

## 基于基因突变的基因工程抗体亲和力成熟研究

邓 龙<sup>1</sup>, 周 思<sup>2\*</sup>, 郭新东<sup>2</sup>

1.广东食品药品职业学院, 广州 510520;

2.广州质量监督检测研究院, 广州 510000

**摘 要:** 基因工程重组抗体可通过对基因序列的分析、修饰与修改, 从而改进抗体特性。对基于基因突变的基因工程抗体亲和力成熟的方法进行总结, 主要包括小分子有机物-抗体相互作用机制分析、抗体序列数据库及计算机模拟技术, 以及新兴的分子模拟与对接技术。

**关键词:** 基因工程抗体; 分子模拟; 基因突变; 亲和力成熟

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2014.06.04

## Affinity Maturation of Genetically Engineered Antibody by Gene Mutation

DENG Long<sup>1</sup>, ZHOU Si<sup>2\*</sup>, GUO Xin-Dong<sup>2</sup>

1. *Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;*

2. *Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China*

**Abstract:** Performance improvements of recombinant antibodies can be achieved by gene sequence analysis and modification. The methods for enhancing the affinity of recombinant antibodies through gene mutation were summarized, with special focus on the mechanism analysis of small organic molecules-antibody interactions, antibody sequence databases and computer simulation based technologies, and a trending technology of molecular modeling and docking technology.

**Key words:** genetically engineered antibody; molecular modeling; gene mutation; affinity maturation

随着基因工程技术的不断发展, 通过 DNA 重组技术获得抗体的基因片段, 将重组抗体的基因转入原核或真核表达系统中在适当条件下表达, 已获得一系列基因工程重组抗体。基因工程重组抗体是继多克隆抗体和单克隆抗体之后的第三代抗体。其在基因水平上的操作非常灵活。可对基因序列进行分析、修饰和加工以改进抗体特性或赋予抗体新的特性, 突破以往仅局限于半抗原分子设计的限制。针对基因工程抗体亲和力普遍较低; 半衰期短, 易从血中清除; 缺乏 Fc 片段, 只能中和抗原, 而不能激活补体系统和介导细胞免疫等缺点, 人们希望通过基因工程抗体的灵活性, 将抗体进行定向的改造, 达到优化抗体的目的。

近年来, 利用信息技术剖析生命现象的本质

成为生命科学工作者所关注的焦点, 也由此产生了一门计算机技术与生物学技术相结合的新兴学科——生物信息学。要实现基因工程抗体的定向进化需要充分利用计算机模拟、X 射线衍射 (X-ray)、多维核磁共振 (multidimensional NMR spectroscopy) 等结构测定技术, 通过生物信息学手段分析小分子有机物与抗体相互作用机制, 在此基础上对抗体的基因序列进行修饰、改造, 从而达到改进基因工程抗体的目的。

基因工程抗体要进行体外抗体亲和力成熟, 就必须对体内抗体亲和力成熟原理有深入认识, 模拟亲和力成熟过程中体内存在的变化, 促使基因工程抗体的体外进化, 才是解决问题的关键<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2014-09-26; 接受日期: 2014-10-22

作者简介: 邓 龙, 助理教授, 硕士, 主要从事生物工程与食品质量安全研究。E-mail: gdjldl@163.com。\* 通信作者: 周 思, 工程师, 硕士, 主要从事食品质量安全研究。E-mail: zhou0109@163.com

## 1 小分子有机物—抗体相互作用机制分析

随着抗体信息学的广泛开展,现已经有几种专门针对抗体序列进行分析的数据库及分析工具,如 Kabat 数据库、NCBI 数据库里的 Immunoglobulin BLAST (IgBlast)、VBASE 数据库,以及 IMGT 数据库等。研究者可在获得抗体序列的基础上,利用这些数据库及相应的分析工具进行序列比对以及其他特征的分析。与此同时,在计算机模拟平台上,研究抗原和抗体的相互作用机制,特别小分子有机物和相应的抗体的相互作用机制已经受到了相当大的关注<sup>[2~4]</sup>。近年来,借助同源建模(homology modelling)及 X 射线衍射手段获取抗体模型,并利用分子动力学、定点突变等技术已经对多种小分子有机物和相应抗体的相互作用机制进行了详细的研究(见表 1)<sup>[5~13]</sup>,揭示了小分子有机物和相应抗体的相互作用本质。

抗原与抗体间的特异性结合,可用“模板学说”或“锁与钥匙学说”来描述<sup>[14,15]</sup>。通过分子生物学与 X 射线衍射、多维核磁共振(NMR)等相结

合的大分子结构测定技术,许多抗体大分子或者抗体-抗原复合物的三维结构已被测定<sup>[16,17]</sup>。而对已知一级结构的抗体分子,可采用理论方法、分子模拟方法(如同源蛋白模建方法)预测其三维结构<sup>[18]</sup>。目前应用较多的在线同源模建工作站有 SWISS-MODEL、web of antibody model 和 Rosetta antibody model server 等。获得抗体模型后,借助各种手段来阐明抗原抗体识别机制,可以指导小分子有机物特异抗体的制备,如交叉反应的避免和抗体亲和力的提高等。Hofstetter 等<sup>[19]</sup>分别将氨基酸异构体衍生化后得到的抗原注入动物体内而培养出相应的抗氨基酸的抗体,再将得到的对映异构体的抗体用来识别该氨基酸异构体。而在抗体亲和力的提高上,Scotti 等<sup>[20]</sup>通过分析两个不同亲和力的抗苯基唑酮抗体的基因序列,发现高亲和力抗体和低亲和力抗体的序列基本相同,只存在 9 个氨基酸残基的差异,这些氨基酸残基差异都位于抗体的重链区。通过 X 射线衍射对抗原与抗体结合体进行结构分析,发现表面互补性提高使抗体获得了较高的亲和力,这意味着表面互补性对抗体亲和力的成熟具有重要的作用。

表 1 抗体与小分子相互作用机制研究

Table 1 Studies on the interaction mechanism of antibody and small molecule.

小分子有机物	抗体	抗体结构信息获取	研究手段
二硝基苯	AN02 Fab fragment	X 射线衍射	分子动力模拟
异硫氰酸荧光素	4D5Flu scFv	X 射线衍射	分子动力模拟
莠去津	Fab fragment K411B	同源模建	定点突变技术
雌二醇	scFv	X 射线衍射	定点突变技术
三硝基苯	salmon scFv	同源模建	序列片段分析
p-硝基苯基磷	mature Fab fragments	X 射线衍射	计算化学方法
异硫氰酸荧光素	4-4-20scFv4M5.3scFv	X 射线衍射	定向进化
异硫氰酸荧光素	FlTC-scFv	同源模建	热点残基分析
壬基苯酚聚乙氧基化物	scFv	同源模建	定点突变技术

## 2 基因工程抗体的亲和力成熟研究

抗体的亲和力一般用亲和常数  $K_a$  或者解离常数  $K_d$  来表示,可以反映抗原和抗体的结合程度。抗体亲和力成熟(antibody affinity maturation)是指机体正常存在的一种免疫功能状态。在体液

免疫中,再次应答所产生抗体的平均亲和力高于初次免疫应答,这种现象称为抗体亲和力成熟。这是由于抗体形成细胞本身的基因突变和抗原对 B 细胞克隆的选择性激活。机体的这种功能状态是长期进化和对外界环境不断适应的结果,对机体防御和维持自身免疫监控有着十分重要的意义<sup>[21]</sup>。

随着人们对体内抗体亲和力成熟的深入研究,体外抗体亲和力成熟研究已经成为一个研究热点。由于抗体的成分绝大部分为蛋白质,因此体外抗体亲和力成熟可归属于体外功能蛋白质分子进化的范畴。体外抗体亲和力成熟一般可以采用随机突变编码可变区的基因片段的方法和定向引入突变(site-directed mutagenesis)的方法及近来研究比较热门的基于抗原结合位点结构调整的方法。

### 2.1 随机突变法

采用随机突变编码可变区的基因片段的方法一般又有错配 PCR 法(error-prone PCR)、DNA 改组法(DNA shuffling)和链置换法(chain shuffling)等。错配 PCR 法通过改变 PCR 的条件,使目的基因片段在复制的过程中碱基对发生错误的配对,从而引入突变。Finlay 等<sup>[22]</sup>以随机突变为基础,联合运用错误倾向 PCR、DNA 重组等方法,使亲和力提高了 110 倍。DNA 改组法同样运用随机突变的原理,在获得较大容量的功能蛋白质突变体库的基础上,结合运用相应的快速富集筛选方法(主要是以噬菌体表面展示为主的各种表面展示技术)对突变体进行筛选,最终得到进化的功能蛋白质分子。Kim 等<sup>[23]</sup>结合噬菌体库展示技术通过 DNA 改组把抗体亲和力提高了 9 倍。链置换则依据抗体可变区随机配对的原理,在抗体的一条链保持不变的情况下,将另一条链进行替换,之后从中筛选出高亲和力的抗体分子。Hur 等<sup>[24]</sup>运用链置换技术成功将一个天然抗体的亲和力提高了 36 倍,同时获得了抗体片段在大肠杆菌中的可溶性表达。总体来看,采用随机突变编码可变区的基因片段的方法,随着研究人员的不断改进,该技术有了长足的发展,但是此方法始终有着盲目和随机性的缺点,使得在相关的研究中对突变的结果较难把握。

### 2.2 定向突变方法

采用定向引入突变的方法的前提是对基因及表达的蛋白产物的三维结构和功能等方面的信息有着较为透彻的了解。研究表明,抗体的互补决定区集中在一起形成一个特定的三维结构,其中包含了一个和抗原结合的部位,同时互补决定区突变的频率也最为频繁,通过对抗原抗体结合部位的晶体结构的分析,在一定程度上可提示出哪

些特定部位的氨基酸残基可以优先突变来提高亲和力。近年来,借助计算机软件同源建模技术,在模拟抗原抗体结合过程中的构象及能态的变化基础上有针对性地互补决定区的基因进行突变,已成为一个研究的热点。Akikazu 等<sup>[25]</sup>通过对一株抗乙酰胆碱 Fab 重链 95 位上的酪氨酸进行定点突变,替换成为甘氨酸之后,突变体亲和力提高了 100 倍。对于如何选取针对性的突变点,丙氨酸扫描法(alanine scanning)具有一定的优势。丙氨酸扫描突变采用体外定向突变的策略,通过改变密码子的序列,系统地将丙氨酸置换特殊的氨基酸,然后通过测定抗原抗体解离速率是否下降来确定可进一步优化的氨基酸(optimized residue substitution, ORS),同时对它们进行随机的突变,可筛选得到解离速率最低的氨基酸,最后仅通过选定氨基酸的置换来提高抗体亲和力<sup>[26,27]</sup>。此方法目的明确,绕开了不好选择突变频率的难题,同时避免了随机突变编码可变区基因片段法随意性大的缺点。

### 2.3 基于抗原结合位点结构调整的方法

通过对抗体亲和力成熟的深入研究,已发现抗原结合位点处的氨基酸对抗体亲和力具有显著的作用。Li 等<sup>[28]</sup>首次运用 X 射线晶体衍射技术,通过研究抗原-抗体结合的三维构象来研究抗体亲和力成熟的过程,研究表明,抗原和抗体的结合面积的加大在抗体亲和力成熟过程中并不出现,而可能是抗原结合位点周围的一些氨基酸残基的变化增加了疏水性作用力,从而使抗原和抗体的结合更加紧密,互补性增强。Cauerhff 等<sup>[29]</sup>的研究也表明,抗体亲和力成熟更重要的可能是一些小结构的变化,尤其是分布在抗原结合部位周围一些位点,而这些小的变化使得抗体和抗原结合部位从构象上来说更加契合抗原的三维结构,两者互补性更趋完善。Yau 等<sup>[30]</sup>也发现热点突变对亲和力提高可能是通过突变使得可变区的可溶性和结构方面的物理特性产生了积极的影响,这意味着如果能够充分了解抗体亲和力成熟的过程中真实的结构水平和能量转化上的改变,就能理性地提出对抗体亲和力体外成熟的可控策略。近年来,借助计算机模拟技术,通过同源建模获取抗体模型,并分析抗原抗体结合活性位点,探究抗原与抗体之间的相互作用,并对抗体的氨基

酸序列进行修改,提高抗体亲和力,已经成为一种重要的手段<sup>[31-35]</sup>。

### 3 展望

分子模拟和计算机辅助抗体进化是当前计算科学与生物学相结合研究的重要体现,目前该技术运用主要表现在两个方面:一是用分子动力学模拟方法对抗体进行动态的模拟,借助计算机理论模型和数据库分析,直接从抗体的氨基酸序列预测抗体三维结构以及动力学特征,通过计算模拟抗原和抗体间的分子识别,了解抗体结构与功能的关系;二是通过分子模拟技术充分计算抗原抗体在结合过程中的能量变化,找出二者结合的关键位点及重要的能量变化过程,借助抗体数据库,通过对关键位点的氨基酸的调整,筛选出更加合理的抗体构象,增强抗体的某种属性<sup>[36-38]</sup>。

抗体作为医药、食品安全领域等研究领域重要的“原材料”,其重要性不言而喻。但是,基因工程抗体的广泛应用却受限于其抗原结合能力不强的问题。值得庆幸的是,基因工程抗体容易在分子和基因水平上进行修饰和改造,这为体外进行抗体亲和力成熟提供了可能。另外体外提高抗体亲和力的方法实际上都是模仿体内抗体的成熟过程,随着分子模拟技术的发展,利用分子对接等手段针对基因工程抗体的序列进行改造将为抗体定向进化提供广阔的应用前景<sup>[39-42]</sup>。

通过分子模拟技术对基因工程抗体进行改造仅仅是分子模拟技术运用的一个体现,作为交叉学科的一项重要技术,分子模拟技术在生物学、物理学及材料学等交叉领域的发展仍旧需要我们进一步研究和探索<sup>[43]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 陶俊. 人源性抗 FGF-2 中和性抗体的筛选、表达及鉴定 [D]. 广州:南方医科大学,博士学位论文,2010.
- [2] Iqbal S S, Mayo M W, Bruno J G, *et al.* A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15(11-12): 549-578.
- [3] Vogel V, Thomas W E, Craig D W, *et al.* Structural insights into the mechanical regulation of molecular recognition sites [J]. *Trends Biotechnol.*, 2001, 19(10): 416-423.
- [4] Ramaraja T, Angel T, Dratz E A, *et al.* Antigen-antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1824(3): 520-532.
- [5] Heymann B, Grubmuller H. Molecular dynamics force probe simulations of antibody/antigen unbinding: Entropic control and nonadditivity of unbinding forces [J]. *Biophys. J.*, 2001, 81(3): 1295-1313.
- [6] Paci E, Caffisch A, Pluckthun A, *et al.* Forces and energetics of hapten-antibody dissociation: A biased molecular dynamics simulation study [J]. *J. Mol. Biol.*, 2001, 314(3): 589-605.
- [7] Kusharyoto W, Pleiss J, Bachmann T T, *et al.* Mapping of a hapten-binding site: Molecular modeling and site-directed mutagenesis study of an anti-atrazine antibody [J]. *Protein Eng.*, 2002, 15(3): 233-241.
- [8] Coulon S, Pellequer J L, Blachere T, *et al.* Functional characterization of an anti-estradiol antibody by site-directed mutagenesis and molecular modeling: Modulation of binding properties and prominent role of the V(L) domain in estradiol recognition [J]. *J. Mol. Recognit.*, 2002, 15(1): 6-18.
- [9] Solem S T, Brandsdal B O, Smalas A, *et al.* The primary structure and specificity determining residues displayed by recombinant salmon antibody domains [J]. *Mol. Immunol.*, 2004, 40(18): 1347-1360.
- [10] Ohno K, Wada M, Saito S, *et al.* Quantum chemical study on the affinity maturation of 48G7 antibody [J]. *J. Mol. Struct.*, 2005, 722(1-3): 203-211.
- [11] Midelfort K S, Wittrup K D. Context-dependent mutations predominate in an engineered high-affinity single chain antibody fragment [J]. *Protein Sci.*, 2006, 15(2): 324-334.
- [12] Persson H, Lantto J, Ohlin M. A focused antibody library for improved hapten recognition [J]. *J. Mol. Biol.*, 2006, 357(2): 607-620.
- [13] Nishi K, Goda Y, Fujimoto S, *et al.* Molecular analysis of specificity of anti-nonylphenol polyethoxylate single-chain antibody fragments by grafting and designed point mutations [J]. *Mol. Immunol.*, 2009, 46(15): 3125-3130.
- [14] Fisher D E, Reeves W H, Conner G E, *et al.* Pulse labeling of small nuclear ribonucleoproteins in vivo reveals distinct patterns of antigen recognition by human autoimmune antibodies [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81(10): 3185-3189.
- [15] Wucherpfennig K W, Sethi D. T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity [J]. *Semin. Immunol.*, 2011, 23(2): 84-91.
- [16] Yuriev E, Farrugia W, Scott A M, *et al.* Three-dimensional structures of carbohydrate determinants of Lewis system antigens: Implications for effective antibody targeting of cancer [J]. *Immunol. Cell Biol.*, 2005, 83(6): 709-717.
- [17] Schussek S, Trieu A, Doolan D L. Genome-and proteome-wide screening strategies for antigen discovery and immunogen design [J]. *Biotechnol. Adv.*, 2014, 32(2): 403-414.
- [18] Bonar P, Schneider H P, Becker H M, *et al.* Three-dimensional model for the human Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger, AE1, by homology to the *E. coli* ClC protein. [J]. *J. Mol. Biol.*, 2013, 425(14): 2591-2608.
- [19] Hofstetter O, Lindstrom H, Hofstetter H. Effect of the mobile phase on antibody-based enantiomer separations of amino acids in high-performance liquid chromatography [J]. *J. Chromatogr.*

- A, 2004, 1049(1-2):85-95.
- [20] Scotti C, Gherardi E. Structural basis of affinity maturation of the TEPC15/Vkappa4.1 anti-2-phenyl-5-oxazolone antibodies [J]. *J. Mol. Biol.*, 2006, 359(5):1161-1169.
- [21] 林周, 黎燕, 沈倍奋. 体外抗体亲和力成熟的几种策略 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2004, (3):292-294.
- [22] Finlay W J, Cunningham O, Lambert M A, *et al.*. Affinity maturation of a humanized rat antibody for anti-RAGE therapy: Comprehensive mutagenesis reveals a high level of mutational plasticity both inside and outside the complementarity-determining regions. [J]. *J. Mol. Biol.*, 2009, 388(3):541-558.
- [23] Kim S J, Jang M H, Ahn H J, *et al.*. Selection of an affinity-matured antibody against a defined epitope by phage display of an immune antibody library [J]. *J. Mol. Biol.*, 2008, 329(1-2):176-183.
- [24] Hur B U, Choi H J, Song S Y, *et al.*. Development of the dual-vector system-III (DVS-III), which facilitates affinity maturation of a Fab antibody *via* light chain shuffling [J]. *Immunol. Lett.*, 2010, 132(1-2):24-30.
- [25] Murakami A, Takahashi Y, Nishimura M, *et al.*. The amino acid residue at position 95 and the third CDR region in the H chain determine the ceiling affinity and the maturation pathway of an anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl antibody [J]. *J. Mol. Biol.*, 2010, 48(1-3):48-58.
- [26] Lewis C M, Hollis G F, Mark G E, *et al.*. Use of a novel mutagenesis strategy, optimized residue substitution, to decrease the off-rate of an anti-gp120 antibody [J]. *Mol. Immunol.*, 1995, 32(1415):1065-1072.
- [27] Wang W B, Guan M, Liu Y, *et al.*. Alanine scanning mutagenesis of hepatitis C virus E2 cysteine residues: Insights into E2 biogenesis and antigenicity [J]. *Virology*, 2014, 448(5):229-237.
- [28] Li Y, Li H, Yang F, *et al.*. X-ray snapshots of the maturation of an antibody response to a protein antigen [J]. *Nat. Struct. Biol.*, 2003, 10(6):482-488.
- [29] Cauerhff A, Goldbaum F A, Braden B C. Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(10):3539-3544.
- [30] Yau K Y, Dubuc G, Li S, *et al.*. Affinity maturation of a V(H) H by mutational hotspot randomization [J]. *J. Immunol. Methods*, 2005, 297(1-2):213-224.
- [31] Chang L, Zhou C, Xu M, *et al.*. Interactions between anti-ErbB2 antibody A21 and the ErbB2 extracellular domain provide a basis for improving A21 affinity [J]. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2010, 24(1):37-47.
- [32] Malik A, Firoz A, Jha V, *et al.*. Modeling the three-dimensional structures of an unbound single-chain variable fragment (scFv) and its hypothetical complex with a *Corynespora cassiicola* toxin, cassiicolin [J]. *J. Mol. Model*, 2010, 16(12):1883-1893.
- [33] 宋健, 徐俊杰, 魏景艳, 等. 通过快速定点突变表征人源含硒单链抗体酶的底物结合部位 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, (3):502-506.
- [34] 薛景文, 田玉玲. 基于改进克隆选择算法的云计算任务调度算法 [J]. *计算机应用与软件*, 2013, (5):167-170.
- [35] 常亮. 基于计算模拟的抗 HerZ 抗体 A21 的亲和力及人源化改造 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 博士学位论文, 2013.
- [36] 王进安, 邵强, 朱维良. 分子模拟的发展及应用 [J]. *科学*, 2014, (1):11-13.
- [37] 杨文明. 表面分子印迹聚合物的制备与性能研究及计算机辅助设计 [D]. 江苏苏州: 苏州大学, 博士学位论文, 2013.
- [38] 吕芳. 四种三苯甲烷类化合物分子模拟及其抗原抗体构效关系研究 [D]. 山东青岛: 中国海洋大学, 硕士学位论文, 2013.
- [39] 邓龙, 肖治理, 董洁娴, 等. 基于定点突变的抗克百威单链抗体的亲和力成熟 [J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(11):2486-2491.
- [40] 张顶. DEC-205 靶向抗体的制备及其人源化改造 [D]. 北京: 北京协和医学院, 博士学位论文, 2013.
- [41] Wu H, Chen S, Liu M, *et al.*. Molecular characterization and evolutionary analysis of horse BAFF-R, a tumor necrosis factor receptor related to B-cell survival [J]. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, 18(1):163-168.
- [42] Wang R, Huang A, Liu L, *et al.*. Construction of a single chain variable fragment antibody (scFv) against tetrodotoxin (TTX) and its interaction with TTX [J]. *Toxicon*, 2014, 83(1):22-34.
- [43] 王伟华, 雷红涛, 孙远明. 分子模拟技术在小分子免疫检测方法研究中的应用 [J]. *现代食品科技*, 2010, 26(1):102-108.