

## 两株中和性抗 hTNF $\alpha$ 单抗可变区与 hTNF $\alpha$ 相互作用的计算机模拟及实验研究

陈建军 孙 苗<sup>1</sup> 方 佳<sup>1</sup> 刘 惠<sup>1</sup> 陈常庆<sup>1\*</sup> 王德宝<sup>2</sup>

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233) (中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

**摘 要** 在 SGI 图形工作站上,用同源蛋白结构预测的方法,建立了 2 株中和性抗 hTNF $\alpha$  小鼠单抗(1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>, 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>)可变区的三维结构模型,并在实验研究 2 株单抗表位特异性的基础上,根据 2 株单抗与 hTNF $\alpha$  分子表面的形状、静电性、疏水性、氢键等性质,对 2 株单抗可变区与 hTNF $\alpha$  分子的可能结合模式进行了模拟和分析。再根据结合模型,设计并制备了 2 个 hTNF $\alpha$  突变体,然后从实验与计算机模拟两方面着手,对比研究了 hTNF $\alpha$  突变前后与两株单抗的结合能力与结合方式的变化。对比研究结果支持了结合模型,该结合模型的建立,为下一步的抗体人源化或小分子化改造等打下了基础。

**关键词** 人肿瘤坏死因子- $\alpha$  单克隆抗体可变区 三维结构模型 抗原-抗体相互作用 结合位点分析 突变

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0036-06

人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (hTNF $\alpha$ )是一种具有复杂生物学活性的细胞因子<sup>[1]</sup>。当体内 hTNF $\alpha$  水平异常升高时,即可介导多种疾病和炎症反应<sup>[2,3]</sup>。动物实验证明,中和性抗 hTNF $\alpha$  单抗可用于阻断 hTNF $\alpha$  引起或介导的多种疾病和炎症反应(如败血性休克、类风湿性关节炎以及移植器官异体排斥反应等)。但鼠源单抗用于临床时有许多弊端<sup>[3]</sup>,因而人们希望对鼠源单抗进行人源化或有机小分子化等改造,以便更好地用于临床。这样,人们就很希望了解中和性抗 hTNF $\alpha$  单抗与 hTNF $\alpha$  的作用方式,以指导鼠源单抗的改造工作。

由于生物大分子(尤其复合物)晶体的培养及解析等都很不容易,因而通过实验方法来快速获取抗原与抗体的相互作用的模型变得相当困难。近年来,利用计算机技术模拟研究抗原与抗体的相互作用备受人们青睐。鉴于抗体序列和结构的高度保守性,根据“同源蛋白结构预测”的方法,已经能得到准确率很高的结构模型。但由于目前没有比较可靠的分子对接(docking)软件来预测抗原-抗体的结合方式,因而人们一般采用以能量为指导人工操作的方法来模拟分子之间的相互作用。由于分子之间的结

合位点很难仅通过分析 2 分子的结构模型来确定,对于如何提高对分子间结合位点的判定,本文进行了尝试。

我室于 1995 年制备了 2 株中和性抗 hTNF $\alpha$  鼠源单抗(1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>, 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>)<sup>[4]</sup>,并于 1997 年克隆了这两株单抗的可变区基因,然后进行了序列测定和分析<sup>[5]</sup>。为了研究 hTNF $\alpha$  与这两株抗体的相互作用方式,我们在 SGI 图形工作站上用同源蛋白结构预测方法<sup>[6]</sup>构建了这两株单抗可变区的三维结构模型。并在实验研究两单抗表位特异性的基础上,结合计算机分析预测了抗原-抗体的分子对接位点,然后根据结合模型,设计并制备了两株 hTNF $\alpha$  突变体,从实验和计算机模拟两方面着手,对比研究了 hTNF $\alpha$  突变后与两株单抗的结合能力和结合方式的变化。实验结果支持了我们构建的结合模型。该结合模型的建立,为下一步鼠源单抗的人源化或有机小分子化改造工作打下了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 氨基酸序列:抗 hTNF $\alpha$ 单抗 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>、3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>

收稿日期:1999-01-04,修回日期:1999-07-06。

基金项目:国家高技术研究与发展(九·五)计划项目(103-13-01-01)。

\* 联系人:Tel:021-64700892-307, Fax:021-64700244。

的轻、重链可变区氨基酸序列是由已克隆的可变区 cDNA 序列翻译得到<sup>[5]</sup>;所利用的已知晶体结构的抗体可变区氨基酸序列分别来自相应的 PDB 文件。

**1.1.2 抗原 hTNF $\alpha$  和同源抗体可变区的晶体结构:**抗原 hTNF $\alpha$  和同源抗体或变区的晶体结构的原子坐标数据均取自相应的 PDB 文件(Protein Data Bank, Brookhaven National Lab, April, 1996)。

**1.1.3 硬、软件:**在 SGI Indigo 图形工作站上,运用 Tripos 公司的 SYBYL6.2 分子设计软件<sup>[7]</sup>和中国科学院上海生物化学研究所丁达夫研究组编制的蛋白质结构检测软件<sup>[8]</sup>。

**1.1.4 hTNF $\alpha$ 及其单抗与受体:**hTNF $\alpha$  基因及其原核高效表达载体 pSB92 为本室保存,所用 hTNF $\alpha$  蛋白及抗 hTNF $\alpha$  单抗(1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>、3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>)<sup>[4]</sup>均由本室制备,受体细胞 L929 亦为本室保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 抗 hTNF $\alpha$  单抗的轻、重链可变区的三维结构模型的建立:**单克隆抗体的轻、重链三维结构模型是在 SGI Indigo 图形工作站上用 SYBYL 分子模拟软件系统的 COMPOSER 模块进行建模的。首先,用序列/序列联配的方法,找出与轻、重链有同源关系的已知晶体结构的蛋白链,这些蛋白分子与单抗的序列同源性一般在 56.7%~83.5%;通过对已知结构的同源蛋白的结构联配,确定出单抗可变区部分的保守区和环区,再分别确定出保守区和环区的 C $\alpha$  的空间位置,并建立二硫键。随后对上述建模的单抗轻、重链安装侧链、氢原子和电荷,并调整侧链、Proline 和酰胺侧链。

根据同源性的、结构和序列联配的结果等因素,确定各单抗的模板蛋白,将抗体的轻、重链分别与模板分子的轻、重链进行叠合,以确定单抗中轻、重链的相对位置。叠合的 RMS 值,轻链一般在 0.05~0.2nm,重链在 0.1~0.4nm 范围。将这些单抗的初始结构模型进行调整以消除立体上的碰撞及不合理的构象,最后经分子动力学和分子力学优化等处理,得到最终的单抗结构模型。

**1.2.2 单抗可变区结构模型的检测:**为检验建模的两株单抗三维结构的可信度,使用中国科学院上海生物化学研究所编制的蛋白结构检测软件 ASSESSOR、STEREOCHK 等对建模的抗体结构模型进行了整体折叠的可靠性、局部区域的可靠性以及立体化学参数的检测<sup>[8,9]</sup>。

**1.2.3 两单抗的抗原结合位点(表位)特异性的测定:**采用竞争抑制法,测定两株抗 hTNF $\alpha$  单抗的抗

原结合位点(表位)。将 hTNF $\alpha$  包被于微孔板 200ng/100 $\mu$ L/孔,再将 50 $\mu$ L 工作浓度的 HRP-3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>(HRP-1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>)和 50 $\mu$ L 系列稀释(1:5<sup>n</sup>)的未标记单抗 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>(3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>)同时加入每一孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗涤后加入底物溶液显色,并测 A<sub>415</sub> 值。反应结果以未标记单抗的稀释度为横坐标,以 A<sub>415</sub> 值为纵坐标作图。

**1.2.4 受体结合竞争抑制实验:**将培养中的 L929 细胞分入 96 孔培养板 3 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔,培养过夜。弃上清,加入 0.05%戊二醛 50 $\mu$ L/孔,室温 15min。洗涤后加入含 0.5%BSA 的 PBS 100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h。洗涤后加 hTNF $\alpha$  和 hTNF $\alpha$  单抗的混合液,4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤后加入酶标记兔抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 1h,洗涤,余同常规 ELISA。反应结果以 A<sub>415</sub> 值表示。同时设定阳性与阴性对照。

**1.2.5 hTNF $\alpha$ 与两株抗体的结合模型的建立:**在研究上述两实验结果的基础上,并结合单抗 CDRs 表面和 hTNF $\alpha$  分子表面的形状、静电性、疏水性以及氢键作用等特征,在能量的指导下分别将两株单抗可变区与 hTNF $\alpha$  分子进行对接。初始结合模型能量较高,需要进行能量优化。在 AMBER 力场中<sup>[7]</sup>,首先对结合模型进行 1000 步最陡下降法优化,然后用共轭梯度法优化 1000 步,最后对其进行分子动力学优化,选取能量最低、结构合理的作为最终的结合模型。随后对上述结合模型进行了检测和结合能的计算<sup>[8,9]</sup>。

**1.2.6 hTNF $\alpha$ 突变体的设计和其与单抗相互作用的模拟研究:**在分析了 hTNF $\alpha$  与单抗结合模型的基础上,设计了 2 个 hTNF $\alpha$  突变体,并用模拟残基突变的方法分析了 hTNF $\alpha$  突变后与两株单抗的作用情况。随后,采用 Over-lapping PCR 方法制备了这两个 hTNF $\alpha$  突变体,具体实验方法参见文献<sup>[10]</sup>,突变体基因的 DNA 序列测定由上海基康生物工程公司用 ABI377 型自动测序仪完成。

**1.2.7 hTNF $\alpha$  突变前后与抗体亲和力的检测:**用原核高效表达载体 pSB92 表达了 hTNF $\alpha$  的野生型及突变体的基因,表达产物经分离纯化,纯度达到 85%以上。然后将 hTNF $\alpha$  的野生型及突变体蛋白分别包被于微孔板(200ng/100 $\mu$ L/孔),再分别用梯度稀释(1:5<sup>n</sup>)的酶标单抗(1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>、3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>)结合,显色后测 A<sub>415</sub> 值。

## 2 结果

根据前面所述方法,构建得到了两株抗 hTNF $\alpha$  单抗(1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>、3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>)可变区的分子结构模型(图1)。它们具有抗体的基本结构特征:在2株单抗结构中,轻、重链上的两个二硫键,键长适当,起到稳定结构的功能。此外,轻、重链之间形成许多氢键,这对稳定单抗的结构很有帮助。每个单抗的轻、重链结合区形成一个“洞”,而在抗体的锥形结构的锥顶

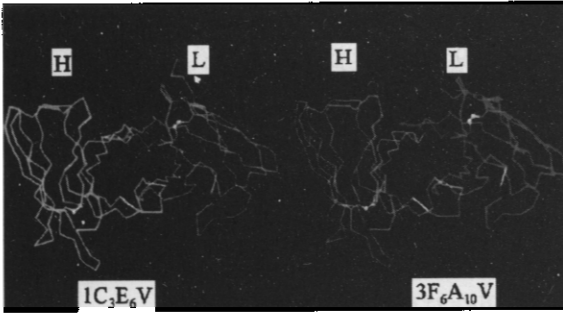


图1 两株抗 hTNF $\alpha$  单抗 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 和 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 的可变区的三维结构模型

Fig. 1 Computer-generated stereoscopic diagrams of 3D structure models for two anti-hTNF $\alpha$  McAbs, 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> and 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> variable regions

Oval Ca backbones of two McAb models are displayed and the disulfide bonds are indicated as yellow 'ball and stick' connections between the appropriate carbon and sulfur atoms.

“洞口”处主要由抗体可变区 CDRs (Complementary Determining Regions)组成,这就是抗原的结合部位。

## 2.2 单抗可变区空间结构模型的检测结果

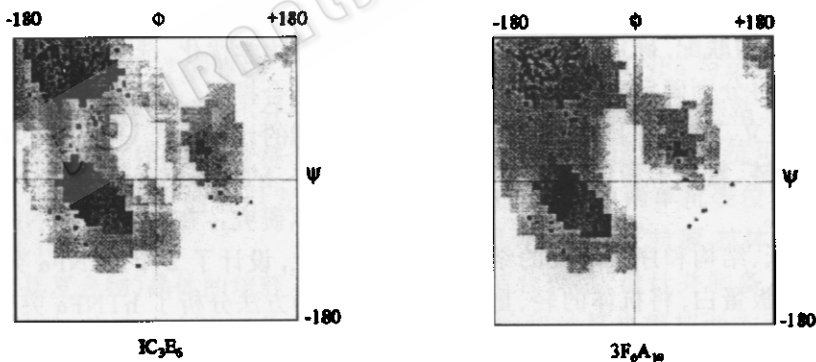
从检测所得的 Ramachandran 构象图(图 2a)可知,1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>、3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>的主链二面角  $\phi$ - $\psi$ 94.6%~96.8%落在核心区区和允许区,表明上述的单抗结构的立体化学基本合理。由结构评估分数图(图 2b)可知,它们的兼容性剖面分数均高于零线,表明它们的三维结构与序列兼容性较好<sup>[6,8]</sup>。从抗体的结构特征、结构合理性评估等来看,建模的2株单抗 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>、3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>的可变区三维结构是合理的。

## 2.3 两株单抗的抗原结合位点(表位)特异性的测定

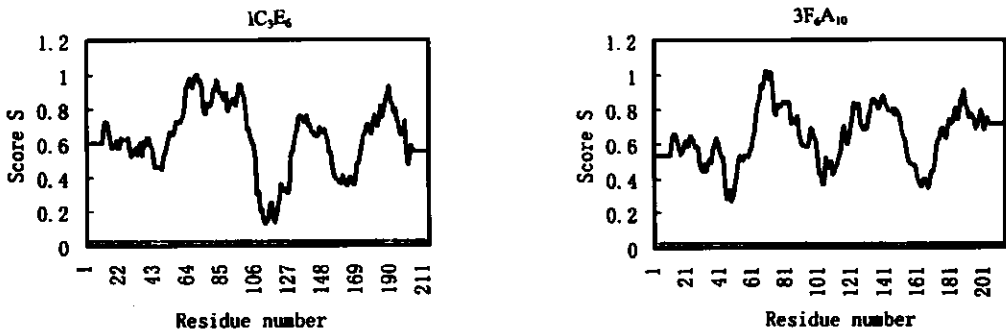
实验结果如图 3。由图可知,两株单抗 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 和 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>在结合 hTNF $\alpha$  时无竞争性,说明它们应当分别结合于 hTNF $\alpha$  上空间位置相隔较远的两个区域。

## 2.4 受体结合竞争抑制实验

受体结合竞争抑制实验结果(图 4)表明,两株单抗均能阻断 hTNF $\alpha$  与受体 mTNFR1 的结合,说明2株单抗在 hTNF $\alpha$  上的结合位点就在 hTNF $\alpha$  的受体结合区域或其邻近区域。而由文献[11~13]可知,hTNF $\alpha$  的 29~36、80~90 及 138~150 三个



2a Ramachandran plot about main chain dihedral angles of 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> and 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> variable region models



2b Profile-3D verified the compatibilities of 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> and 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> models with their own amino acid sequences

图2 两株抗 hTNF $\alpha$  单抗模型的结构检测

Fig. 2 Structure evaluation results represented by ramachandran and profile-3D plot for 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> and 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> models

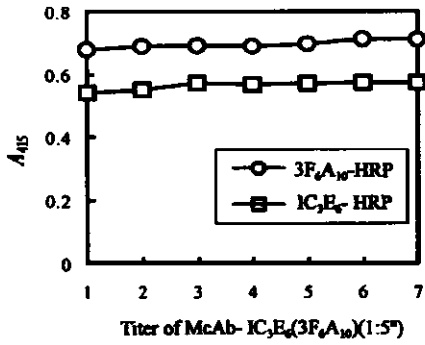


图 3 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>和 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 的竞争结合实验

Fig. 3 Competitive binding reaction of 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> and 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> to hTNF $\alpha$

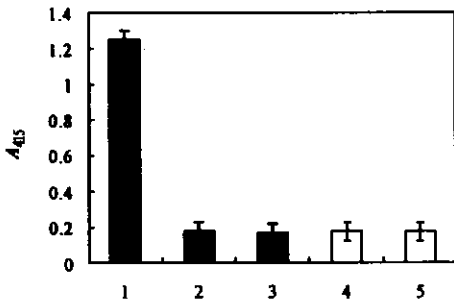


图 4 hTNF $\alpha$  受体结合竞争抑制实验

Fig. 4 The ability of two McAb to inhibit hTNF $\alpha$  binding to its receptor (TNFR I)

1. Positive control
2. 10 $\mu$ L 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>(1:5 dilution) + 90 $\mu$ L hTNF $\alpha$ (0.1ng)
3. 10 $\mu$ L 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>(1:5 dilution) + 90 $\mu$ L hTNF $\alpha$ (0.1ng)
4. 10 $\mu$ L 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>(1:5 dilution) + 90 $\mu$ L BSA-pBS(0.5%)
5. 10 $\mu$ L 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>(1:5 dilution) + 90 $\mu$ L BSA-pBS(0.5%)

loop 区是 hTNF $\alpha$  与受体 mTNFR I 相结合的主要部位。因此,这 2 株单抗也很可能分别结合于 hTNF $\alpha$  的 3 个 loop 区之一或其邻近区域。

### 2.5 hTNF $\alpha$ 与两株抗体的结合模型的构建及分析

通过对抗体表位特异性实验和受体结合竞争抑制实验的结果分析,我们认为 2 株单抗可能结合于 hTNF $\alpha$  三个 loop 区(或邻近区域)中相距较远的两个区域。再通过分析抗体 CDRs 表面和 hTNF $\alpha$  分子表面的形状、静电性、疏水性以及氢键作用等特征,发现 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 的 CDRs 表面与 hTNF $\alpha$  的 29~36 loop 区在理化特性方面能很好地吻合,3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 则在 80~90 loop 区更匹配,而且当这 2 株单抗分别结合于 hTNF $\alpha$  的上述两个区域时,两单抗之间不会发生碰撞。在能量的指导下分别将 2 株单抗可变区与 hTNF $\alpha$  分子上相应区域进行对接。然后对初始结合模型进行分子动力学和分子力学优化,得到最终的结合模型。对上述结合模型进行了结合能的计算,发现上述模型的抗原-抗体结合标准自由能都在 -50~-60kJ/mol 之间,这符合一般抗原-抗体结合的能量变化规律(抗原与抗体结合的标准自由能一般在 -25.08~-62.7kJ/mol 之间)<sup>[14]</sup>。此外,还应用中国科学院上海生物化学研究所编制的蛋白质结构检测软件进行了检测<sup>[6]</sup>,结果表明所构建的结合模型是合理的。另外,我们还将两单抗的上述结合区域进行了置换,或将 2 单抗分别结合于其他的可能位点,再接前述方法进行模拟、优化和检测,但结果都不理想,因此,我们选取上述模型为比较理想的结合模型。由该结合模型可知,2 株单抗可变区分别与 hTNF $\alpha$  形成了氢键、静电(图 5)和疏水等作用。

此外,在 hTNF $\alpha$  与 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 形成的复合物中,抗体的 L/Phe 29, L/Tyr 91, L/Pro 92 和 H/Tyr 46, H/Tyr 99, H/Tyr 102, H/Phe 103 等残基组成的疏

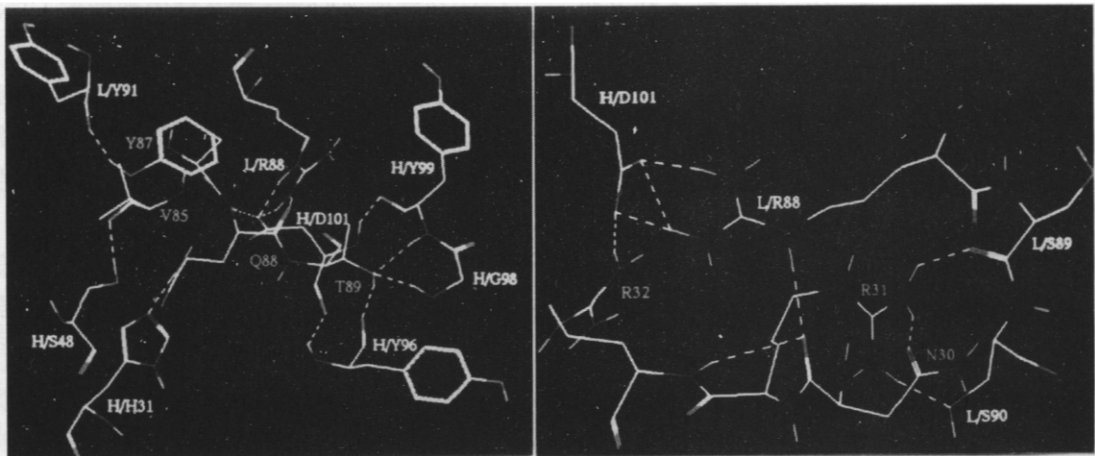


图 5 两株单抗与 hTNF $\alpha$  的相互作用

Fig. 5 Interactions between hTNF $\alpha$  and its two McAbs

水空穴将抗原的疏水残基包围在内,且 H/Phe 103 和 L/Phe29 的侧链苯环分别与 hTNF $\alpha$  的 Ala35 和 Leu29 靠得很近,形成较强的疏水作用;另一个复合物中亦有类似情况。由上可知,抗体除了与 hTNF $\alpha$  的 loop 区结合外,还与 loop 区邻近的残基结合,而 hTNF $\alpha$  主要与抗体 CDRs 区相结合。从结合模型可知,这 2 株中和性单抗之所以能阻断 hTNF $\alpha$  的生物学活性是因为它们占据了 hTNF $\alpha$  上的受体结合位点,这与前面的受体结合竞争抑制实验的结果保持一致。另外,由 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 和 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 与 hTNF $\alpha$  三体结合的相对位置关系图(图 6)可见,当 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 结合于 80~90 位,而 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 结合于 29~36 位时,由于它们的结合位点相距较远,因而不会发生碰撞,由此可以从结合模型上推测出二者将非竞争性地结合 hTNF $\alpha$ ,这也与前面的抗体特异性表位实验结果相吻合。以上均说明了我们所得到的结合模型与预期的相符。

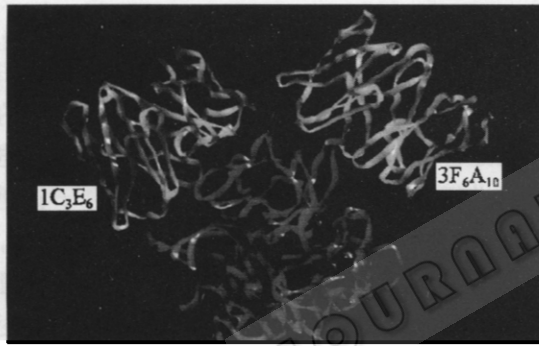


图 6 两株单抗可变区与 hTNF $\alpha$  的结合图

Fig. 6 Ribbon drawing of two McAbs(1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub>, 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>) binding to the different positions of hTNF $\alpha$

## 2.6 hTNF $\alpha$ 突变体的制备及突变体与抗体结合模型的构建、优化和分析

为了进一步验证结合模型的可能性,又在分析结合模型的基础上,设计并制备了 M1(T89A)和 M2(R32W)突变体。并对突变后的 hTNF $\alpha$  与两单抗可变区的结合进行了模拟和分析。从 hTNF $\alpha$  突变前后与两单抗可变区的作用的变化可知(图 7),hTNF $\alpha$  的 Thr89 与 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 重链 CDR3 的 Tyr96、Gly98、Tyr89 及其轻链 CDR3 的 Arg88 有氢键或静电作用,当 hTNF $\alpha$  的 Thr89 突变为 Ala 后,这些作用消失,这必然导致 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 与突变体 M1 的结合能力下降。同样,hTNF $\alpha$  的 Arg32 与 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 的重链 CDR3 的 Asp101 和 Tyr99 分别产生氢键和静电作用,当 Arg32 突变为 Trp 后,这些作用亦消失,而导致突变体 M2 与 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 的结合能力下降。

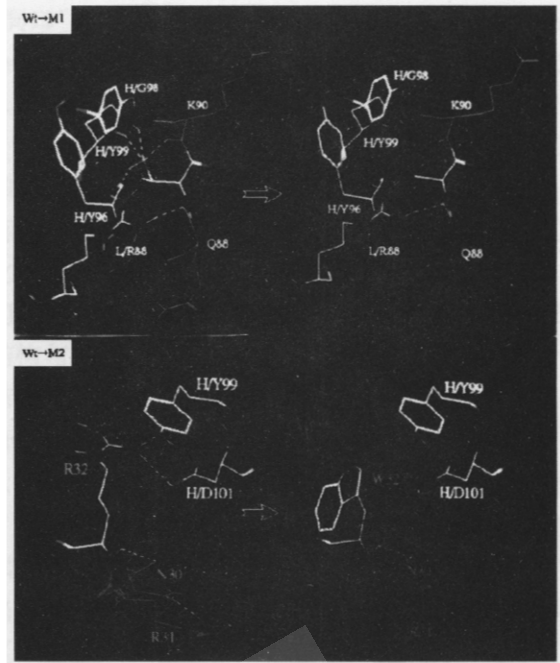


图 7 hTNF $\alpha$  突变前后与两单抗的结合模型的变化

Fig. 7 Changes of interactions between McAbs and hTNF $\alpha$  or its mutants

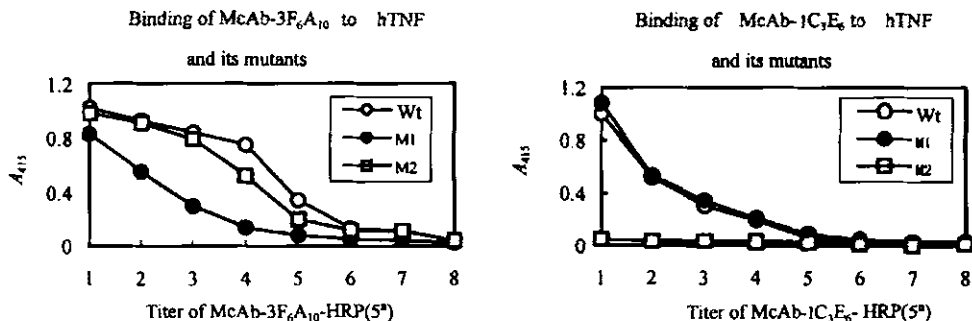
## 2.7 hTNF $\alpha$ 突变前后与抗体亲和力的检测

实验结果如图 8。与野生型相比,M1 同 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 的结合能力下降较大,而与 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 的结合能力则基本不变;M2 同 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 的结合能力下降很大,而与 3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub> 的结合能力只略有变化。因此,抗体亲和力检测的结果根据计算机模型分析得到的结论比较吻合,从而说明构建的结合模型是比较可靠的。

## 3 讨 论

一般而言,中和性单抗都是通过阻断抗原与其受体的结合来阻断抗原生物学活性的,但徐军等人<sup>[15]</sup>却发现他们制备的 3 株中和性抗 hTNF $\alpha$  单抗均不能阻断 hTNF $\alpha$  与其受体(mTNFR1)的结合,可见不能认为中和性单抗都结合于抗原上的受体结合位点,因此,在本研究中还进行了受体结合竞争抑制实验,确证了 2 株中和性单抗均结合于抗原上的受体(mTNFR1)结合位点。

用计算机模型来指导蛋白质工程研究获得成功的例子已经很多,如 Takasaki 等人<sup>[16]</sup>根据 hTNF $\alpha$  与受体 R55 结合的计算机模型设计了一系列环状多肽类似物,这些化合物都能竞争抑制 hTNF $\alpha$  与受体 R55 的结合,并能阻断 hTNF $\alpha$  的活性。因此,构建 hTNF $\alpha$  与其中和性抗体结合的计算机模型也是为了更快更有效地指导下一步对鼠源单抗 1C<sub>3</sub>E<sub>6</sub> 和

图 8 hTNF $\alpha$  及其突变体与两单抗的结合实验Fig. 8 Binding of McAbs to hTNF $\alpha$  and its mutants

3F<sub>6</sub>A<sub>10</sub>的人源化和小分子化改造工作。

为了验证结合模型的可靠性,我们设计并制备了两个 hTNF $\alpha$  突变体,实验结果支持了我们构建的结合模型。对抗原与抗体之间相互作用的预测,目前仍存在许多困难,最关键的问题是结合位点的确定。本文在实验研究的基础上,再结合计算机模拟

分析的结果来确定抗原-抗体相互作用的位点的方法,对今后类似的工作提供一种思路。

**致谢** 中科院上海生物化学研究所汤海旭博士、梁卫平工程师和丁达夫研究员在分子模型检测方面给予了帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Weil D. *Eur Cytokine Network*, 1992, 3:347~352
- [2] Fiers W. *FFBS Lett*, 1991, 285:199~212
- [3] Tracey K J *et al. Nature*, 1987, 330:662~667
- [4] 顾文勤. 单克隆抗体通讯, 1995, 11:79~81
- [5] 陈建军. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(3):8~13
- [6] 来鲁华主编. 蛋白质的结构预测与分子设计, 北京:北京大学出版社, 1993
- [7] SYBYL Molecular Modeling Software Manual, TRIPOS Associates, Inc. Veresion 6.1 A, 1995
- [8] 张宝洪, 丁达夫. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28(4):335~345
- [9] 丁达夫. 生物物理学报, 1995, 11:416~428
- [10] Sambrook J *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Ostade X Van *et al. Eur J Biochem*, 1994, 220:771~779
- [12] Yangishi J I *et al. Protein Engineering*, 1990, 3:713~719
- [13] Banner D W *et al. Cell*, 1993, 73:431~445
- [14] 李 惟, 刘兰英主编. 蛋白质结构基础. 吉林:吉林大学出版社, 1990
- [15] 徐 军. 上海免疫学杂志, 1992, 12(2):65~66
- [16] Takasaki W *et al. Nature Biotechnology*, 1997, 15:1266~1270

## Computer Modeling and Experimental Research of Interactions between Two Anti-hTNF $\alpha$ Monoclonal Antibody Variable Regions and hTNF $\alpha$

CHEN Jian-jun<sup>1</sup> SUN Miao<sup>1</sup> FANG Jia<sup>1</sup> LIU Hui<sup>1</sup> CHEN Chang-qing WANG De-bao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Shanghai Research Centre of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

<sup>2</sup>(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**Abstract** On SGI workstation, we constructed two anti-hTNF $\alpha$  McAbs by means of homologous protein-structure-prediction method. And then, on the basis of relative experimental results and the surface properties of hTNF $\alpha$  and two McAbs, we performed the docking of hTNF $\alpha$  into two anti-hTNF $\alpha$  McAbs. In order to confirm the models, we prepared two hTNF $\alpha$  mutants designed according to the binding models, analysed and predicted the possible changes in complexes resulted from hTNF $\alpha$  mutations. The experimental analysis results proved these complex models. This will make the base of our next antibody humanization and/or reshape work.

**Key words** hTNF $\alpha$ , variable region of mAb, 3D structure model, Ag-Ab interaction, binding-site assay, mutation