DOI: 10.22092/vj.2017.110460.1306
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

دانش نوین بیوانفورماتیک آنتی‌بادی‌ها جهت اکتشافات دارو – درمانی و تشخیصی

• **محمدمهدی رنجبر**
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **سعیدعطائی کچوئی (نویسنده مسئول)**
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **نایبعلی احمدی**
مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
• **خدایار قربان**
گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اجا، تهران، ایران
• **محمدحسن متدین**
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **نجمه معتمد**
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۲-۰۲-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۰۲-۰۵-۱۳۹۶
Email: ataei111@hotmail.com

چکیده

از زمان پیدایش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAbs) انقلابی در پزشکی در زمینه کیت‌های تشخیصی و داروهای درمانی رخ داده است. یکی از زمینه‌های پیشرفته و رو به ترقی روزافزون در حوزه علم ایمونوانفورماتیک، بیوانفورماتیک آنتی‌بادی‌ها می‌باشد. این زمینه شامل: طراحی آنتی‌بادی، مدلینگ به روش‌های مختلف، بهینه‌سازی و بلوغ افینیتی، داکینگ(Docking)، انسانی‌سازی و کاهش ایمنی‌زایی، پایداری، رفع عیوب مخرب ساختار آن و به کارگیری پایگاه‌های داده در مقیاس صنعتی در جهت مصارف دارویی-درمانی و تشخیصی است. بیوانفورماتیک آنتی‌بادی یکی از پیچیده و دشوارترین مباحث در طراحی‌های فوق پیشرفته است که در آینده نزدیک صنعت دارویی و تشخیصی را دگرگون خواهد کرد. هم اکنون نیز داروهایی با این فن‌آوری معرفی شده و با کارائی بالا در حال استفاده می‌باشند. این مقاله مروری به ابعاد مختلف این فرایند با به کارگیری علم بیوانفورماتیک پرداخته و برای اولین بار تلاش می‌نماید محققان ایرانی شاغل در علوم پایه زیستی و دارویی را با حوزه‌های مختلف این زمینه علمی و چالش‌های آن آشنا بنماید.

کلمات کلیدی: بیوانفورماتیک آنتی‌بادی، مونوکلونال آنتی‌بادی، مدل‌سازی لوپ CDR H3

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 2-15

Novel Antibody informatics knowledge in therapeutic-drug discovery and diagnosis

By: Ranjbar, M.M., Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi vaccine & Sera institute, Karaj, Iran. Ataei Kachooei, S., (Corresponding Author), Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi vaccine & Sera institute, Karaj, Iran. Ahmadi, N.A., Proteomics Research Center, and Dept. of Medical Lab Technology, Faculty of Paramedical Sciences, ShahidBeheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Ghorban, Kh., Dept. of Immunology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Motedayen, M.H., Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi vaccine & Sera institute, Karaj, Iran. and Motamed, N., Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi vaccine & Sera institute, Karaj, Iran.

Email: ataei111@hotmail.com

Received: 2017-05-02 Accepted: 2017-07-24

By rising of Monoclonal antibodies (mAbs), it has been revolutionized medical sciences in fields of diagnostic kits and therapeutics drugs. One of well developed and increasing progressive field in immunoinformatic science is antibody bioinformatics. This field includes: designing of antibodies, modeling by different methods, refinement and affinity maturation, docking, humanization and reducing immunogenicity, stability, troubleshooting of structural degeredent and application of databases in industrial scale for drug-therapeutics and diagnostic usages. Antibody bioinformatics is one of complex and hardwork topics in highly profeesional designing which in near future will chage drug industry and diagnostics. Even now these drugs are introduced with this technique and using with high efficacy. Current review article explains on different aspects of bioinformatics and for first time tries to introduce Iranian researchers, engaged in different disciplines in basic biology sciences and pharmacology and its challenges.

Key words: Antibody bioinformatics, Monoclonal antibodies, Loop modelling of CDRH3

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری‌های تجربی به محققان اجازه دسترسی سریع به مقادیر بسیار زیادی از داده از طریق گستره‌ای از روش‌های بیولوژی مولکولی را داده است. این دانش مستخرج از داده‌ها می‌بایست به یک دانش مبتنی بر مدل تبدیل شود. شرکت‌های داروئی می‌بایست دسته داده‌های بزرگ بیولوژیکی را بررسی کنند، بدین سبب که بیولوژی مولکولی به طور چشم‌گیری در کشف دارو، توسعه و ساخت آن دخیل است(۱). با این وجود هزینه گزافی که می‌بایست صرف این پیشرفت سریع شود از سازگار شدن یک کمپانی با طیف وسیع داده‌های بیولوژیی به طور موثر جلوگیری می‌کند. البته تلاش‌هایی جهت همکاری در این امر در حال انجام است. به عنوان مثال با توجه به اینکه خرید آنتی‌بادی‌های درمانگر در حال افزایش است، انستیتو EMBL بیوانفورماتیک اروپا یا EMBLEBI (the EMBL European Bioinformatics Institute) بر روی خصوصیات آنتی‌بادی و بیوانفورماتیک آن در جهت اهداف پژوهشی و صنعتی تمرکز کرده است. چهار مورد از ۱۰ داروی پرفروش از اکتبر ۲۰۱۲ تا سپتامبر ۲۰۱۳، فرآورده‌های بیولوژیکی بوده‌اند و معرفی شبه‌زیستی‌ها (Biosimilars) سبب شده این شرایط حتی بیشتر مورد توجه قرار گیرند (۱). بیوانفورماتیک آنتی‌بادی (Antibody bioinformatics) بخشی از علم ایمونوانفورماتیک (۲، ۳) است که به مفاهیم ایمونولوژی، ابزارهای مدل‌سازی، بهینه‌سازی و بلوغ افینیتی، داکینگ، انسانی‌سازی و کاهش ایمنی‌زایی، پایداری، رفع عیوب مخرب ساختار آن و به کارگیری پایگاه‌های داده آنتی‌بادی مربوط می‌شود و از این رو به بررسی، اکتشاف و آنالیز خصوصیات ویژه آنتی‌بادی‌ها می‌پردازد.آنتی‌بادی‌های درمانی، ابزارهای قدرتمندی جهت پیشگیری و درمان در انسان، حیوانات و طیور(۴) علیه بیمارهای عفونی و غیرعفونی به سبب تمایل و ویژگی بالای آن‌ها برای آنتی‌ژن هدف می‌باشند. از زمانی که سازمان غذا و دارو مجوز

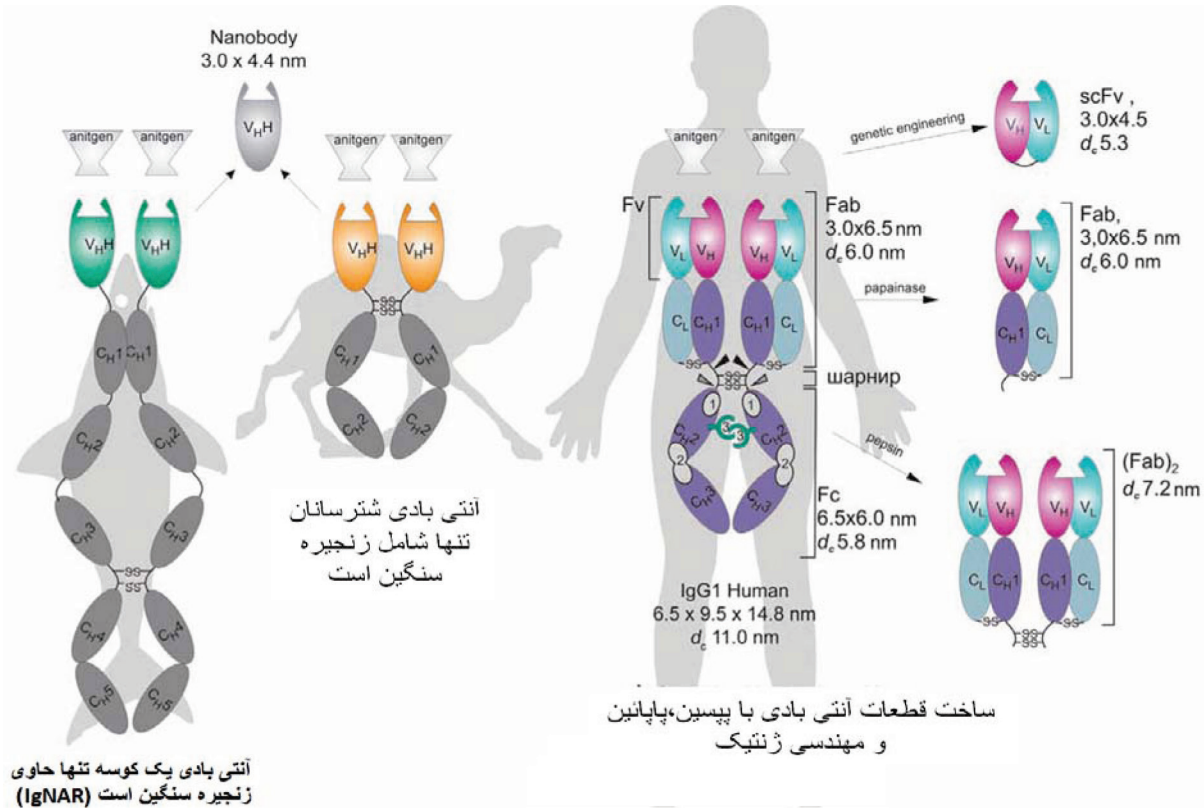
استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAb) را در بیش از دو دهه پیش صادر کرد، آنتی‌بادی‌ها جهت درمان بیماری‌های سرطانی، عفونی و قلبی-عروقی، آرتریت، التهاب و اختلالات ایمنی در دسترس هستند و همچنین آنتی‌بادی‌های جدید درمانی سبب رشد چشمگیر صنعت بیوتکنولوژی گردیده‌اند.

ایمونوگلوبین‌ها (Igs) ساختارهای متنوعی دارند، ولی واحد ساختمانی پایه در تمامی آنها یکسان و شبیه حروف (T,Y) است که از دو زنجیره یکسان پلی‌پپتیدی سنگین یا بلند (heavy, H) و دو زنجیره یکسان پلی‌پپتیدی کوتاه یا سبک (light, L) تشکیل شده‌اند. به هر زنجیره سنگین یک زنجیره سبک متصل شده و زنجیره‌های سنگین نیز توسط پیوندهای دی‌سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند. هر مولکول ایمنوگلوبین دارای یک ناحیه Fab (شناسایی آنتی‌ژن) و یک ناحیه Fc (اعمال بیولوژیک) است (۵). البته قابل ذکر است که آنتی‌بادی‌های شترسانان و کوسه فاقد زنجیره سبک است و بدین سبب قابلیت تولید نانوبادی‌ها یا VHH از آن‌ها وجود دارد (۷) (شکل ۱).

در این میان دومین‌های بسیار متغییر ((variable domains (Fvs) زنجیره سبک و سنگین ناحیه Fab، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا نقش اصلی را در ویژگی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن بازی می‌کنند. Fv خود به دو بخش مناطق بسیار متغییر یا مناطق تعیین کننده مکملی ((complementarity-determining-regions (CDRs) و مناطق داربستی (framework regions (FRs)) تقسیم می‌شود. لوپ‌های CDR شامل ۶ ناحیه L_1، L_2 و L_3 در زنجیره سبک و H_1، H_2 و H_3 در زنجیره سنگین است (۵). ساختار آنتی‌بادی‌ها با آنتی‌ژن‌های آن‌ها، سبب بینشی از پدیده‌های بیولوژیک، داروئی و مکانیسم بیماری و افزایش به کارگیری تکنیک‌های محاسباتی به عنوان ابزارهایی که می‌توانند افینیتی اتصال را افزایش داده و یا سبب پیگیری منشاء ساختاری بلوغ افینیتی شوند، شده است.

ویژگی تنوع زیاد توالی آنتی‌بادی‌ها به سه علت است، که از آن جمله می‌توان به: تنوع ترکیبی از طریق سه قطعه ژن رنجیره D، Vh، H و Jh و دو دسته قطعات ژنی زنجیره سبک (L) شامل Vl و Jl که نوآرایی آن‌ها سبب به وجود آمدن مناطق عملکرد متغییر V می‌شود؛ اتصال غیردقیق این قطعات ژنی به یکدیگر، و جهش بیش از حد سوماتیکی بازهایی که زنجیره H و L را کد می‌کنند، اشاره کرد (۵).

در بسیاری از مطالعات، توالی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به دست

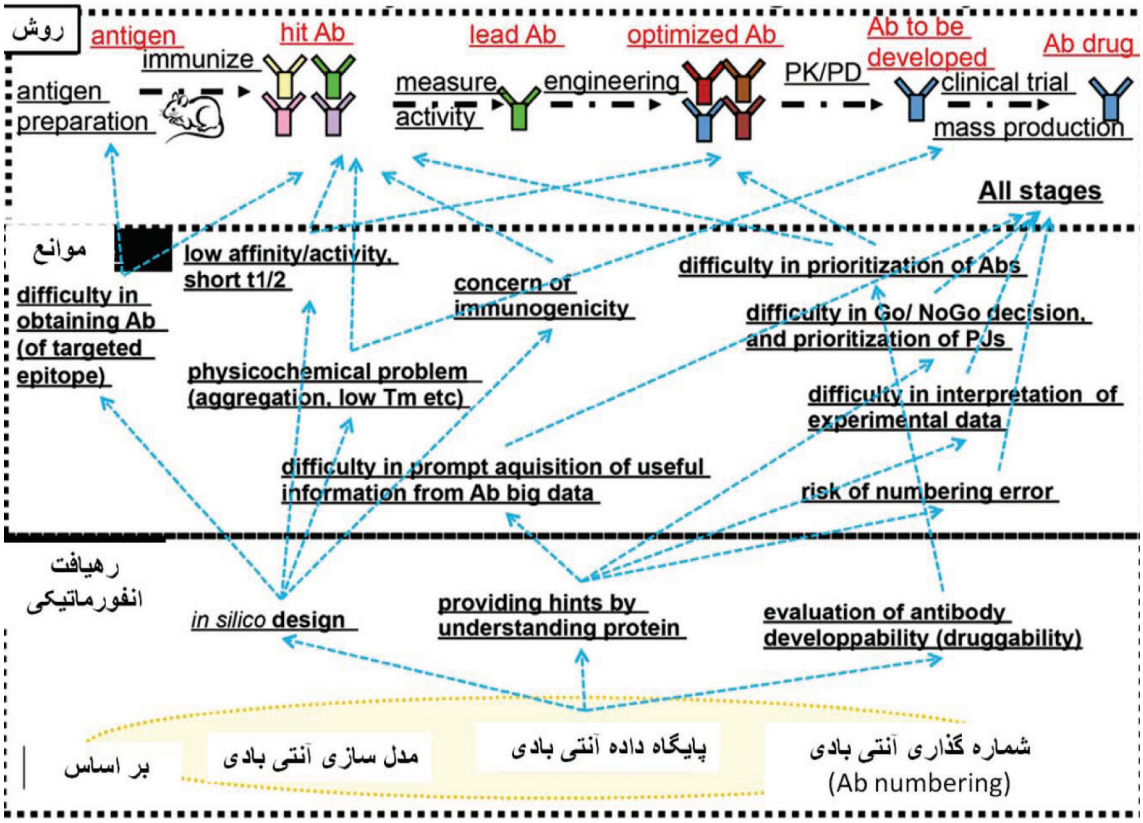


شکل ۱- آنتی بادی کامل و قطعات آن در انسان، شترسانان و کوسه.

آمده و با ابزارهای بیوانفورماتیکی نیاز به مدل‌سازی، بهینه‌سازی، انسانی‌سازی، پایداری و لزوم بررسی امکان تجمع (Aggregations) آن‌ها می‌باشد. در حالت دیگر ممکن است ساختار کریستالی این آنتی‌بادی‌ها در دسترس باشد و از مرحله بهینه‌سازی، این فرایند پی گرفته می‌شود. گاهی نیز طراحی از ابتدای آنتی‌بادی با ابزار بیوانفورماتیک در نظر گرفته می‌شود و از دگر سو مطالعات داکینگ و بلوغ افینیتی مد نظر است. در هر صورت یک ساختار کریستالی شاید به سادگی برای بسیاری از توالی‌های جدید آنتی‌بادی‌های توسعه‌یافته در دسترس نباشد، از این رو روش‌های هومولوژی مدلینگ با تفکیک بالا جهت انجام مهندسی مجازی مبتنی بر ساختار آنتی‌بادی مورد نیاز است. در این مقاله ما به بررسی برخی موانع جهت کشف آنتی‌بادی‌های داروئی و روش‌های مدلینگ آنتی‌بادی می‌پردازیم و رهیافت‌هایی را جهت غلبه بر این موانع با استفاده از انفورماتیک آنتی‌بادی‌ها ارائه می‌دهیم.

حل موانع کشف دارو با استفاده از بیوانفورماتیک آنتی‌بادی

شکل ۲ موانعی را که در طی چرخه کاری کشف آنتی‌بادی‌های دارویی روی می‌دهد را به تصویر کشیده است و رهیافت‌هایی را جهت حل این موانع با ابزارهای بیوانفورماتیک شرح می‌دهد. در بالای تصویر چرخه کاری آزمایشگاهی دشوار این امر توضیح داده شده است: یک میزبان با استفاده از ایمونوژن جهت به دست آوردن آنتی‌بادی‌های اختصاصی آنتی‌ژن ایمن می‌شود و افینیتی و فعالیت آزمایشگاهی آنتی‌بادی‌های استحصالی (hitAb) اندازه‌گیری می‌شود (۱). محققین یک آنتی‌بادی رهبر (Lead) را در میان آن‌ها بر اساس فعالیت آزمایشگاهی انتخاب کرده و سپس مهندسی آن را (به عنوان مثال از طریق پیوند CDR (through complementarity determining region (CDR) grafting) جهت یک آنتی‌بادی بهینه پیش می‌گیرند. در گام بعدی خصوصیات فارماکینتیک (PK)، فارماکودینامیک (PD) و سم‌شناسی را برای آنتی‌بادی انتخاب شده اندازه‌گیری و نهایتا تولید انبوه، ساخت و کنترل جهت ارزیابی بالینی انجام می‌شود. بخش دوم و سوم شکل ۲ موانع و ابزارهای بیوانفورماتیکی مرتبط را به ترتیب نشان می‌دهد. طراحی آنتی‌بادی درمانی امری بسیار مشکل است. ابتدا بدین سبب که به دست آوردن یک آنتی‌بادی اختصاصی برای یک مولکول هدف، می‌تواند بسیار مشکل باشد و دوم اینکه برای



شکل۲- رهیافت‌های بیوانفورماتیک آنتی‌بادی جهت کشف آنتی‌بادی‌های داروئی. T1/2 : نیمه عمرو Ab: آنتی‌بادی (۱).

برخی از آنتی‌ژن‌ها آنتی‌بادی اختصاصی قابل ساخت امکان‌پذیر نیست. حتی زمانی که آنتی‌بادی‌های زیادی با افینیتی بالا نسبت به آنتی‌ژن‌هایشان ساخته می‌شوند، شاید واجد فعالیت عملکردی کافی به سبب ایده‌آل نبودن جایگاه اتصالشان، نباشند (۱). جهت حل این مشکل، طراحی دقیق ایمونوژنی که آنتی‌بادی‌ها را تحریک می‌کند ضروریست. متاسفانه برخی آنتی‌بادی‌ها ممکن است افینیتی یا فعالیت کمتری و PK پائین‌تری از مقادیر مورد نظر داشته باشند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی ضعیفی نظیر پایداری دمایی پائین‌تر و تمایل به تجمع شاید سبب دو چندان شدن مشکلات شوند. جهت مقابله با این مشکلات، فرآیندهای مهندسی آنتی‌بادی نظیر کاهش مشکلات فیزیکوشیمیایی، افزایش افینیتی یا افزایش نیمه عمر نیاز است (۱). بسیاری از طراحی‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن می‌تواند به واسطه رهیافت‌های محاسبات مجازی (in silico) انجام شود (۸). همچنین دانش، تجربه و درک عمیق ساختار در طراحی آنتی‌بادی کارساز است و محققین می‌بایست با آنتی‌بادی و اپی‌توپ آن آشنا باشند. مدل‌سازی آنتی‌بادی و داکینگ پروتئین اغلب جهت ساخت مدل‌های ساختار سوم آنتی‌بادی-آنتی‌ژن از توالی‌های امینواسیدی استفاده می‌شود و نقش مهمی را در هر دو فرایند طراحی مجازی و فهم عملکردهای پروتئین بازی می‌کند(۸).

اگرچه تعیین ساختار سه بعدی (3D) یک پروتئین با روش کریستالوگرافی اشعه X آسان‌تر شده است اما همچنان زمان و هزینه گزافی به همراه دارد و همیشه موفقیت‌آمیز نیست. در حال حاضر چون بیش از هر زمان دیگری تعداد توالی آنتی‌بادی‌های در دسترس به سرعت افزایش می‌یابد، درخواست‌های بیشتری برای مدل‌سازی آنتی‌بادی و داکینگ پروتئین با کیفیت وجود دارد و این امر به دلیل نیاز به جایگزینی مناسب و سریع داده‌های ساختاری با داده‌های توالی است.

حتی پس از مدل‌سازی و طراحی موفق، آنتی‌بادی عملکردی که واجد PK/ PD و معیارهای سمیت است ممکن در مراحل بعدی نظیر تولید انبوه یا CMC مشکلاتی داشته باشد، که این امر از خصوصیات فیزیکوشیمیایی ضعیف آن منشا می‌گیرد. از این رو معیارهای نوین انتخاب آنتی‌بادی که چالش‌ها را در مراحل انتهایی پیشگویی می‌کنند، ضروری هستند. روش ایده‌آل آن است که آنتی‌بادی‌های درمانگر را بر مبنای ارزیابی توانایی دارویی یا قابلیت توسعه با در نظر گرفتن ویژگی توالی آنتی‌بادی، ساختار، و ذات فیزیکوشیمیایی آن اولویت‌بندی می‌کند (۸).

تجویز یک آنتی‌بادی ممکن است با خطر افزایش پاسخ ایمنی ضد آنتی‌بادی همراه باشد. پیشرفت‌های روش‌شناسی به ترتیب در پیوند CDR (CDR)grafting و حیوانات تراریخته جهت ساخت آنتی‌بادی‌های انسانی شده (humanized) و سبب کاهش خطر ایمنی‌زایی در آزمون‌های بالینی گردیده است. در هر صورت این پیشرفت‌ها همچنان کامل نیست. پیشگویی و حذف اپی‌توپ‌های سلول T یکی از راه‌های حل این مشکل استامامکانیسم‌های ایمنی‌زایی پیچیده بوده و دلایل آن همچنان ناشناخته است. تجمع آنتی‌بادی (Antibody aggregation) نیز می‌تواند دلیل مهمی برای ایمنی‌زایی باشد. از این رو توانایی پیشگویی اپی توپ های سلول T ومناطق مستعد تجمع در مراحل اولیه طراحی آنتی‌بادی یک امر مهم در بهبود این مشکلات است (۹). مشکل دیگری که در عمل رخ می‌دهد وجود طرح‌های شماره‌گذاری چندگانه آنتی‌بادی (multiple antibody numbering schemes) است. طراحی‌های قدیمی شماره‌گذاری آنتی‌ادی، شماره‌های باقیمانده را با باقیمانده‌های اختیاری (دلبخواه) مخلوط می‌کنند. از این رو محققین این زمینه در خطر درک نادرست و وجود تفسیر غلط مطالعه خود و مقالات چاپ شده علمی می‌باشند. با افزایش سریع توالی‌های آنتی‌بادی با تکنولوژی‌های نظیر نسل سوم توالی‌یابی یا توالی‌یابی عمیق (Deep sequencing) (۱۰). موضوع شماره‌گذاری یک مشکل جدی شده است و استانداردسازی شماره‌گذاری آنتی‌بادی می‌بایست به طور جهانی یکپارچه شود تا این مشکل را مرتفع سازد.

جنبه‌های شیمیایی میانکنش آنتی‌ژن آنتی‌بادی و CDRها

میانکنش‌های شیمیایی بین آنتی‌بادی به طور کلی با سایر میانکنش‌های لیگاند-پروتئین تفاوتی ندارند. پیوندهای هیدروژنی، میانکنش‌های واندروالس و برخی اوقات پل‌های نمکی در ایجاد تماس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی دخیل هستند. وجود مکملی فضایی بین سطوح برخورد آنتی‌ژن و آنتی‌بادی یکی از خصوصیات مشترک در محل تلاقی این دومی باشد. فواصل بین سطوح آنتی‌بادی و آنتی‌ژن‌ها برخی اوقات به واسطه مولکول‌های آب پر می‌شوند. جایگاه اتصال آنتی‌ژن در آنتی‌بادی ممکن است تغییراتی را پس از اتصال آنتی‌ژن انجام دهد که به آن تناسب القا شده (Induced fit) می‌گویند. باقیمانده‌های هم کنشگر در محل تلاقی آنتی‌بادی-آنتی‌ژن معمولا یا به وسیله یک آستانه فاصله بین مولکولی تعریف می‌شوند و یا به صورت یک کاهش ناحیه سطح در دسترس در یک کمپلکس در مقایسه با حالت مونومری تعریف می‌شود (۱۱). اگرچه CDRها در میان آنتی‌بادی متغییرترین نواحی هستند اما مشخص شده که توالی‌های آن‌ها به طور کامل حالت تصادفی ندارند و آشکار شده این نواحی تمایل به آمینواسیدهای ویژه‌ای دارند. به خصوص مطالعات تجربی بر روی داده‌های توالی و ساختاری PDB نشان داده‌اند، آمینواسیدهای Tyr و Serو غیره بسیار فراوان هستند. در آمینواسید Tyr، زنجیره‌های جانبی Tyr (یا تیروزیل) نقش اصلی را در پاراتوب‌های ساختاری در تماس با آنتی‌ژن بازی می‌کنند (۱۲، ۱۳). این مشاهدات نشان می‌دهد که فشار انتخابی بر روی غنی‌سازی نواحی اتصال به آنتی‌ژن وجود دارد و پیشنهاد می‌کند امینواسیدها به طور ذاتی به خوبی برای میانجی‌گری شناسایی آنتی‌ژن تعبیه شده‌اند.

طراحی مجازی آنتی‌بادی و هومولوژی مدلینگ آن

چون آنتی‌بادی‌ها از نظر ساختاری به خوبی مطالعه شده‌اند، سیستم مدلی ایده‌الی جهت آزمایش هومولوژی مدلینگ مبتنی بر داکینگ هستند. انتخاب الگو به طور قابل توجهی ساده‌تر از هومولوژی مدلینگ‌های معمول برای سایر پروتئین‌ها است و از طرف دیگر چالش مدل‌سازی آنتی‌بادی در قسمت مدل‌سازی لوپ است که حل آن می‌تواند در بررسی سایر پروتئین‌ها راه‌گشا باشد. شکل ۳ قسمت‌های مختلف دومین متغییر آنتی‌بادی (Fv) را نشان می‌دهد. به اختصار باقیمانده‌های اسکلتی زنجیره سبک و زنجیره سنگین دومین‌های متغییر هستند (VL و VH) و به عنوان داربستی عمل می‌کنند که شش لوپ CDR را بر پا می‌کنند.

توالی چهارچوب و ساختار صفحه بتا عموما محافظت شده هستند و کانفورمیشن لوپ‌های غیر از CDR H۳ محدود به ساختارهای متعارفی

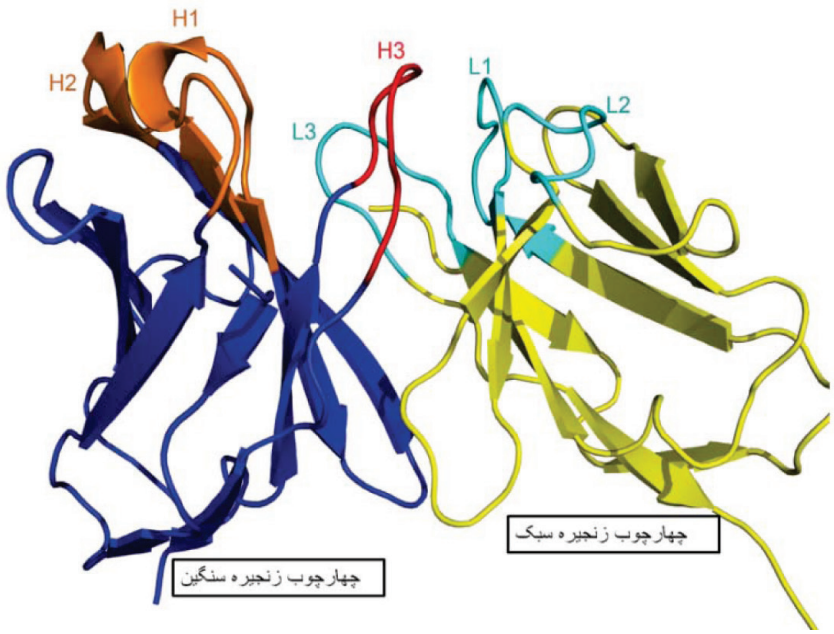
می‌شوند که به واسطه قوانین مبتنی بر توالی تعیین می‌شوند. همچنین مشکلات مدل‌سازی لوپ CDR H۳ به خوبی شناخته شده است (۱۴). معیار قانونی جهت پیشگویی ساختار از توالی برای کل نواحی لوپ وجود ندارد. بنابراین، کانفورمیشن H۳ به صورت نوسازی de novo پیشگویی می‌شود که به سبب تغییر بسیار زیاد در توالی و طول لوپ آن‌ها چالش‌زا است (۱۵). در همین راستا افزایش پیوسته دانش ساختارهای کریستالی حل شده آنتی‌بادی به مدل‌سازی مقایسه‌ای (همولوژی مدلینگ) در مورد ساختار Fv کمک کرده است.

برای کتاب خانه‌های غیر انسانی آنتی‌بادی، پیوند (CDR grafting) روش اصلی جهت طراحی مجازی است. این امر به طور گسترده جهت کاهش خطر ایمنی‌زایی استفاده می‌شود و با جزئیات در مقالات ذکر شده است (۱). سایر انواع طراحی مجازی نظیر بهبود افینیتی و حذف مشکلات فیزیکی شیمیایی در مقالات مروری پیشین (۵) ذکر شده‌اند و ما در اینجا برروی پیشرفت‌ها از سال ۲۰۱۲ تا به امروز صحبت می‌کنیم.

طراحی مجازی آنتی‌بادی جهت آنتی‌بادی‌های با مقاومت بالای حرارتی با جهش باقیمانده‌های سطحی به آمینواسیدهای باردار به کار گرفته شده است (۱۶)، و از آن، جهت بهبود اتصال متقاطع موثر زمانی‌که آمینو اسیدهای غیر متعارف به CDRهای آنتی‌بادی معرفی می‌شوند، استفاده شده است (۱۶، ۱۷). بهبود افینیتی با روش‌های محاسبه‌ای (نظیر جهش‌زایی در CDRها) به سرعت افزایش یافته است و برای مثال بهبود افینیتی با طراحی محاسباتی مبتنی بر ساختار برای آنتی‌بادی ۱۱K۲، یک آنتی‌بادی ضد (An anti-monocyte chemoattractant protein 1) MCP-1، انجام شده است (۱۸). از این مطالعات مشخص شدکه باقیمانده‌های hot spotبه تنهایی پاسخگوی بهینه‌سازی نیستند و توجه به آن‌هایی که میانکنش الکترواستاتیک در محدوده وسیعی را سبب می‌شوند، مهم است. این روش‌ها نیازمند کریستالوگرافی کمپلکس آنتی‌ژن/آنتی‌بادی هستند. رهیافت محاسباتی جایگزین برای افزایش افینیتی بدون کریستالوگرافی اشعه ایکس پیشنهاد شده و بدین صورت است که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی معمول در محل تعامل اپی‌توپ-پاراتوب که مستخرج از ساختارهای سه بعدی شناخته شده از کریستالوگرافی است، استفاده می‌شود (۱۹). این رهیافت برای آنتی‌بادی 4E11 که یک آنتی‌بادی خنثی‌کننده متقاطع برای ویروس دانگ (Dengue Virus) است و ساختار کریستالی ندارد، انجام شده است و یک بهبود ۴۵۰ برابری در افینیتی آن به دست آمده است. این افینیتی افزایش یافته سبب فعالیت خنثی‌گری قوی‌تری در آزمایشگاه گردیده است. همچنین سبب فعالیت بالقوه ضدویروس آن در چالش در مدل موشی ویروس دانگ شده است (۱۹). کیفیت دقیق و خوب مدل‌سازی آنتی‌بادی زمانی که از این رهیافت استفاده می‌کنیم، کلید اصلی می‌باشد.

مدل‌سازی آنتی‌بادی

تکنیک‌های مدل‌سازی آنتی‌بادی مسیر طولانی را از زمان تولد خود گذرانده‌اند. اولین رویداد مهم به سمت ساخت مدل‌های قابل اعتماد آنتی‌بادی مطالعه Chothia و Lesk بود. در تعریف برای لوپ‌های بسیار



شکل ۳- ناحیه متغییر (FV) و چهارچوبی (Framework) از آنتی بادی ضد لیزیزیم (1BQL).

متغییر، Chothia وهمکاران مابین توالی آمینواسیدی و ساختارهای سه بعدی در ناحیه اتصال آنتی‌ژن ارتباط برقرار کردند (۲۰). آن‌ها کشف کردند که پنج مورد از شش منطقه بسیار متغیر (L۱ تا L۳، H۱ و H۲) عموما تعداد کمی کانفورمیشن‌های مجزای اسکلتی را انتخاب می‌کنند. به علاوه، محققین باقیمانده‌های نسبتا اندکی را درون و خارج ناحیه بسیار متغییر شناسایی کردند که پیوندهای هیدروژنیشان، پکینگ، یا توانایی به عهده گرفتن کانفورمیشن به خصوص به طور ابتدائی مسئول شکل‌های فضائی زنجیره اصلی لوپ‌های بسیار متغییر است. (۲۱) این کلاس‌ها که سبب رخداد مکرر کانفورمیشن‌های متفاوت مناطق بسیار متغییر می‌شوند به واسطه طول لوپ و بواسطه تعداد کمی باقیمانده اصلی شناسایی می‌شوند که ساختارهای متعارف (canonical structures) یا CSs نامیده می‌شوند. از آن زمان به بعد چندین بررسی، کتابخانه ساختارهای متعارف را گسترش داده‌اند. در تحقیق اخیر بوسیله North و همکاران شناسایی ساختارهای متعارف با یک رهیافت سیستماتیک به روز و اصلاح شده است(۲۱). تا به امروز تخمین زده شده است که تقریبا ۸۰ درصد از لوپ‌های L۱، L۲، H۱ و H۲ در ساختارهای مشخص شده انواع محدودی از ساختارهای متعارف گزینش می‌کنند (۲۲). RMSD (The average root mean square deviation) مابین اسکلت‌های یک لوپ هدف و یک لوپ الگو با نوع ساختار متعارف مشابه، به تقریب ۰,۷Å است و از ۱,۰–۱,۲ RMSD Å تجاوز نمی‌کند.

تعداد ساختارهای متعارف در طی سال‌های گذشته به طور وسیعی افزایش یافته است و حتی اگر فرض شود که اکثر ساختارهای مشترک برای آنتی‌بادی‌های انسان و موش کشف شده باشند (۲۱)، می‌بایست اظهار کرد که این امر برای سایر اورگانیسم‌ها صدق نمی‌کند زیرا برخی از آن‌ها ایمونوگلوبولین‌هایی با خصوصیات منحصر به فرد ارائه می‌دهند. در میان آن‌ها می‌بایست نامی از آنتی‌بادی‌های VHH شتر و IG گاوسانان ببریم. خانواده شترسانان واجد یک نوع ویژه آنتی‌بادی علاوه بر آنتی‌بادی‌های مرسوم هستند. در مقایسه با آنتی‌بادی‌های مرسوم، آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین در درجه حرارت بالا و غلظت‌های بالای تخریب کننده‌های ساختار، پایدار و فعال می‌باشند. به علاوه VHH واجد مزایای دیگر نظیر: شناسایی اپی‌توپ‌های غیرمعمول یا مخفی، امکان تجویز به صورت خوراکی، و مهندسی ساده‌تر هستند (۲۳، ۲۴).

پروتکل خودکار مدل‌سازی آنتی‌بادی

به سبب تعدد درمان بیماری‌ها با آنتی‌بادی‌ها، علاقه روز افزونی در تعیین ساختار آنتی‌بادی‌ها در برون ده بالا همراه با درستی نتایج آن‌ها وجود دارد. روش‌های تجربی کریستالوگرافی اشعه X و اسپکترواسکوپی NMR (Nuclear Magnetic Resonance) اگرچه بسیار مفید هستند اما نیاز به زمان و هزینه گزاف دارند. به علاوه آنتی‌بادی کامل برای اسپکترواسکوپی NMR بزرگ است (۱).

کریستالوگرافی اشعه ایکس در فقدان حضور آنتی‌ژن به سختی سبب شناخت کانفورمیشن یک لوپ بلند HCDR۳ در میان کانفورمیشن مرتبط بیولوژیکی که برای درگیرشدن با آنتی‌ژن نیاز است، می‌شود. برخی اوقات لوپ HCDR۳ می‌تواند درون کانفورمیشن‌های مختلف بوسیله crystal packing یا مختصات آن که به سبب انعطاف‌پذیری قابل شناسایی نیستند، قفل شود (۱).

بنابراین بسیاری از گروه‌ها بر روی پروتکل‌های خودکاری که ساختارهای مناطق متغییر آنتی‌بادی را به طور محاسباتی مدل می‌کنند جهت پیشگویی فضای کانفورمیشنال واجد کانفورمیشنی مورد نیاز جهت اتصال، تمرکز کرده‌اند. این سرورها از ترکیبی از مدل‌سازی مقایسه‌ای، پیشگویی ساختاری de novo و بهینه‌سازی انرژی جهت ساخت کانفورمیشن‌های بالقوه سرهم‌بندی شده استفاده می‌کنند. اخیرا تلاش‌های سازمان‌دهی شده نظیر AMA (AntibodyModeling Assessment) جهت مقایسه سرورهای مدلینگ و تعیین درستی تکنیک‌های مدلینگ آنتی‌بادی در مقایسه با یکدیگر انجام شده است (۱، ۸). سرورهای مدلینگ آنتی‌بادی عموما جهت مدل‌سازی مناطق داربستی و لوپ‌های CDR (به غیر از HCDR۳) مبتنی بر هومولوژی مدلینگ هستند. نواحی داربستی در بین آنتی‌بادی‌های حفاظت شده هستند، و یک الگوی مناسب در PDB عموما می‌تواند در میان آنتی‌بادی‌هایی که ساختارهای آن‌ها به طور تجربی مشخص شده پیدا شود. نگرانی که برای مدلینگ مقایسه‌ای وجود دارد این است که این روش کایمر (Chimeras) می‌سازد، بدین‌معنی که این سرورها داربست‌ها و لوپ‌های CDR زنجیره سنگین و سبک از چندین الگو را جهت استفاده از الگویی با بیشترین هومولوژی، ترکیب می‌کند (۱، ۸).

جهت‌گیری نسبی دومین V زنجیره سبک و سنگین تاثیر معنی‌داری بر روی خصوصیات اتصالی آنتی‌ژن به یک آنتی‌بادی دارد. اگرچه نواحی داربستی به خوبی حفاظت شده هستند، ترکیب داربست‌های زنجیره سنگین و سبک از الگوهای مختلف احتمالا سبب جهت‌گیری نسبی نادرست دومین‌های V زنجیره سنگین و سبک می‌شود که نهایتا سبب خطاهایی در پیشگویی ساختار آنتی‌بادی می‌شود. به علاوه اگرچه لوپ‌های LCDR۱ و HCDR۱ و ۲ واجد کانفورمیشن‌های متعارف هستند، پیوند این لوپ‌ها بر روی یک داربست متمایز می‌تواند منجر به خطاهایی در قرارگیری نسبی این لوپ‌ها و میانکنش آن‌ها شود. جهت غلبه بر این مشکل سرورهای مدلینگ راه‌حل‌های مختلفی را ارائه داده‌اند(۱).

امروزه مدل سازی ساختار پروتئین ساده‌تر شده است. در اینجا ما بر مرور مدل‌سازی خودکار آنتی‌بادی تمرکز کرده‌ایم که نه تنها برای دانشمندان محاسباتی مفید است بلکه برای سایر محققین بیولوژی ارزشمند است. مدل‌سازی آنتی‌بادی به طور جزئی یا کلی وابسته به تعریف ساختارهای متعارف و توانایی ما در پیشگویی آن‌ها است. توالی یک آنتی‌بادی با ساختار ناشناخته اگر با احتمال زیاد لوپ‌های بسیار متغییر L۱، L۲، L۳، H۱ و H۲ واجد کانفورمیشن زنجیره اصلی مشابه با یک ساختار متعارف باشند و لوپH۳ آن‌ها نیز یک کانفورمیش مشابه با یک ساختار شناخته شده داشته باشد، مدل قابل قبول را می‌توان بر اساس نواحی داربستی و لوپ‌های بسیار متغییر با استفاده از تکنیک همولوژی مدلینگ ساخت. نواحی داربستی عموما در توالی و ساختار بسیار محافظت شده هستند و می‌توانند با دقت و چالش به نسبت پائین مدل‌سازی شوند. جهت این امر سرورهای و برنامه‌های تجاری معرفی شده‌اند که قدیمی‌ترین آن‌ها سرور WAM (Web Antibody Modeling) است (۲۵). از برنامه‌های تجاری نیز می‌توان به Schrodinger (BioLuminate)، Accelrys و غیره اشاره کرد (۲۶).

بر خلاف رهیافت ساختار معیار که در بالا توضیح داده شده، روش‌های از آغاز (Ab initio methods) مبتنی بر حضور وجود لوپ‌های الگو در پایگاه داده نیستند. محدودیت اصلی آن‌ها این است که هنوز به علت عدم درک کامل اساس فیزیکوشیمیایی که نهایتا کنترل‌کننده ساختارهای پروتئین هستند و روش عملکردهای انرژی که برای ساخت و ارزیابی کانفورمیش‌های گوناگون توسعه‌یافته است اغلب نمی‌تواند مابین پیشگویی یک مدل صحیح و غیر صحیح نمایز قائل شود. رهیافت‌های که از ترکیبی از روش‌های مبتنی بر دانش و از آغاز استفاده می‌کنند نیز معرفی شده است (۲۷، ۲۸).

مدلینگ H۳

در ساختارهای شناخته شده کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن در PDB، اکثر لوپ‌های H۳ در CDR واجد تماس مستقیمی با آنتی‌ژن‌های مربوط به خودشان هستند. متاسفانه، علی‌رغم نقش مهم و اولیه آن‌ها در اتصال، مدل‌سازی آن‌ها بسیار سخت است زیرا توالی و ساختار هر دوی آن‌ها به سبب طبیعت نوترکیبی ژن VDJ، بسیار متغییر است و از سوی دیگر طول آن‌ها از سایر لوپ‌ها بلندتر است (۲۹). آنالیز توالی و ساختاری سبب شده برخی از محققین قوانین تجربی را استخراج کنند تا یک ارتباط توالی-ساختار را برای کانفورمیشن زنجیره اصلی در ناحیه انتهای C لوپ تشریح کنند. در واقع لوپ‌های HCDR۳ عموما به مناطق torso (تنه) و head (سر) برای مقاصد خوشه‌بندی تقسیم می‌شوند (۸، ۳۰). چون لوپ‌های HCDR۳ را عموما نمی‌توان در یک خوشه کانفورمیشنال تنها بر مبنای توالی‌شان قرار داد، از این رو تحقیقات اخیر بر روی توسعه یک دسته از قوانین جهت پیشگویی جنبه‌های به خصوصی بر اساس کانفورمیشن و محل استقرار باقیمانده‌های کلیدی (Key residue positions) متمرکز شده‌اند.

همچنین در مدلینگ H۳، راهکار جستجوی پایگاه‌های اختصاصی می‌تواند جهت پیشگویی کانفورمیش زنجیره اصلی نواحی سر استفاده شود (منظور همان جمع‌آوری قطعات پپتیدی از PDB) (۳۰).این چنین روش‌هایی معمولا نتایج خوبی برای لوپ‌های با اندازه کوتاه و متوسط می‌دهند اما برای لوپ‌های بلندتر انحراف RMSD اسکلتی معمولا از حد مجاز تجاوز می‌کند. در هر صورت، پیشرفت‌های اخیر در پیشگویی کانفورمیشن baseHCDR۳ از طریق خوشه‌بندی و بهبود ساخت de novo لوپ امیدی را جهت امکان پیشگویی قابل اعتمادتر HCDR۳ در آینده نزدیک به وجود آورده است.

چالش‌های مدلینگ آنتی‌بادی

چالش‌هایی که در هنگام همولوژی مدلینگ ساختار آنتی‌بادی پیش می‌آید مربوط به تغییرات در توالی IgG است که جهت گیری نسبی دو دومین متغییر IgG در کمپلکس را تغییر می‌دهد و از این رو بر روی ساختار پاراتوب تاثیر می‌گذارد. آشکارا مدلینگ کانفورمیش لوپ‌های CDR چالش اصلی (به خصوص در مورد CDR۳) است. از سوی دیگر، انعطاف پذیری پاراتوب CDRها، اغلب مشکل هراس‌انگیزی برای شبیه‌سازی داکینگ آنتی‌ژن/آنتی‌بادی است بدین سبب که نیاز به انعطاف‌پذیری هر دوی پاراتوب و اپی‌توب است و منجر به افزایش فضای جستجوی کانفورمیشنال می‌شود.

ارزیابی دقت مدلینگ آنتی‌بادی با استفاده از اکثر ابزارها و سرورهای جدید نشان می‌دهد که آن‌ها واجد در ستیمورد انتظار مشابه هستند و معمولا برای Frs و لوپ‌های به غیر از H۳ واجد RMSD زیر۱، و بین ۵ -۱,۵ آنگستروم برای لوپ H۳ هستند. چهار منبع اصلی خطا در این فرایندها شامل: مدلینگ لوپ‌های H۳ بلند، ردیابی و پیشگویی تغییرات کانفورمیشنال قابل اتصال به آنتی‌ژن، شناسایی الگوهای مناسب و ساخت پکینگ صحیح بین حوزه‌های VH و VL است (۳۱). از این رو، این سرورها مناطق CDR را با درستی ضعیف‌تری در مقایسه با بقیه قسمت‌های مدلی سازند و سبب نقص این چنین پیشگویی‌هایی برای بسیاری از کاربردهای عملی می‌شوند. مورد مهم این است که این مشکل در مدل‌سازی حوزه‌هایVHH شترسانان حیاتی است. آن‌ها واجد یک مخزن ویژه از لوپ‌های H۳ هستند و اغلب لوپ‌ها طویل و کانفورمیش‌های به خصوصی دارند و این روش‌های فعلی پیشگویی، به سختی نتاج مناسب و منطقی را ارائه می‌دهند(۲۴). مشکل دیگری که وجود دارد اثر اتصال آنتی‌ژن روی کانفورمیشن لوپ است. حتی اگر از ریخت افتادگی‌های ناچیزی در اکثر لوپ‌ها در طی اتصال آنتی‌ژن مشاهده شود، لوپ‌های H۳ (به خصوص آن‌هایی که طویل هستند) می‌توانند در زمان اتصال به آنتی‌ژن خود، متحمل تغییرات کانفورمیشنال کاملا شدیدی شوند (۳۲). بنابراین در نظر گرفتن این نوع اطلاعات در فرایند مدلینگ مهم هستند، گرچه در حال حاضر به دلیل روش‌های خودکاری که در بالا استفاده می‌شوند به حساب نمی‌آیند (۳۳).

به تازگی ارزیابی دیگری نشان داده است که رهیافت مبتنی بر شبیه‌سازی سبب بهبود مدل‌های H۳ ساخته شده به واسطه هومولوژی مدلینگ گردیده است و آن‌ها را به میزان میانگین ۱RMSD/۵ A° ارتقاء بخشیده است (۱). این امر پیشنهاد می **A°** کند که روش از آغاز (Ab initio) شاید با توان بیشتری کانفورمیشن لوپ H۳ را پیشگویی کند حتی اگر یک الگوی هومولوگ برای توالی H۳ مورد نظر در PDB پیدا نشود(۲۲، ۳۴).

انسانی‌سازی آنتی‌بادی (Humanization of antibodies)

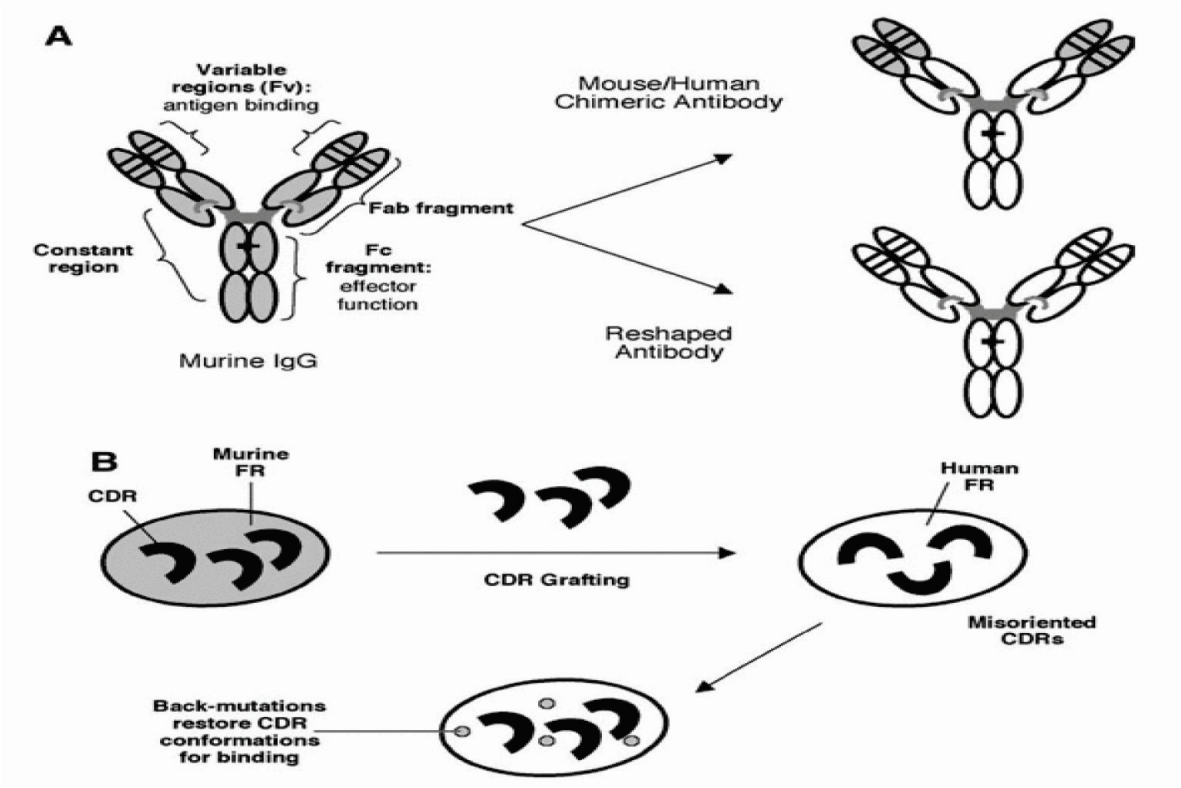
CDRهای انسانی شده موش به طور جزئی به سیستم ایمنی انسان ارائه می‌شوند و به طور تئوریکی ذاتا نمی‌بایست آلرژنیک باشند. انسانی‌سازی آنتی‌بادی‌های موشی به معنی جایگزینی مناطق داربستی موش با مشابه مناطق داربستی ژنتیکی انسانی بر مبنای مشابهت‌های توالی آمینواسیدی است. این امر سبب کاهش پاسخ ایمنی و عدم خنثی‌سازی آن در هنگام تجویز برای انسان است. این فرایند سبب حصول به آنتی‌بادی انسانی با شاخص‌های درمانی بالاتر از موشی آن می‌شود. آنتی‌بادی‌های انسانی شده موش مشخص شده نیمه عمر سرمی بیشتری داشته، میانکنش‌های با سلول‌های اجرایی را بهبود بخشیده و ایمونوژنسیتی را کاهش می‌دهد. برای نمونه آنتی‌بادی CAMPATH-1G موشی پس از انسانی‌سازی (۱H-CAMPATH)، نه تنها نیمه عمر بیشتری پیدا کرد، بلکه اثرات درمانگری آن افزایش یافت (۳۵).

سایر استراتژی‌هایی‌که جهت به حداقل‌رسانی ایمونوژنسیتی آنتی‌بادی انسانی‌سازی استفاده شده است شامل روکش‌گری (Veneering) و مافوق انسانی‌سازی (Super-humanization) است. در روکشگری یا

re-surfacing، توالی mAb موشی در ساختار کریستالی یا هومولوژی شده جهت بررسی سطح در معرض یا دسترسی به محلول بررسی می‌شود و باقیمانده‌های بیرون‌زده (نظیر لایزین) به باقیمانده‌هایی که در ژرم لاین انسان کد می‌شوند جهش داده می‌شود (۳۶). این فرآیند به طور شدیدی پتانسیل ایمونوژنیک انتی‌بادی انسانی را کاهش می‌دهد. به علاوه، باقیمانده بخصوصی از CDRدرگام بعدی از طریق تکنیک مافوق انسانی که ارزش درمانی آنتی‌بادی‌ها را بهبود می‌بخشد حذف می‌شوند (۳۷). روش دیگر کاربردی پیوند CDR (CDR grafting) است که شکل توضیح داده است (شکل ۴).

داکینگ آنتی‌بادی و نقشه یابی‌اپی‌توپ

چالش مهم دیگر داکینگ آنتی‌بادی با اپی توپ مربوط به آن در سطح آنتی‌ژن است. از آنجائی‌که داکینگ معمول پروتئین-پروتئین در بسیاری حالات موفق است، داکینگ آنتی‌بادی-آنتی‌ژن یک چالش ویژه در میان موارد داکینگ پروتئین-پروتئین به حساب می‌آید. در داکینگ آنتی‌بادی بر خلاف داکینگ پروتئین-پروتئین مکمل شکلی (Shape complementarity)، شاخص چندان قوی جهت قرارگیری آنتی‌بادی نیست زیرا اپی‌توپ‌ها و پاراتوب‌ها به طور عادی مسطح (Flat) هستند. لذا افینیتی اتصال به طور جایگزین از طریق میانکنش‌های هیدروفوبیک hot spot و الکترواستاتیک سنجیده می‌شود (۳۸، ۳۹). نواحی کوتاه و مستعد تجمع در بسیاری از آنتی‌بادی‌ها معمول هستند و از باقیماندهای اروماتیک تشکیل شده‌اند و در لوپ‌های HCDR۲ متمرکز شده و می‌توانند به طور معنی‌داری به عنوان نواحی سطوح دفن شده در میانکنش‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن عمل کنند (۴۰). به علاوه، مدلی از آنتی‌بادی که به عنوان یک نقطه شروع برای داکینگ محسوب می‌شود ممکن است وقتی اپی توپ درگیر اتصال می‌شود، تغییر کند (۴۱). به علاوه، اگر محل اپی‌توپ مشخص نیست، یک جستجوی کلی می‌بایست صورت گیرد. این امر میزان پیچیدگی را به سبب نیاز به نمونه‌گیری الگوریتم‌های داکینگ از اپی‌توپ‌ها در کل سطح آنتی‌ژن، بیشتر می‌کند. چندین رهیافت جهت چیرگی بر این چالش‌ها تعبیه شده است که از آن‌ها می‌توان به الگوریتم‌هایی که کانفورمیش‌های



شکل ۴- انسانی‌سازی آنتی‌بادی و پیوند CDR (CDR Grafting).

در شکل A آنتی‌بادی‌های کایمریک موشی/انسانی مناطق Fv از آنتی بادی موشی را حفظ کرده اند (۶۶ درصد شباهت به انسان). آنتی بادی‌های دوباره شکل گرفته (Reshaped) تنها CDRها و برخی از باقیمانده‌های داربستی را از آنتی بادی‌های موشی حفظ کرده‌اند (۹۰ تا ۹۵ درصد شباهت به انسان) که این باعث می‌شود حداقل ایمونوژنسیتی را داشته باشند. B: انتقال CDRهای موشی به یک داربست انسانی (FR) اغلب منجر به جهت‌گیری‌های زیرحد بهینه در لوپ‌های این آنتی‌بادی‌ها می‌شود، پس بهتر است که FR موشی با جهش‌هایی به حالت انسانی در آید.

جدول ۱- مشخص کردن پایگاه‌ها و منابع متنوع اطلاعات آنتی بادی‌ها.

محتویات اصلی	توالی و ساختار			ساختار	اطلاعات داروئی (همراه با مولکول‌های کوچک داروئی)		
نام پایگاه داده	DIGIT	IMGT	abYsis	SabDad	ChEMBL	PubChem	DrugBank
خصوصیات محتویات آن	شرح نویسی بر مبنای نوع آنتی ژن، توالی های ژرم لاین و اطلاعات جفتی بین زنجیره های سبک و سنگین، کاربر توالی ها را وارد کرده و می تواند علیه پایگاه داده بلاست کند و سرح نویسی با طرح شماره گذاری Kabat-Chothia، محل و ساختارهای متعارف CDR ها و جهش زایی با توجه به ژرم لاین را مشاهده کند.	رفرانس جهانی برای ژن ها، توالی ها و ساختار سه بعدی آنتی بادها، TR، MHC و غیره است. شرح نویسی بر مبنای مفاهیم IMGT-Ontology و قوانین علمی IMGT (ژن های IMGT، نامگذاری آللی، شماره گذاری منحصر به فرد IMGT) است. شامل ۷ پایگاه دادهو ۱۷ ابزار انلاین است. IMGT/MAb-DB حاوی MAb های درمانی، FPIA و CPCA با لینکی به IMGT/ ۳Dstructure-DB و IMGT/ ۲Dstructure-DB و WHO-INN است.	شماره گذاری بر مبنای Chothia and Kabat، تعیین کلاس متعارف، شناسایی باقیمانده های غیرطبیعی (توزیع آمینواسید های در هر ناحیه)، بر آورد انسانی بودن	آنتی بادی هایی که در PDB ثبت شده اند، خصوصیات ساختاری نظیر کانفورمیشن CDR و جهت گیری H/L، مقادیر افینیتی که در مقالات به کار رفته است.	آنتی بادی های تائید شده یا در فاز کلینیکی ، مترادف ها، توالی، MOA، اطلاعات هدف که مرتبط با داده های مولکولی کوچک هستند	مترادف ها، فعالیت های فارماکولوژیکی و لینکی به نقل قول های PubMed	شناسایی (توالی شماره CAS)، فارماکولوژی (Pk، Pd، دوز، سمیت، ADME)، اقتصاد دارویی (قسمت، Patent Date)، خصوصیات (Pe و Tm)، اطلاعات هدف داروئی، خطر میانکنش دارو-دارو

ادامه جدول ۱- مشخص کردن پایگاه‌ها و منابع متنوع اطلاعات آنتی‌بادی‌ها.

محتویات اصلی	اپی توپ‌های سلول B و T	آنتی بادی‌های عمومی در دسترس			هیبریدوما	تشخیص و درمان
نام پایگاه داده	IEDB	Antibody Registy (AR)	AbMiner	Antibodypedia	مجموعه اروپائی کشت های سلولی هیبریدوما	شاخص انتی بادی مونوکلونال
خصویات محتویات آن	پایگاه جامع اپی توپ (داده های اتصال MHC، افینیتی اتصال آنتی بادی، پاسخ سلول T، ساختار سه بعدی و غیره). اضافه کردن جزئیات تجربی به صورت دستی. مستند سازی خودکار، دسته بندی و استفاده وسیع از انتولوژی ها	آنتی بادی تجاری و خصوصی از منابع مختلف، با یک شناسه منحصر به فرد مشخص شده اند.	آنتی بادی های تجاری در دسترس که باوسترن بلات برای سلولهای NCI-۶۰ شناسایی شده‌اند. شامل اطلاعات واکنشگری گونه ای	آنتی بادی های عمومی در دسترس علیه اهداف پروتئینی. امتیازهای اعتبار بوسیله کاربران ارزیابی می شود.	همه لاین های سلولی تحت کنترل کیفی کامل و تائید روش شده وارد مجموعه می شوند. لاین های سلولی می توانند هم به صورت بخ زده یا کشت در حال رشد باشند.	پایگاه داده جستجوی مناسب کتاب های الکترونیکی که به صورت سالانه بر اهی به روز اساس آنتی تولید شده تشخیصی و درمانی به روز می شود.

mAb: آنتی بادی مونوکلونال، TR: رسپتور سلول T، MH: کمپلکس سازگاری نسجی، PFIA: فیوژن پروتئین برای کاربردی‌های ایمنی، CPCA: پروتئین کامپوزیت برای کاربردی های بالینی، QC: کنترل کیفی، ADME: جذب، توزیع، متابولیسم و ترشح.

لوپ آنتی‌بادی را در حضور آنتی‌ژن دوباره مدل‌سازی می‌کنند و کاربرد داده‌های تجربی جهت آگاه شدن از ارزیابی انرژی مدل‌های داک شده، اشاره کرد.

افزایش پایداری دمایی آنتی‌بادی (Antibody thermo-stability)

در کنار خصوصیات عملکردی، پایداری mAbهای درمانی یک معیار انتخاب کلیدی جهت توسعه یک کاندید داروئی به یک محصول قابل عرضه به بازار است. در طی ساخت، ذخیره و استفاده در بدن، پروتئین‌های درمانی از طریق دآمیداسیون آسپارژین (Asn) و ایزومریزاسیون آسپارتات (Asp) فرسایش می‌یابند و واسطه‌های حلقه‌ای سوکسینیمید (succinimide) تولید می‌کنند که این‌ها به نیتروژن‌های اسکلتی مجاور حمله نوکلئوفیلیک می‌کند(۴۲). گرچه این واکنش‌ها از طریق ذخیره مناسب و شرایط فرمولاسیون ماده نهایی داروئی قابل کنترل است، ولی محصول داروئی در طی فرمانتاسیون، پردازش پائین دستی در بدن (به سبب پیرشدن و تاثیر شدید بر روی سایر عملکردهای بیولوژیک از طریق آنزیم‌ها و مسیرهای سیگنالینگ) را اغلب نمی‌توان به خوبی کنترل کرد (۴۳). اگر باقیمانده‌های اسپارژین و آسپارتات در شناسایی آنتی‌ژن دخیل باشند، تغییر شیمیایی آن‌ها می‌تواند سبب از دست رفتن شدید توانایی و عملکرد آنتی‌بادی گردد (۴۴، ۴۵). از این رو بهتر است عوامل مستعد فرسایش دارو در مراحل اول با روش‌های بیوانفورماتیک اصلاح شوند. همچنین توالی اولیه، ثابت دی‌الکتریک حلال، درجه حرارت و pH نقش مهمی در فرسایش آسپارژین و آسپارتیک دارند (۴۶، ۴۷).

پایگاه‌های داده و منابع اطلاعاتی آنتی‌بادی‌ها

منابع زیادی اطلاعات مرتبط با آنتی‌بادی‌ها را مهیا می‌کنند و در سال‌های اخیر تعداد پایگاه‌های بیولوژیک به سرعت افزایش یافته‌اند. در سال ۲۰۱۳ پایگاه NAR ژورنال آکسفورد، ۱۵۱۲ پایگاه داده مرتبط با بیولوژی مولکولی را فهرست کرده است. در جدول ۱ پایگاه‌های گوناگون آنتی‌بادی که برای کشف دارو با اهمیت هستند به طور خلاصه جمع‌آوری گردیده است (۱).

نتیجه‌گیری و بحث

تا سال ۲۰۰۹، در فرآیند ساخت ۱۱ مورد از ۲۱ مورد از آنتی‌بادی‌های داروئی، از رهیافت‌های مدلینگ و بهینه‌سازی استفاده شده است، که از آن جمله می‌توان به: Zenapax (humanized anti-Tac) یا (daclizumab Herceptin (humanized anti-HER۲، یا trastuzumab و Avastin (humanized anti-VEGF) یا bevacizumab اشاره کرد (۴۸). مدلینگ آنتی‌بادی با کیفیت جهت طراحی منطقی و بهبود افینیتی آنتی‌بادی‌ها و میانکنش‌های آن‌ها با آنتی‌ژن‌ها ضروری است و می‌توان برای عملکرد هرچه بهتر آنتی‌بادی‌های مهندسی شده علیه آنتی‌ژن‌های بیگانه در صورت وجود توالی نواحی متغیر آن‌ها نظیر آنتی‌بادی‌های علیه سموم (۴۹) استفاده شود. روش‌های خودکار فعلی مدلینگ مدل‌های با کیفت مناسب را برای نواحی بسیار متغییر به جز H۳ می سازند. روش از آغاز (Ab initio) ممکن است کانفورمیشن لوپ H۳ را با دقت بیشتری پیشگویی کند. در هر صورت می‌بایست تاکید کنیم دانش حرفه‌ای همچنان نیاز است به عنوان مثال در زمان انتخاب الگوهای مناسب و یا برای طراحی منطقی آنتی‌بادی، زمانی که توالی‌های جدید آنتی‌بادی پدیدار می‌شوند. این مقاله به عنوان نخستین مقاله طراحی پیشرفته آنتی‌بادی تلاشی را جهت آشنا کردن محققین ایرانی با ابزارهای این زمینه علمی ارائه داشته است. امید است در آینده نزدیک در ایران نیز شاهد استفاده از این ابزارها جهت تولید آنتی‌بادی‌های موثرتر باشیم.

منابع مورد استفاده

1. Shirai, H., Prades, C., Vita, R., Marcatili, P., Popovic, B., Xu, J.,2014. Antibody informatics for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1844: 2002-2015

2. Ranjbar, M.M., ghelianchian, A., nazoktabar, A., ahmadi, N., khoshnevisan, R.,2013. Immunoinformatics and epitope prediction methods dynamic science with promising achievements. *J of Ilam University of med Sc,* 21 ,6:300-309.

3. Ranjbar, M.M., Ahmadi, N.A., Ghorban, K.h., Ghalyanchi Langeroudi. A., Dadmanesh, M., Amini, H.R., Sedighi Moghaddam, B.,2014. Immnoinformatics: novel view in understanding of immune system function, databases and prediction of immunogenic epitopes. 17: 1.

4. Motamed, N.,2013. Experimental infection with avian influenza virus subtype H9N2 in broiler chicks infected with infectious bursal disease virus. Shahid Chamran University. Ahvaz, Iran.

5. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S.,2015. Cellular and molecular immunology. 8th edition. Chapter 5:Antibody and Antigens. Publisher Elsevier,87-106.

6. Ranjbar, M.M., Malekan, M., Mirabad, M.M.,2012. Nanobodies: Evalution structure, benefits and applications. 1: 21-26.

7. Teng, G., Papavasiliou, F.N.,2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* ,41:107–120.

8. Kuroda, D., Shirai, H., Kobori, M., Nakamura, H.,2008. Structural classification of CDR-H3 revisited: a lesson in antibody modeling, 73: 608–620.

9. Jawa, V., Cousens, L.P., Awwad, M., Wakshull, E., Kropshofer, H., De Groot, A.S.,2013. T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: preclinical assessment and mitigation. *Clin Immunol,*149: 534–555.

10. Reddy, S.T., Ge, X., Miklos, A.E., Hughes, R.A., Kang, S.H., Hoi, K.H., 2010. Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol* , 28: 965–969.

11. Esmaielbeiki, R., Krawczyk, K., Knapp, B., Nebel, J.C., and Deane, C.M.,2015. Progress and challenges in predicting protein interfaces. *Brief in Bioinfo* : 1–15.

12. Kringelum, J.V., Lundegaard, C., Lund, O., Nielsen, M.,2012.

Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol,* 8: e1002829.

13. Ramaraj, T., Angel, T., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J., Mumey, B.,2012. Antigen-antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. *Biochim Biophys Acta*, 1824(3): 520–532.

14. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., Chothia, C.,1997. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol,* 273:927–948.

15. Zemlin, M., Klinger, M., Link, J., Zemlin, C., Bauer, K., Engler, J.A., Schroeder, H.W., Kirkham, P.M.,2003. Expressed murine and human cdr-h3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J Mol Biol*, 334(4): 733-749.

16. Miklos, E., Kluwe, C., Der, S., Pai, S., Sircar, A., Hughes, A., 2012. Structure-based design of supercharged, highly thermoresistant antibodies. *Chem Biol*, 19: 449–455.

17. Xu, J., Tack, D., Hughes, A., Ellington, D., Gray, J.,2014. Structure-based non-canonical amino acid design to covalently crosslink an antibody–antigen complex. *J Struct Bio*l, 185: 215–222.

18. Kiyoshi, M., Caaveiro, M., Miura, E., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Soga, S,.2014. Affinity improvement of a therapeutic antibody by structurebased computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody–antigen complex. *PLoS One*, 9e87099.

19. Tharakaraman, K., Robinson, N., Hatas, A., Chen, L., Siyue, L., Raguram, S., 2013. Redesign of a cross-reactive antibody to dengue virus with broad-spectrum activity and increased in vivo potency. *Proc Natl Acad Sci*, 110: 1555–64.

20. Chothia, C., Lesk, M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, J., Air, G.,1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342: 877–883.

21. North, B., Lehmann, A., Dunbrack, R.L,2011. A new clustering of antibody CDR loop conformation. *J Mol Biol*, 406: 228–256.

22. Chailyan, A., Marcatili, P., Cirillo, D., Tramontano, A.,2011. Structural repertoire of immunoglobulin lambda light chains. *Proteins*, 79: 1513–1524.

23. Verdino, P., Witherden, D.A., Podshivalova, K., Rieder, S.E., Havran, W.L., Wilson, I.A.,2011. cDNA sequence and Fab crystal structure of HL4E10, a hamster IgG lambda light chain antibody stimulatory for gammadelta T cells. *PLoS One*, 6e19828.

24. Sircar, A., Sanni, K.A., Shi, J., Gray, J.J., 2011. Analysis and modeling of the variable region of camelid single-domain antibodies. *J Immunol*, 186: 6357–67.

25. Whitelegg, NR., Rees, A.R.,2000. WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng*, 13: 819–824.

26. Zhao, Z., Worthylake, D., LeCour, J., Maresh, G.A., Pincus, S.H., 2012. Crystal structure and computational modeling of the fab fragment from a protective anti-ricin monoclonal antibody. *PLoS One,*7,12:e52613.

27. Holm, L., Laaksonen, L., Kaartinen, M., Teeri, T., Knowles, J.K.,1990. Molecular modeling study of antigen binding to oxazolone-specific antibodies: the Ox1 idiotypic IgG and its mature variant with increased affinity to 2-phenyloxazolone. *Protein Eng*, 3: 403–409.

28. Martin, A.C., Cheetham, J.C., Rees, A.R.,1989. Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 9268–72.

29. Kunik, V., Peters, B., Ofran, Y.,2012. Structural consensus among antibodies defines the antigen binding site. *PLoS Comput Biol,*8:e1002388.

30. Morea, V., Tramontano, A., Rustici, M., Chothia, C., Lesk, A.M.,1998. Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 275:269–294.

31. Choi, Y., Deane, C.M.,2011. Predicting antibody complementarity determining region structures without classification. *Mol Biosyst,* 7: 3327–34.

32. Sela-Culang, I., Alon, S., Ofran, Y.,2012. A systematic comparisonof free andboundantibodies reveals binding-related conformational changes. *J Immunol,* 189: 4890–99.

33. Zhu, K., Pincus, D.L., Zhao, S., Friesner, R.A.,2006. Long loop prediction using the protein local optimization program. *Proteins*, 65: 438–452.

34. Dunbar, J., Fuchs, A., Shi, J., Deane, C.M.,2013. ABangle: characterising the VH–VL orientation in antibodies. Protein Eng Des Sel, 26: 611–620.

35. Waldmann, H., and Hale, G.,2005. CAMPATH: from concept to clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 29: 1707-11.

36. Novotný, J., Handschumacher, M., Haber, E., Bruccoleri, R.E., Carlson, B., Fanning, W., 1986. Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains). *Proc Natl Acad Sci*, 83(2):226-30.

37. Hu, W.G., Yin, J., Chau, D., Negrych, L.M., Cherwonogrodzky, J.W., 2012.Humanization and characterization of an anti-ricin neutralization monoclonal antibody. *PLoS One.* 7,9:e45595.

38. Sundberg, E.J., Urrutia, M., Braden, B.C., Isern, J., Tsuchiya, D., Fields, B.A., 2000. Estimation of the hydrophobic effect in an antigen-antibody protein-protein interface. *Biochemistry*, 39:15375–87.

39. Moreira, I.S., Fernandes, P.A., Ramos, M.J.,2007. Hot spot computational identification: application to the complex formed between the hen eggwhite lysozyme (HEL) and the antibody Hy-HEL-10. *Int J Quantum Chem*, 107:299–310.

40. Wang. X., Das. T.K., Singh. S.K., Kumar, S.,2009. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: a survey of commercial monoclonal antibodies. MAbs, 1: 254–267.

41. Brenke, R., Hall, D.R., Chuang, G.Y., Comeau, S.R., Bohnuud, T., Beglov, D., 2012. Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking. *Bioinformatics*, 28:2608–14.

42. Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van, D.A., Sanglier-Cianferani, S.,2013. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem*, 85: 715–36.

43. Simpson, R.J.,2010. Stabilization of proteins for storage. *Cold Spring Harb Protoc* 2010; 5 doi:10.1101/pdb.top79.

44. Wakankar, A.A., Liu, J., Vandervelde, D., Wang, Y.J., Shire, S.J., Borchardt, R.T., 2007. The effect of cosolutes on the isomerization of aspartic acid residues and conformational stability in a monoclonal antibody. *J Pharm Sci*, 96: 1708–18.

45. Huang, L., Lu, J., Wroblewski, V.J., Beals, J.M., Riggin, R.M.,2005. In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal Chem* 2005; 77: 1432–39.

46. Yan, B., Steen, S., Hambly, D., Valliere-Douglass, J., Vanden, B.T., Smallwood, S., 2009. Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain. *J Pharm Sci*, 98: 3509– 3521.

47. Kosky, A.A., Dharmavaram, V., Ratnaswamy, G., Manning, M.C., 2009. Multivariate analysis of the sequence dependence of asparagine deamidation rates in peptides. *Pharm Res*, 26: 2417–2428.

48. Schwede, T., Sali, A., Honig, B., Levitt, M., Berman, H.M., Jones, D.,2009. Outcome of a workshop on applications of protein models in biomedical research. *Structure* ,17: 151–159.

49. Motedayen, M., Nikbakht, G., Rasaee, M., Zare Mirakabadi, A.,2015. Construction of a human recombinant polyclonal Fab fragment antibody library using peripheral blood lymphocytes of snake bitten victims. *Archives of Razi institute*, 70,4 : 255-261.