞, 筛选稳定转染细胞株 (即 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞)。流式细胞术和 Western blotting 检测 5C11 单抗与 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞的结合能力。结果: 成功构建 pIRES2-EGFP/wtCD40、pIRES2-EGFP/70muCD40 和 pIRES2-EGFP/114muCD40 真核表达载体和相应稳定转染细胞株。5C11 单抗与 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞结合能力较 HEK293/wtCD40 细胞明显减弱; Western blotting 检测结果表明, 5C11 单抗仅识别 HEK293/wtCD40 细胞, 不识别 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞。结论: 人 CD40 氨基酸序列的第 70 位苏氨酸和第 114 位谷氨酸是其单抗 5C11 识别的抗原表位, 对构建人源化 CD40 抗体具有潜在的临床意义。

[关键词] CD40; 抗原表位; 同源模建; 点突变; 肿瘤生物治疗

[中图分类号] R392.1; R730.3; R318.04

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0355-07

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2009zx09103), 教育部创新团队资助项目 (No. IRT0849), 国防预研资助项目 (No. B3820110002)。Project supported by the Special and Important Program for “Creation of New Drug” (No. 2009zx09103), the Foundation for Innovative Research Team of Ministry of Education (No. IRT0849), and the Foundation for Advanced Research of National Defense (No. B3820110002)

[作者简介] 张婷 (1986 -), 女, 江苏省无锡市人, 硕士生, 主要从事分子免疫学研究工作。E-mail: ztcathy_05@163.com

[通信作者] 张学光 (ZHANG Xue-guang, corresponding author), E-mail: xueguangzh@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110714.1102.011.html>

Antigenic epitopes of anti-CD40 monoclonal antibody (5C11) analyzed by computer modeling and site-directed mutagenesis

ZHANG Ting¹, ZHANG Xue-guang^{1,2,3}, QU Qiu-xia², ZHANG Liang¹ (1. Medical Biotechnology Institute of Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 2. Institute of Clinical Immunology of Jiangsu Province, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 3. Key Laboratory of Stem Cell of Jiangsu Province, Suzhou 215007, Jiangsu, China)

[**Abstract**] **Objective:** To primarily identify the antigenic epitopes of agonist type anti-CD40 monoclonal antibody, 5C11, which was constructed in our previous research, by means of computer modeling and site-directed mutation experiments. **Methods:** The structures of antigen and antibody were modeled by Insight II software and the immune complex was constructed. The antigenic epitope of 5C11 antibody was calculated and speculated. The full length of wild type human CD40 (wtCD40) gene and two site-directed mutant CD40 gene (70muCD40 and 114muCD40) were amplified by RT-PCR; pIRES2-EGFP/wtCD40, pIRES2-EGFP/70muCD40 and pIRES2-EGFP/114muCD40 recombinant vectors were constructed. These vectors were transfected into HEK293 cells by Lipofect method, and HEK293 cells stably transfected with pIRES2-EGFP/wtCD40, pIRES2-EGFP/70muCD40 and pIRES2-EGFP/114muCD40 vectors (named HEK293/wtCD40, HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells, respectively) were screened. The binding abilities of HEK293/wtCD40, HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells with 5C11 were examined by flow cytometry and Western blotting analysis. **Results:** The recombinant eukaryotic expression vectors pIRES2-EGFP/wtCD40, pIRES2-EGFP/70muCD40 and pIRES2-EGFP/114muCD40 were successfully constructed and the corresponding stably transfected HEK293 cells were obtained. The binding ability between 5C11 antibody and HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells were lower than that with HEK293/wtCD40 cells. Western blotting results showed that 5C11 antibody only recognized HEK293/wtCD40 cells but not HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells. **Conclusion:** The 70th threonine and 114th glutamic acids in human CD40 amino acid sequence are the antigenic epitopes of 5C11 monoclonal antibody, which has potential clinical significance for humanized CD40 antibody research.

[**Key words**] CD40; antigenic epitope; homology modeling; site-directed mutation; cancer biotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 355-361]

CD40 是 TNF 受体超家族成员,在调节体液和细胞免疫应答过程中发挥重要作用^[1-2]。CD40 广泛表达在 B 细胞、成纤维细胞、神经元细胞、上皮细胞、内皮细胞等多种类型的细胞上,不仅如此,CD40 还表达于多种肿瘤细胞表面^[3]。大量实验^[4-8]证明,CD40 可以作为多种肿瘤生物治疗的新靶点,具有抑制肿瘤细胞的生长和清除肿瘤的疗效。本课题组利用杂交瘤技术,制备了一株具有特殊功能的抗人 CD40 单克隆抗体,命名为 5C11。5C11 抗体能诱导 DCs 体外扩增及成熟^[9],有效抑制胃癌细胞、宫颈癌细胞、多发性骨髓瘤细胞的增殖^[10-13]。该单抗在肿瘤免疫治疗中具有潜在的临床应用价值,正在进行治疗性抗体的研发。

确定抗原表位是研究抗体功能的主要分子基础,目前最好的方法是 X 射线晶体衍射,但此方法工作量大、成本高,且费时费力^[14]。近年来,利用计算机辅助分子设计模拟抗体结构以及抗原抗体结合的复合物模型,从而确定抗原抗体参与相互作用的

关键残基,已逐渐成为预测抗原表位必不可少的工具^[15]。本研究通过计算机模拟技术,以 5C11 抗体为研究对象,在预测 5C11 抗体识别抗原表位的基础上,通过一系列实验对预测结果进行验证。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

各种限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、逆转录试剂盒及定点突变试剂盒购自 TaKaRa 公司,少量质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,小牛血清购自美国 Hyclone 公司,TRIzol 试剂、脂质体 Lipofect 2000、G418 和胞内染色试剂 Fix&Perm[®] Cell Permeabilization Reagents 购自 Invitrogen 公司,PE 标记抗多聚组氨酸单克隆抗体和生物素标记抗多聚组氨酸抗体均购自 R&D 公司,NC 膜和 ECL 化学发光试剂购自北京普利莱公司,PE-羊抗鼠 IgG 购自广州晶美公司。真核表达载体 pIRES2-EGFP 购自 Invitrogen 公司。抗 CD40 单克隆抗体 5C11 由本研究

所制备保存,大肠杆菌 Top10 由本研究所保种。B 淋巴瘤细胞株 Daudi、HEK293 细胞均购自中国科学院上海细胞研究所,由本研究所保存,经检测无支原体污染。计算机理论模拟所用硬件为 IBM 服务器,软件为 Insight II (2005 版)程序包(军事医学科学院沈倍奋院士提供)。

1.2 Insight II 软件推测 5C11 抗体识别的抗原表位

利用 Insight II 软件分别对查找到的 CD40 抗原和 5C11 抗体重、轻链的结构进行同源建模(homology)和力学优化(discover),然后利用分子叠合、对接的方法,将 V_H 、 V_L 整合成完整的 Fv 空间结构。根据分子对接(docking)、动力学模拟(discover 3)方法构建 5C11 抗体 Fv 段与 CD40 相互作用的复合物模型,计算得到相互作用能量,经比较筛选出总能量最低的复合物模型,从而计算出抗原抗体间的作用位点,最后综合推测 5C11 抗体识别的抗原表位。

1.3 pIRSE2-EGFP/wtCD40 真核表达载体的构建

取 5×10^6 个 Daudi 细胞,TRIzol 一步法提取总 RNA,以 Oligo(dT)为引物,按照 AMV 反转录酶说明书进行反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,利用 CD40 引物 P1(5'-CGGCTAGCCGATGGTTCGCTCTGC-CTCTGC-3',含 *Nhe* I 位点)和 P2(5'-CCGCTCGAGGGCTTAATGATGATGATGATGATGCTGTCTCTCC TGC-3',含 *Xho* I 位点及 6-His 标签)进行 PCR。PCR 反应条件:94 °C、5 min,94 °C、30 s,55 °C、45 s,72 °C、45 s(30 个循环);72 °C、10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,割胶回收纯化基因片段。将 CD40 基因片段和 pIRSE2-EGFP 载体分别用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切,然后用 T4 DNA 连接酶连接并转化至大肠杆菌 Top10,经菌落 PCR 初步鉴定阳性克隆,并提取质粒酶切鉴定,送南京金斯瑞公司进行 DNA 测序,获得 pIRSE2-EGFP/wtCD40 载体。

1.4 pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40 真核表达载体的构建

CD40 分子胞外段包含 4 个富含半胱氨酸的重复肽段,构成与其配体结合的区域 Domain 1~4^[16-17]。根据文献报道的 CD40-CD40L 结合的作用位点,结合软件分析的结果,将分别位于 Domain 2 和 3 的第 70 位苏氨酸和第 114 位谷氨酸突变成丙氨酸,构建 pIRSE2-EGFP/wtCD40 突变型载体:pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40。按 TaKaRa Mutant BEST 试剂盒说明书的要求,设计 CD40 基因第 70 位苏氨酸突变引物 P70mu 1(5'-TAGGAATTCGCTTTACCCGCAAGGA-3')和 P70mu 2(5'-GACGCCTGGAACAGAGACACACT-3');CD40 基因第

114 位谷氨酸突变引物 P114mu 1(5'-ACTGTACGAGTGCAGCCTGTGAGAGCTGT-3')和 P114mu 2(5'-GCCAGCCTTCTTCACAGGTGCAGA-3')。以 pIRSE2-EGFP/wtCD40 重组载体为模板进行 PCR 扩增,经过末端平滑化及 5'末端磷酸化反应,自身连接反应后,转化至大肠杆菌 Top10,菌落 PCR 鉴定阳性克隆并进行 DNA 测序,获得 pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40 重组载体。

1.5 构建稳定表达 pIRES2-EGFP/wtCD40、pIRES2-EGFP/70muCD40、pIRES2-EGFP/114muCD40 质粒的 HEK293 细胞

1×10^6 个 HEK293 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h,当细胞汇合率达到 90%~95%时,按 Lipofect 2000 转染说明书,将 pIRES2-EGFP/wtCD40、pIRES2-EGFP/70muCD40、pIRES2-EGFP/114muCD40 和 pIRES2-EGFP/mock 空载体分别转染 HEK293 细胞。转染时用无血清培养基,6 h 后换成 RPMI 1640 完全培养基,转染 24 h 后 FCM 检测绿荧光蛋白(GFP)的表达,计算转染效率。

将其余的细胞置于含 G418(1 mg/ml)的选择培养基中,24 孔板筛选培养,待抗性克隆长至足够大,用 PE 标记抗多聚组氨酸(原理:设计 CD40 引物 P2 时加入 6-His 标签,扩增得到的 CD40 全长基因带有多聚组氨酸尾巴,流式细胞术可检测出多聚组氨酸的表达率)单克隆抗体经胞内染色试剂处理,筛选出表达率较高的克隆,经几次亚克隆后使 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞的多聚组氨酸的表达率相近,成功获得稳定表达人 wtCD40、70muCD40、114muCD40 的细胞株(即 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞),稳定转染 pIRES2-EGFP/mock 的 HEK293 细胞株(HEK293/mock 细胞)为对照。

1.6 流式细胞术检测稳定转染细胞株与 5C11 单抗的结合

将 HEK293/mock、HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞(5×10^5 /管)用 PBS 洗涤后,以 5C11 单抗为一抗,4 °C 孵育 30 min;以 PE-羊抗鼠 IgG 为二抗,4 °C 孵育 30 min;洗涤后进行流式细胞仪分析。

1.7 Western blotting 检测稳定转染细胞株与 5C11 单抗的结合

收集 HEK293/mock、HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞(5×10^6 个),在蛋白裂解酶作用下 4 °C 摇床 2 h,4 °C 离心 30 min,取上清,加入 $5 \times$ Loading Buffer,煮 5 min。样品制备

好后进行 SDS-PAGE,再将蛋白质转移至 NC 膜(100 V,4 ℃,2 h),载有蛋白的 NC 膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST 溶液 4 ℃ 摇床封闭过夜,次日加入 5C11 单抗室温孵育 2 h,用 PBST 洗去未结合的抗体,加入 HRP-羊抗鼠 IgG 二抗继续孵育 1 h,洗涤后选用高灵敏度的 ECL 显色系统进行显色。

2 结果

2.1 CD40 晶体结构和 5C11Fv 结构的同源模建及抗原抗体复合物模型的建立

由于蛋白质数据库(protein data bank, PDB)中无 CD40 晶体结构,只能利用 CD40 全长序列,通过 Blastp 搜索得到同源性最高为 50% 的一条序列,提交到 SWISS-MODEL 进行模拟,力学优化后获得 CD40 胞外段空间构象(图 1)。将已知的抗体 V_H、V_L 氨基酸序列^[18] 分别提交给 SWISS-MODEL,分别得到同源性最高的一条序列,进入 Blastp 程序,选择 PDB 库,查找与 V_H、V_L 序列同源性都较高的序列。以 V_H 序列为基准,找到 1mrc. pdb 文件。分别对 V_H、V_L 的空间结构进行力场赋值和力学优化,利用 Docking 方法,将模拟的 V_H、V_L 搭建成完整的 Fv 结构(图 2)。

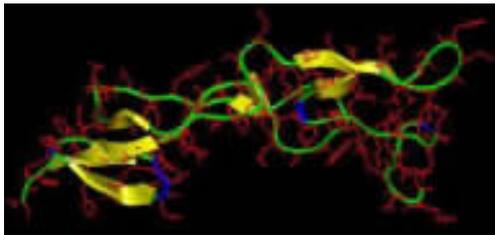


图 1 利用同源模建和力学优化获得的 CD40 胞外段空间构象

Fig.1 Extracellular region structure of CD40 constructed using homology modeling and refinement of molecular mechanics

The yellow ribbons represented beta-sheet, the green contour represented the trend of carbon atoms of backbone, the blue ribbons represented random coil, and the red contour represented heavy atoms of side chains

将搭建好的 CD40 胞外段结构与 5C11 抗体 Fv 结构进行分子对接,使得范德华力和静电场作用力都为负值,且总和值越低越好。根据分子间氢键、表位与 CDR 结合情况,进行动力学模拟,确定了 5 个复合物构象(图 3、表 1)。选取其中总和值最低的 2 个构象,分别计算抗原抗体间的作用位点,从而推测出 5C11 抗体识别 CD40 的抗原表位为 15 ~ 17、23、43 ~ 56、68 ~ 80、85、87、100 ~ 115。

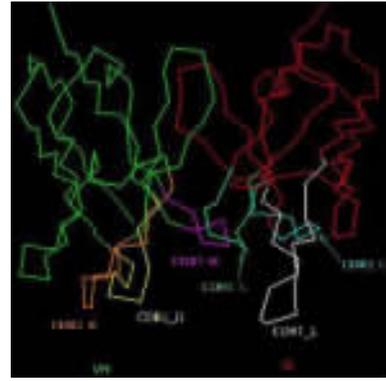


图 2 利用分子叠合、对接和力学优化获得的 5C11 抗体 Fv 段 3D 构象

Fig. 2 3D structure of Fv fragment of 5C11 antibody constructed using molecular docking and refinement of molecular mechanics

The green represented V_L FR; the red represented V_L FR; the yellow, safron, and purple represented V_H CDR1, CDR2 and CDR3, respectively; and the white, blue and light green represented V_L CDR1, CDR2 and CDR3, respectively

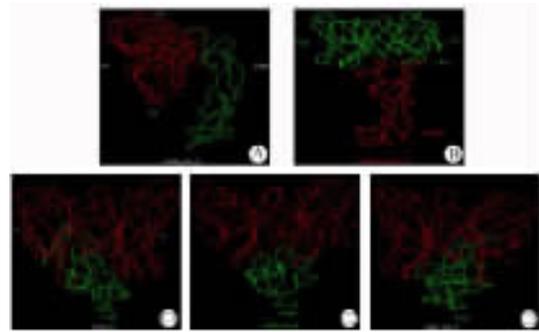


图 3 利用分子对接获得的 5C11 抗体 Fv 段与 CD40 相互作用的复合物模型

Fig. 3 Optimized complex model of Fv fragment of 5C11 antibody interacting with CD40 using molecular docking method

A: C-terminal of CD40 extracellular region interacting with 5C11 Fv; B: N-terminal of CD40 extracellular region interacting with 5C11 Fv; C1-3: Middle part of CD40 extracellular region interacting with 5C11 Fv

2.2 pIRSE2-EGFP/wtCD40、pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40 重组表达载体的构建和鉴定

以 wtCD40 基因引物 P1 和 P2 进行 RT-PCR,从 Daudi 细胞中扩增出 831 bp 的特异性 wtCD40 基因条带(图 4)。将获得的 wtCD40 基因双酶切后插入 pIRSE2-EGFP 表达载体,筛选的阳性克隆经 PCR 和双酶切鉴定与目的基因理论值大小一致,基因测序正确。

表 1 5C11 Fv 段与 CD40 相互作用模式能量比较 (E/kJ · mol⁻¹)

Tab.1 Comparison of interaction energy of complex models formed by Fv fragment of 5C11 and CD40(E/kJ · mol⁻¹)

Complex model of CD40 and 5C11	Interaction energy		
	Van der Waals energy	Coulomb energy	Total energy
A	-27.272 1	-28.350 1	-55.622 2
B	-23.400 8	-9.879 9	-33.280 5
C1	-53.928 3	-48.656 3	-102.585 0
C2	-32.084 9	-13.090 8	-45.175 8
C3	-50.892 3	-45.895 4	-96.787 8

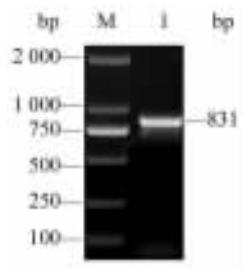


图 4 RT-PCR 扩增 Daudi 细胞中 wtCD40 基因
Fig.4 Wild type (wt) CD40 gene in Daudi cells amplified by RT-PCR

M: Marker; 1: Daudi cells

以 pIRSE2-EGFP/wtCD40 重组载体为模板,分别以第 70 位苏氨酸和第 114 位谷氨酸突变型引物 P70mu1、P70mu2 和引物 P114mu1、P114mu2 进行 PCR 扩增,阳性克隆经 PCR 和双酶切鉴定与目的基因理论值大小一致,基因测序证明突变成功(图 5)。以上结果表明重组表达载体 pIRSE2-EGFP/wtCD40、pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40 构建成功(图 6)。

2.3 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞的鉴定

以引物 P1 和 P2 进行 RT-PCR,分别从 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞中扩增出 831 bp 的特异性条带(图 7)。利用胞内染色法,流式术测得 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞的多聚组氨酸表达率相近(图 8),表明成功构建稳定表达人 wtCD40、70muCD40 和 114muCD40 基因的转染细胞。

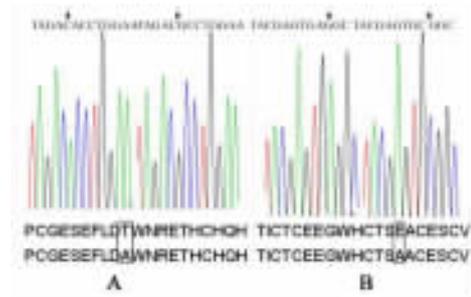


图 5 pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40 质粒测序结果
Fig.5 Sequencing results of pIRSE2-EGFP/70muCD40 and pIRSE2-EGFP/114muCD40 plasmids
A: pIRSE2-EGFP/70muCD40 plasmid;
B: pIRSE2-EGFP/114muCD40 plasmid

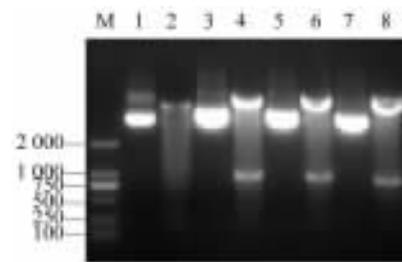


图 6 pIRES2-EGFP/wtCD40、pIRES2-EGFP/70muCD40 和 pIRES2-EGFP/114muCD40 重组载体的酶切鉴定
Fig.6 Identification of pIRES2-EGFP/wtCD40, pIRES2-EGFP/70muCD40, and pIRES2-EGFP/114muCD40 recombinant vectors by enzyme digestion

1, 3, 5, 7: pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP/wtCD40, pIRES2-EGFP/70muCD40, and pIRES2-EGFP/114muCD40; 2, 4, 6, 8: pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP/wtCD40, pIRES2-EGFP/70muCD40, and pIRES2-EGFP/114muCD40 digested by *Nhe* I and *Xho* I

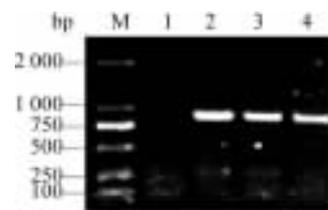


图 7 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞的 RT-PCR 鉴定
Fig.7 Identification of HEK293/wtCD40, HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells by RT-PCR
M: Marker; 1: HEK293/mock; 2: HEK293/wtCD40; 3: HEK293/70muCD40; 4: HEK293/114muCD40

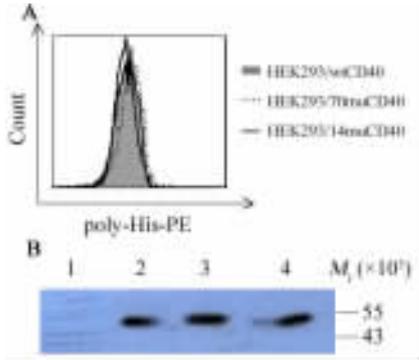


图 8 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞中多聚组氨酸的表达
Fig. 8 Expressions of poly-His in HEK293/wtCD40, HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells
 A: FCM result; B: Western blotting result
 1: HEK293/mock; 2: HEK293/wtCD40;
 3: HEK293/70muCD40; 4: HEK293/114muCD40

2.4 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞与 5C11 抗体结合能力的比较

将 5C11 抗体设置不同浓度的梯度,以 HEK293/wtCD40 细胞为对照,HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞分别与其比较,流式结果(图 9)显示,不同浓度下,5C11 抗体识别 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞的平均荧光强度都减弱。

收集细胞,裂解后进行 Western blotting 分析,结果(图 10)显示,以 HEK293/mock 细胞为阴性对照,5C11 抗体只识别 HEK293/wtCD40 细胞,不识别 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞。结果提示,5C11 抗体识别 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞的能力降低,第 70 位苏氨酸和第 114 位谷氨酸基因突变影响了 5C11 抗体对 CD40 的识别。

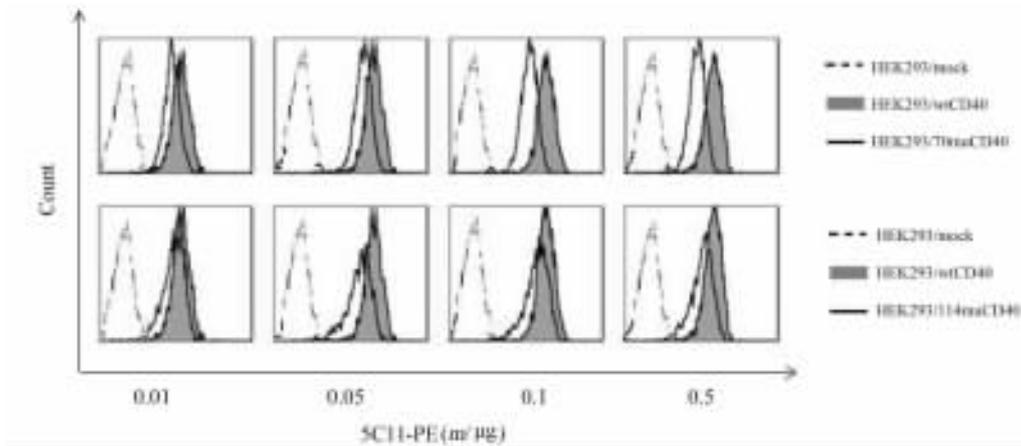


图 9 流式术分析 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞与 5C11 抗体的结合能力
Fig. 9 Binding abilities of HEK293/wtCD40, HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells with 5C11 antibody as detected by FCM

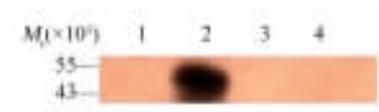


图 10 Western blotting 分析 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40、HEK293/114muCD40 细胞与 5C11 抗体的结合
Fig. 10 Binding of HEK293/wtCD40, HEK293/70muCD40 and HEK293/114muCD40 cells with 5C11 antibody as detected by Western blotting
 1: HEK293/mock; 2: HEK293/wtCD40; 3: HEK293/70muCD40; 4: HEK293/114muCD40

3 讨论

近年来计算机辅助分子设计与蛋白空间结构模拟技术发展迅速,为抗原表位的确定提供简便而有效的手段。抗原表位是单克隆抗体识别位点,也是抗体产生治疗作用的分子基础^[19]。5C11 抗体是笔者实验室研制的一株能有效激发 CD40 信号的功能性单抗,经体内外实验证实,其通过激发和诱导树突状细胞分化成熟和分泌多种细胞因子,产生抗肿瘤作用,现正在人源化改造过程中^[20-21]。鉴此,5C11 抗体识别抗原表位的鉴定将为该抗体的进一步研发

奠定基础。

抗体 Fv 片段由重链和轻链组成,是抗体分子中保留抗原结合部位的最小功能片段。因此,利用同源建模方法,模拟了抗原 CD40 胞外段和 5C11 抗体 Fv 的空间结构。通过分子对接,模拟 5C11 抗体 Fv 与抗原作用的复合物模型。根据计算出的抗原抗体间作用位点,推测 5C11 抗体识别 CD40 的抗原表位为 15~17、23、43~56、68~80、85、87 和 100~115。

本研究建立的复合物模型是否合理,据此模型推测而得的结果是否可靠,必须通过实验进行验证。本研究进一步构建野生型 CD40 的 pIRSE2-EGFP/wtCD40 质粒,以及第 70 位苏氨酸和第 114 位谷氨酸点突变的 pIRSE2-EGFP/70muCD40 和 pIRSE2-EGFP/114muCD40 质粒,稳定转染 HEK293 细胞,筛选出稳定表达目的基因的 HEK293/wtCD40、HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞,然后比较它们与 5C11 抗体的结合情况。流式检测结果表明,与 HEK293/wtCD40 细胞相比,5C11 抗体与 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞结合的平均荧光强度减弱。Western blotting 检测结果表明,5C11 抗体只识别 HEK293/wtCD40 细胞,不识别 HEK293/70muCD40 和 HEK293/114muCD40 细胞。因此,突变位点影响 5C11 抗体对 CD40 的识别,人 CD40 氨基酸序列的第 70 位苏氨酸和第 114 位谷氨酸是 5C11 抗体识别 CD40 的抗原表位,本研究对构建人源化抗体具有潜在的临床意义。

[参考文献]

- [1] Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD154 engagement in the immune system [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 152-172.
- [2] Donners M, Beckers L, Lievens D, et al. The CD40-TRAF6 axis is the key regulator of the CD40/CD40L system in neointima formation and arterial remodeling [J]. *Blood*, 2008, 111(9): 4596-4604.
- [3] Loskog A, Eliopoulos AG. The Janus faces of CD40 in cancer [J]. *Semin Immunol*, 2009, 21(5): 301-307.
- [4] Xie F, Shi Q, Wang Q, et al. CD40 is a regulator for vascular endothelial growth factor in the tumor microenvironment of glioma [J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 222(1/2): 62-69.
- [5] Noguchi M, Imaizumi K, Kawabe T, et al. Induction of antitumor immunity by transduction of CD40 ligand and interferon-gamma gene into lung cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(6): 421-429.
- [6] Tong AW, Papayoti MH, Netto G, et al. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand and its endogenous expression in human breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(3): 691-703.
- [7] Loskog A, Bjokland A, Brown MP, et al. Potent antitumor effects of CD154 transduced tumor cells in experimental bladder cancer [J]. *J Urol*, 2001, 166(3): 1093-1097.
- [8] Schmitz V, Barajas M, Wang L, et al. Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2001, 34(1): 72-81.
- [9] Zhou ZH, Wang JF, Wang YD, et al. An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line [J]. *Hybridoma*, 1999, 18(6): 471-478.
- [10] Li R, Chen WC, Wang WP, et al. CD40 signaling activated by agonistic anti-CD40 monoclonal antibody 5C11 has different effects on biological behavior of gastric carcinoma cells [J]. *Immunol Lett*, 2010, 131(2): 120-125.
- [11] Qi CJ, Qian KQ, Ning YL, et al. Ligation or cross-linking of CD40 has different effects on AGS gastric cancer cells [J]. *Cell Immunol*, 2009, 259(2): 135-140.
- [12] Qi CJ, Zheng L, Zhou X, et al. Cross-linking of CD40 using anti-CD40 antibody, 5C11, has different effects on XG2 multiple myeloma cells [J]. *Immunol Lett*, 2004, 93(2/3): 151-158.
- [13] 黄沁, 瞿秋霞, 张学光. 激发型 CD40 单抗对宫颈癌细胞株 Si-Ha 化疗敏感性的影响 [J]. *现代妇产科进展*, 2010, 19(4): 261-264.
- [14] Shi E, Fury W, Li WT, et al. Monoclonal antibody classification based on epitope-binding using differential antigen disruption [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 314(3): 9-20.
- [15] Groot D, Sbai AS, Aubin H, et al. Immunoinformatics: Mining genomes for vaccine components [J]. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80(2): 255-269.
- [16] Hostager BS, Hsing Y, Harms DE, et al. Different CD40-mediated signaling events require distinct CD40 structural features [J]. *Immunol*, 1996, 157(3): 1047-1053.
- [17] Goldstein MD, Watts TH. Identification of distinct domains in CD40 involved in B7-1 induction or growth inhibition [J]. *Immunol*, 1996, 157(7): 2837-2843.
- [18] 瞿秋霞, 陈永井, 葛彦, 等. 抗人 CD40 人-鼠嵌合抗体的构建及其表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(2): 189-192.
- [19] Na-ngam N, Kalambaheti T, Ekpo P, et al. Mimotope identification from monoclonal antibodies of *Burkholderia pseudomallei* using random peptide phage libraries [J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 2008, 102(1): S47-S54.
- [20] Ge Y, Xi H, Zhang XG. Vaccination with immature dendritic cells combined with CD40 mAb induces protective immunity against B lymphoma in hu-SCID mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(7): 487-492.
- [21] Weiss JM, Back TC, Scarzello AJ, et al. Successful immunotherapy with IL-2/anti-CD40 induces the chemokine-mediated mitigation of an immunosuppressive tumor microenvironment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(46): 19455-19460.

[收稿日期] 2011-05-12

[修回日期] 2011-06-10

[本文编辑] 王莹