



抗体片段在铂纳米粒子表面的构象重构*

盛玲洁 徐 佳 戴静静 王海芳 曹傲能**

(上海大学环境与化学工程学院, 纳米化学与生物学研究所, 上海 200444)

摘要 目的 最近在金纳米粒子 (AuNPs) 表面重构抗体片段的天然构象和功能的研究表明分子构象工程的可行性。本质上, 分子构象工程就是要像蛋白质折叠一样, 通过精确控制柔性非功能分子的构象使其产生新功能。本文在铂纳米粒子 (PtNPs) 表面重构抗体互补决定簇区 (CDR) 片段的天然构象和功能, 旨在探索分子构象工程的普适性及揭示蛋白质结构-功能机制。**方法** 本文将抗溶菌酶抗体 (cAB-lys3) 中的 CDR3 片段 (在单独存在时没有稳定构象和功能) 通过两个 Pt-S 键偶联到 PtNPs 表面。CDR 片段的天然构象和功能的恢复通过它对溶菌酶活性的抑制来表征。**结果** 通过多肽密度优化和表面聚乙二醇修饰, 制得基于 PtNPs 的抗溶菌酶人工抗体 (简称铂抗体)。溶菌酶活性测试结果表明, 铂抗体可以特异性结合溶菌酶并显著抑制其活性。**结论** 本文第一次在 PtNPs 表面重构了蛋白质片段的天然构象并恢复了其功能, 证明分子构象工程可作为一种通用方法制备基于纳米粒子的人工蛋白质。

关键词 抗体, 溶菌酶, 构象工程, 铂纳米粒子, 多肽**中图分类号** O641**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0139

以纳米粒子 (NPs) 来模拟天然蛋白质既是一个重要的科学问题, 也具有广阔的生物医学应用前景^[1]。目前赋予 NPs 与蛋白质特异性作用的生物功能的常用方法是在 NPs 表面直接连接具有该功能的分子基团^[2-3]。比如, 很多研究都在 NPs 表面直接修饰完整的蛋白质, 但由于 NPs 对蛋白质构象的影响以及难以控制 NPs 上蛋白质的取向, 作用效果常常低于预期, 而且蛋白质较大的分子体积也常常影响作用效果和应用范围^[4]。在 NPs 表面直接连接具有活性的蛋白质片段也是一种常用的手段^[5], 但绝大多数蛋白质片段离开了原来的蛋白质骨架后就失去了稳定的构象和功能, 因此这种方法的应用范围也极为有限。

能不能在 NPs 上重建蛋白质片段的天然构象, 从而恢复其天然活性呢? 针对这个问题, 最近本课题组^[6]提出“构象工程”概念, 旨在通过精确控制 NPs 表面的柔性基团 (多肽片段) 的构象赋予 NPs 新的生物功能。和通常应用一个化学键把多肽连接到 NPs 上的方法不同, 本课题组^[6]巧妙地通过两个 Au-S 键将一段来自天然抗体、单独存在时没有稳定构象和功能的互补决定簇区 (CDR) 多

肽连接到金纳米粒子 (AuNPs) 表面, 成功地重建了 CDR 多肽的天然构象, 得到了像原天然抗体一样能特异性识别原抗原的纳米人工抗体——金抗体 (Goldbody)。进一步的丙氨酸扫描突变等实验证明, 金抗体中 CDR 片段的结合构象与其在原天然抗体中的完全一致^[7]。这一构象工程技术也得到了其他课题组的理论计算和实验的验证^[8-9]。Liu 等^[10]和 Wang 等^[11]后续利用构象工程技术制备出了多种靶向不同抗原的金抗体, 同时, 许艳娇等^[12]研究表明, 金抗体在实际应用中有望代替天然抗体。这些金抗体不仅具有和原天然抗体一样的特异性, 而且稳定性更好。Willson 教授^[13]专门为这一构象工程技术创造了一个特殊的术语“金化”, 将其与医用抗体中的“人源化”技术相比。在金抗体工作取得成功的基础上, Xu 等^[14]研究发现, 构象工程技术并不仅仅局限于 AuNPs, 在银纳米

* 国家自然科学基金 (22071145, 32371318) 和国家重点研发计划 (2016YFA0201602) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-66135277-102, E-mail: ancao@shu.edu.cn

收稿日期: 2023-04-11, 接受日期: 2023-05-29

粒子 (AgNPs) 上同样可以重建 CDR 片段的天然构象, 并制备出了能特异性结合原抗原的银抗体。

金抗体和银抗体的成功表明了构象工程技术可能是一种普适性的技术, 只要 NPs 表面的原子具有流动性以保证连接的多肽能够进行构象调整, 其他 NPs, 特别是与 Au 和 Ag 相似的贵金属 NPs 都可以作为构象工程的骨架。在众多贵金属中, 铂的化合物和铂纳米粒子 (PtNPs) 在抗肿瘤治疗中具有广阔的应用前景^[15-16]。此外, PtNPs 由于具有良好的热稳定性和较高的光热转换效率, 还常被用作抗癌药物的载体^[17]。如果能够应用构象工程技术开发基于 PtNPs 的铂抗体, 即赋予 PtNPs 像天然抗体一样的、特异性识别靶蛋白的能力, 那将为研发高度靶向性的 PtNPs 药物载体提供一条全新的路径。

本文以在金抗体和银抗体中都取得成功的抗溶菌酶天然抗体 (cAB-lys3) 中 CDR3 多肽片段为研究对象, 通过两个 Pt-S 键将其连接到 2.5 nm 的 PtNPs 上, 经过 PtNPs 表面多肽密度调控和聚乙二醇 (PEG) 修饰等优化过程, 成功地制备出了能够特异性识别溶菌酶并抑制其活性的铂抗体。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、浓硝酸、浓盐酸、二水合柠檬酸钠、六水合氯铂酸和硼氢化钠购于国药集团化学试剂有限公司; 铂标准溶液 (100 mg/L) 购于钢研纳克检测技术有限公司; 溶菌酶和溶壁微球菌购于美国 Sigma-Aldrich 公司; SH-PEG-SH (平均分子质量为 1 ku) 购于上海芃硕生物科技有限公司。所用试剂均为分析纯。多肽 P1、多肽 P1m 和多肽 P1s 购于上海科肽生物科技有限公司, 纯度均大于 95%。实验中使用超纯水 (18.2 MΩ·cm, 美国 Millipore 公司)。

U-3010 型紫外-可见分光光度计 (日本 HITACHI 公司); HT7700 型透射电子显微镜 (日本日立公司); ZS90 型纳米粒度分析仪 (英国 Malvern 公司); F-7000 型荧光光谱仪 (日本 HITACHI 公司); PinAAcle 900T 型原子吸收光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司)。

1.2 PtNPs 的合成

参考和改进了文献 [18-20] 中的水热合成方法, 制备了 PtNPs。具体来说, 在 25℃ 恒温水浴中, 向盛有 38 ml 超纯水的圆底烧瓶中加入 1 ml 浓度为 16 mmol/L 的氯铂酸溶液和 1 ml 浓度为

40 mmol/L 的柠檬酸钠溶液, 搅拌 30 min。之后用注射泵逐滴加入 0.2 ml 新鲜配制的 50 mmol/L 的硼氢化钠, 搅拌 1 h。制备完成后样品封口避光保存于 4℃ 冰箱中待用。使用前用 0.22 μm 滤膜过滤。

1.3 PtNPs 浓度及粒径的测定

采用原子吸收光谱仪 (AAS) 对 PtNPs 样品的浓度进行定量。首先, 将一定体积的样品溶液加入超滤管 (Amicon-Ultra-15, 截留分子质量为 3 ku, Millipore 公司) 中, 5 000 g 转速下超滤 20 min, 去除未反应的氯铂酸; 随后, 向浓缩好的样品中加入新鲜配制的王水, 使其充分溶解, 再加热赶酸并定容, 最后在 AAS 上测量。标准曲线由用氯铂酸标准溶液配制的一系列不同浓度的标样绘制。样品来自 3 个不同批次合成的 PtNPs, 每个批次的样品分析 3 个平行样, 测量结果取平均值。PtNPs 的粒径结合电镜图进行统计分析。最后, 用 PtNPs 的颗粒半径 (r)、样品中 Pt 的浓度以及 Pt 的密度 (ρ , 21.45 g/cm³), 根据公式 (1) 计算出样品中 PtNPs 的摩尔浓度。

$$[\text{PtNPs}] = [\text{Pt}] / (N_A \rho \frac{4}{3} \pi r^3) \quad (1)$$

其中 N_A 是阿伏伽德罗常数。

1.4 铂抗体的制备

取 6 ml PtNPs 溶液加入 10 ml 玻璃瓶中, 玻璃瓶放置在磁力搅拌器上, 转速设置为 650 r/min。随后, 向玻璃瓶中加入 10 μl 0.2 mol/L 的柠檬酸钠溶液, 提高溶液的稳定性, 防止 PtNPs 发生团聚。接着, 在搅拌的条件下将 2 ml 多肽溶液 (或多肽与 SH-PEG-SH 的混合溶液) 逐滴匀速地加入到 PtNPs 溶液中, 室温下反应 12 h。反应结束后, 将多肽修饰后的 PtNPs 样品避光放置于 4℃ 冰箱备用。

1.5 PtNPs 接肽后的表征

将多肽修饰后的 PtNPs 溶液加入超滤管 (Amicon-Ultra-15, 截留分子质量为 30 ku, Millipore 公司) 中, 1 500 g 转速下超滤 15 min, 收集下清溶液。通过荧光光谱仪来测量反应前和反应后游离多肽的荧光强度, 以定量多肽嫁接到 PtNPs 表面的效率。多肽的荧光强度测量的激发波长设置为 280 nm, 激发狭缝宽度为 5 nm, 发射狭缝宽度为 5 nm, 发射谱的波长收集范围是 300~400 nm。同时, 采用纳米粒度仪表征多肽修饰前后 PtNPs 水合粒径的变化。

1.6 铂抗体对溶菌酶活性抑制的检测

利用紫外-可见分光光度计检测在铂抗体及对

照样品存在条件下, 溶菌酶酶解溶壁微球菌导致细菌吸光度的变化来定量测定溶菌酶的酶活^[21-22]。整个测试体系的温度控制在 25℃, 溶液环境是 pH=6.2 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液。为了保证对溶菌酶活性的抑制效果, 铂抗体与溶菌酶的摩尔浓度比控制在 1 : 1~1 : 3 之间, 且溶菌酶浓度固定为 30 nmol/L, 溶壁微球菌的浓度固定为 0.13 g/L。在实验开始前, 先将溶菌酶和溶壁微球菌溶液分别置于 25℃ 恒温水浴中预孵育 1 h。实验中, 取 1 ml 样品加入 5 ml 离心管中, 并在 25℃ 恒温水浴中孵育

3 min, 随后加入 0.5 ml 溶菌酶溶液, 震荡混合均匀, 1 min 后向其中加入 1 ml 溶壁微球菌溶液, 快速震荡混合均匀, 30 s 后, 取 1 ml 三者混合液加入比色皿中, 用紫外-可见分光光度计测量其 90 s 内 450 nm 处的吸光度随时间的变化, 溶菌酶活性以吸光度随时间变化曲线的斜率表示。在测定溶菌酶活性的抑制实验中, 铂抗体及对照样品预先和溶菌酶溶液混合, 再按上述方法测定溶菌酶活性, 并根据公式 (2) 计算出抑制率。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{有抑制剂存在时的斜率}}{\text{无抑制剂时的斜率}} \right) \times 100\%$$

(2)

2 结果与讨论

2.1 铂抗体的设计

铂抗体的设计思想如图 1 所示。P1 是从 cAB-lys3 的 CDR3 中截取的多肽片段, 并在其两端各添加一个半胱氨酸, 以便通过 Pt-S 键将多肽片段的两个末端连接在 PtNPs 表面。自由状态下的 P1 没有稳定的构象, 因而也就没有识别抗原的功能。只有通过构象工程在 PtNPs 表面重建 P1 在原抗体中的天然构象后, 才可能像原天然抗体 cAB-lys3 一样, 通过 CDR3 深插到溶菌酶的活性位点裂缝与溶菌酶特异性结合, 并抑制溶菌酶的活性^[23-24]。为了减

少铂抗体对蛋白质的非特异性吸附, 根据前期研究成果^[25], 还引入 SH-PEG-SH 来辅助多肽的构象工程。另外, 和金抗体及银抗体工作一样, 为了对比显示构象工程的效果, 本文将两条对照多肽, P1m 和 P1s, 也分别修饰到 PtNPs 表面。其中, P1m 仅仅比 P1 少了 C 端的半胱氨酸, 只能一端锚定在 PtNPs 上, 因而无法对其构象进行精确调控, P1s 具有和 P1 相同的氨基酸组成, 在两端都有半胱氨酸, 但中间序列则被完全打乱, P1s 被用来作为和溶菌酶非特异性相互作用的对照多肽。如果构象工程可以在 PtNPs 上实现, 则 PtNPs 和多肽的复合物 (PtNP-Pep) 对溶菌酶酶活的抑制率的顺序应该为: PtNP-P1>PtNP-P1m>PtNP-P1s。

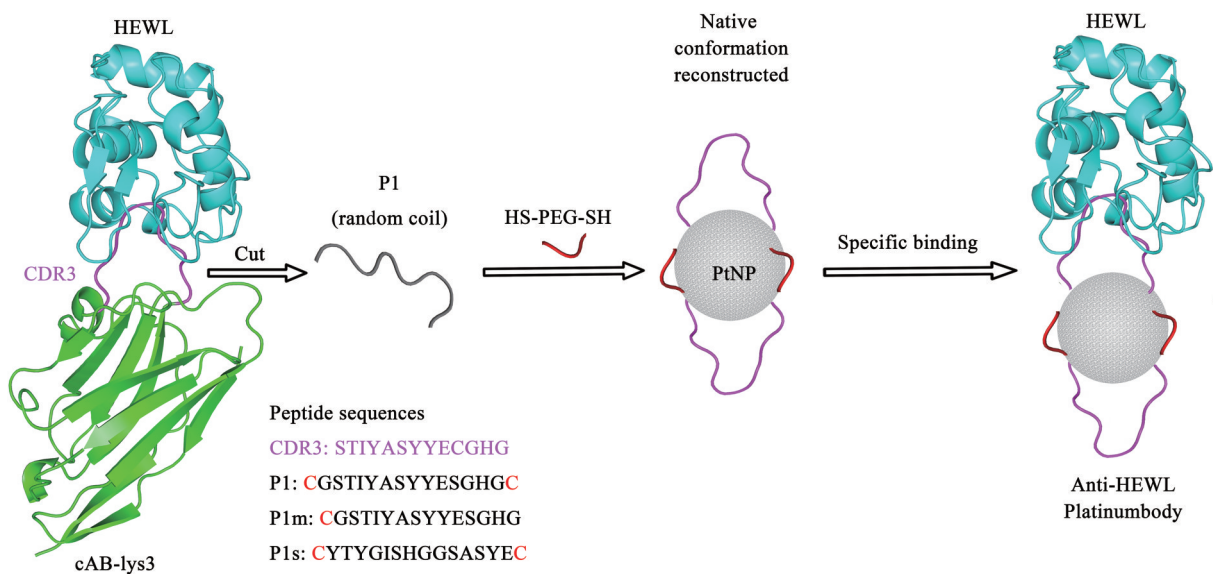


Fig. 1 Scheme of the design of the anti-HEWL Platinumbody
Reconstruction of the native conformation of the CDR3 fragments of the anti-lysozyme antibody (cAB-lys3) onto a PtNP results in an anti-HEWL artificial antibody (Platinumbody), in which polyethylene glycol with two terminal —SH (HS-PEG-SH, molecular mass ~1 ku) helps to reduce non-specific interaction. For clarity, only two peptides and two PEGs are shown on the Platinumbody.

2.2 PtNPs的形貌表征及浓度测定

采用透射电子显微镜 (TEM) 对PtNPs进行了形貌表征。由图2a可见, PtNPs保持着良好的分散

性, 粒径也较为均一。对TEM图的PtNPs粒径进行统计 (图2b), 得到PtNPs平均粒径约为2.5 nm。

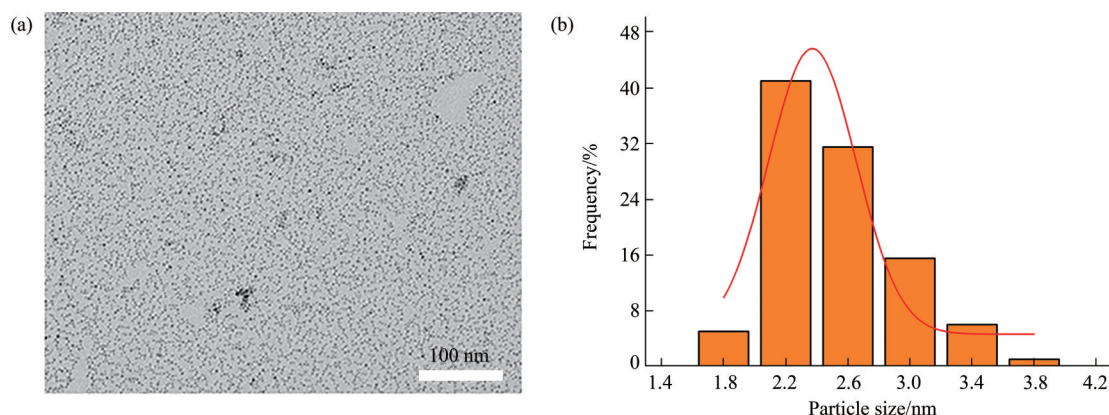


Fig. 2 Characterization of PtNPs

(a) TEM image of the PtNPs. (b) Size distribution of the PtNPs.

利用AAS对合成的PtNPs样品的浓度进行定量。如表1所示, 样品批次间的平行性良好, 说明合成和纯化方法重复性好。取不同批次的平均值

23.77 mg/L作为样品中PtNPs的含量。结合TEM测量的PtNPs粒径约为2.5 nm, 根据公式 (1), 计算得到合成出来的PtNPs浓度为225 nmol/L。

Table 1 Pt contents of the PtNP solutions determined by AAS

Element	Batch1/(mg·L ⁻¹)	Batch2/(mg·L ⁻¹)	Batch3/(mg·L ⁻¹)	Average/(mg·L ⁻¹)
Pt	22.83±0.68	24.13±0.22	24.35±0.96	23.77±0.63

2.3 多肽修饰后PtNPs的理化性质表征

经不同多肽修饰后的PtNPs依然保持着良好的分散性, 粒径也较为均一 (图3)。同时, 为了定性表征多肽成功修饰在PtNPs表面, 采用纳米粒度

仪对多肽修饰前后PtNPs水合粒径的变化进行测定。如图4所示, 经多肽修饰的PtNPs相较于未被修饰的PtNPs粒径发生了明显地增大。水合粒径的增大证明了多肽已成功地修饰在PtNPs表面。

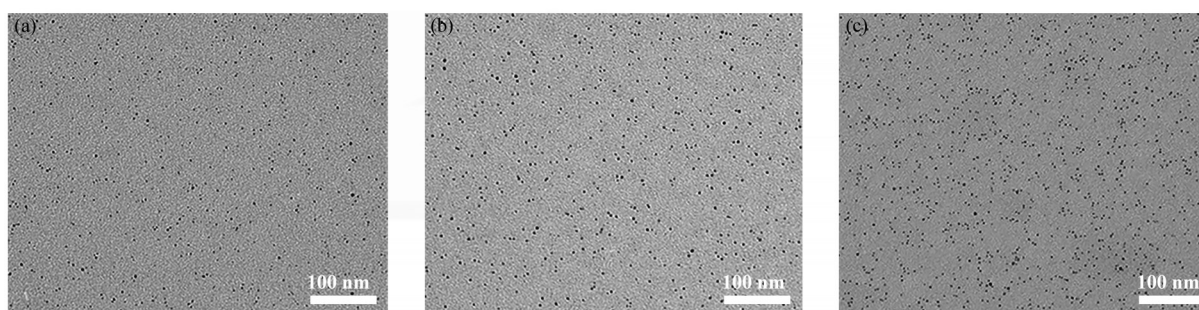


Fig. 3 TEM images of PtNP-peptide conjugates

(a) PtNP-P1. (b) PtNP-P1m. (c) PtNP-P1s.

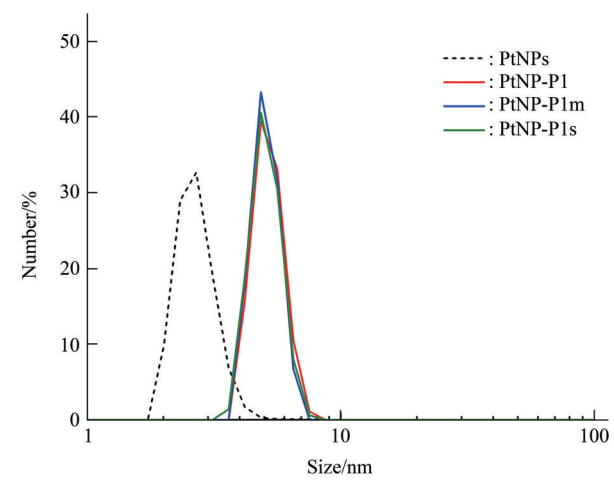


Fig. 4 Sizes of PtNPs and PtNP-peptide conjugates in water characterized by dynamic light scattering (DLS)

为了定量多肽连接到PtNPs上的效率, 本文通过超滤的方法, 用荧光光谱仪测定了反应前总的多肽和反应后游离多肽的荧光强度。当PtNPs浓度为225 nmol/L, 多肽与PtNPs的摩尔投料比为60 : 1时, 反应后的游离多肽与投入多肽的荧光强度相比极弱 (图5)。这一结果表明, 在此条件下溶液中几乎不含游离的多肽, 也就是说几乎100%的多肽已修饰到PtNPs表面。

2.4 PtNPs表面多肽的构象调控

金抗体和银抗体的研究都表明, 优化NPs表面

的多肽密度可以更好地调控多肽构象。优化多肽密度有两方面的作用。一方面, 合适的多肽密度可以对多肽在NPs表面的移动加以必要的限制; 另一方面, 覆盖NPs表面, 以避免NPs普遍存在的对蛋白质的非特异性吸附。参考前期金抗体和银抗体的结果, 首先在2.5 nm的PtNPs表面连接了60条多肽 (简称为PtNP-60P1, 其他依此类推), 对它的抗溶菌酶活性进行了测定。图6所示的溶菌酶测活结果表明, 30 nmol/L的PtNP-60P1可以显著地抑制溶菌酶的活性, 但30 nmol/L的PtNP-60P1s也具有较强抑制能力, 表明PtNP-60P1s存在明显的非特异性相互作用。由于抑制剂对酶的抑制率随浓度的增加存在饱和效应, 30 nmol/L已经超过PtNP-60P1和PtNP-60P1m的最大抑制浓度, 因此它们之间的差距被掩盖。为了展示PtNP-60P1和PtNP-60P1m抑制能力的差别, 又检测了15 nmol/L时两者对溶菌酶活力的抑制能力。结果显示, 当浓度降低到15 nmol/L后, PtNP-60P1对溶菌酶的抑制能力要显著强于PtNP-60P1m, 初步显示出了构象工程的效果 (图6)。尽管PtNP-P1m不能控制多肽构象, 但P1m本身具有微弱的活性, 而且由于每个PtNP-P1m上有60条多肽, 多价效应能够显著增强P1m的活性, 使得PtNP-P1m也表现出略高于PtNP-P1s的抑制能力, 但差别没有统计显著性。

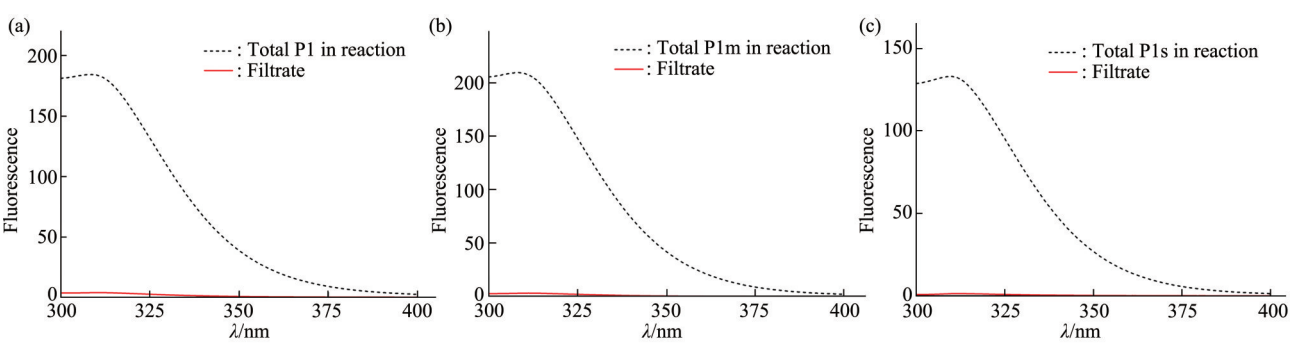


Fig. 5 Conjugation efficiency shown by the fluorescence spectra of the total peptides (dotted black lines) before conjugation onto PtNPs and the free peptides (red lines) after conjugation
(a) Conjugation of P1. (b) Conjugation of P1m. (c) Conjugation of P1s.

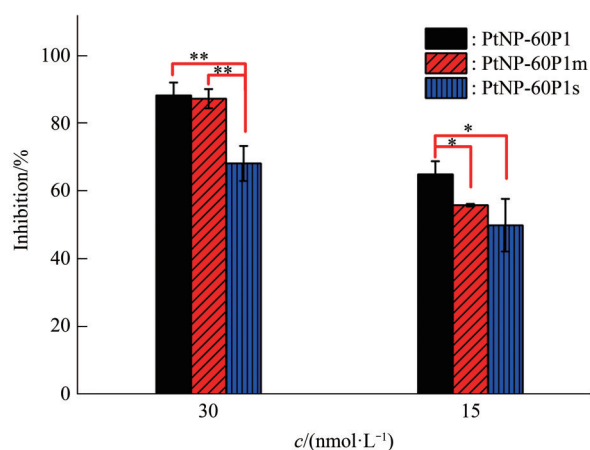


Fig. 6 Inhibition of the enzymatic activity of lysozyme by the PtNP-peptide conjugates with different concentrations

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6的抑制酶活结果符合预期的PtNP-P1>PtNP-P1m>PtNP-P1s顺序,初步显示了构象工程的成功。但PtNP-P1s显示出比前期AuNP-P1s和AgNP-P1s更强的非特异性吸附能力^[6, 14]。而且,和AuNP-P1s非特异性随着P1s密度的增加而下降的趋势不同^[6],即使增加P1s在PtNPs上的密度并不能降低PtNP-P1s对溶菌酶的非特异性吸附(图7),这种区别可能是NPs的粒径不同造成的^[26-27]。PtNP-Pep中的PtNPs粒径只有2.5 nm,比先前金抗体中的AuNPs(3.6 nm)和银抗体中的AgNPs(5 nm)粒径更小,更容易进入溶菌酶的活性裂缝处。同时虽然P1s序列已被打乱,但P1s能与溶菌酶活性位点结合的3个关键疏水残基Tyr(对应于原天然抗体中的Y99、Y100b、Y100c)依然存在,

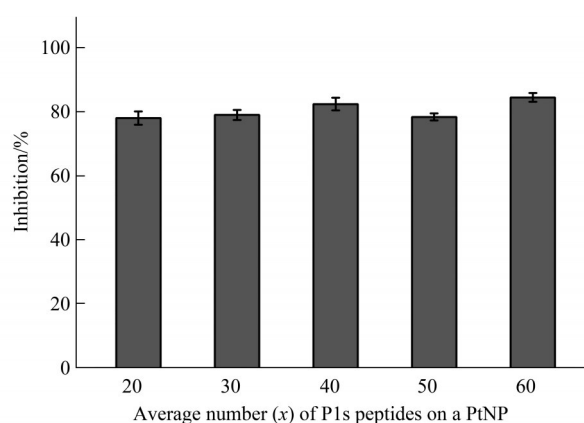


Fig. 7 Inhibition of the enzymatic activity of lysozyme by the PtNP-xP1s conjugates with various peptide densities on the surface of PtNPs

这样同一PtNPs上的多个P1s多肽上的疏水残基可能同时与溶菌酶相互作用而产生较强的“非特异性”结合。

研究显示,在NPs上嫁接双头巯基的PEG可以辅助多肽在NPs表面的构象工程,大大减少多肽的用量^[25];同时,PEG是FDA批准的安全聚合物,且容易功能化在NPs表面,对NPs表面进行空间屏蔽,能有效地减少NPs对蛋白质的吸附^[28-29]。因此,本工作随即在PtNPs表面修饰了一定数量的双头巯基PEG。考虑到PEG链的柔性,为避免过长的PEG链覆盖在多肽表面,从而降低P1对溶菌酶的特异性吸附,本文选择了分子质量为1 ku的短链双头巯基PEG。从图8a可见,当每个粒子上的P1s多肽数量降低并固定在20个时,随着PEG个数的增加,PtNP-P1s对溶菌酶活性的抑制率下降,表明与溶菌酶的非特异性结合减少。当PEG个数为10时,PtNP-P1s对溶菌酶的非特异性吸附已显著减弱,继续增加PEG数量虽然可以进一步减少非特异性吸附,但减弱程度变小并逐渐趋于稳定。因为后续还需要在粒子上修饰多肽P1,所以选定PtNPs表面修饰PEG的个数为10。

为了进一步优化多肽密度,实验中固定PtNPs上PEG数为10,同时固定P1数量为20,然后通过添加不同数量的P1s,分析粒子对溶菌酶活性的影响。这样设计主要是为了保持具有较强的特异性吸附的P1数量不变,用弱吸附的P1s来调控密度,以尽量减少多价效应对结果判断的影响。由图8b可见,在固定10PEG和20P1的条件下,在PtNPs表面再嫁接10个P1s对溶菌酶活性的抑制明显优于其他数量的P1s。基于上述实验结果,最终选定PtNPs表面的最佳功能基团密度为每个PtNP(2.5 nm)上连接10条PEG和30条多肽,而PtNP-10PEG-30P1即为本工作优化得到的抗溶菌酶铂抗体。

图9显示了30 nmol/L的铂抗体对30 nmol/L溶菌酶活性抑制的结果,可见铂抗体对溶菌酶的抑制能力显著高于作为对照的PtNP-10PEG-30P1m和PtNP-10PEG-30P1s。特别需要指出的是,相比图6中的PtNP-60P1,铂抗体中P1数量减少了一半,因而多价性效应的作用已大大减少,同时PEG的引入也降低了铂抗体对溶菌酶的非特异性吸附。因此图9显示的铂抗体对溶菌酶活性的显著抑制能力很好地证明了在PtNPs上构象工程的成功。但与金抗体和银抗体相比,在PtNPs上进行构象工程难度较

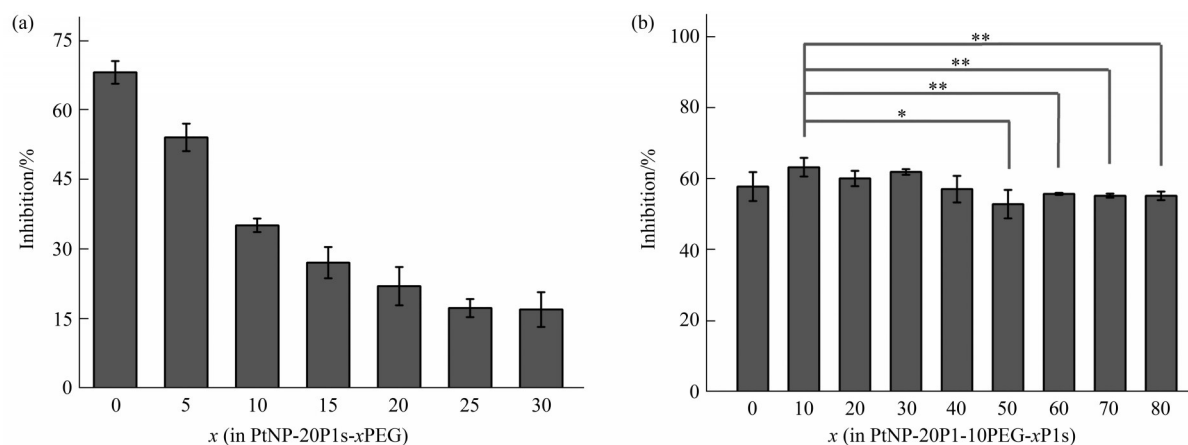


Fig. 8 Reducing non-specific interaction by PEG and optimizing specific interaction by adjusting the density of P1 on PtNPs

(a) Reducing the non-specific interaction by conjugating different numbers (x) of PEG, as shown by the inhibition of lysozyme by PtNP-20P1s- x PEG. (b) Optimizing the density of P1 to maximize the inhibition of lysozyme by PtNP-20P1-10PEG- x P1s, the number of P1 was kept constant to prevent multivalency effect for accurate evaluation of the effect of peptide density. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

大,这也是预料之中的结果。以金抗体为代表的通过在AuNPs上重构天然蛋白质片段的天然构象来制备人工抗体之所以能够成功,首先是因为这些片段有形成其天然构象的倾向性,其背后的理论基础是蛋白质结构的“限域下最低能量片段”理论^[30-31]。其次还要求NPs表面的原子像金、银、铂一样具有一定的流动性,使得通过调整多肽两端在NPs上的跨度调控多肽的构象成为可能^[6, 13]。金属的熔点大致反映了NPs位于晶格最外层的原子的活泼性。铂的熔点高于金和银,因而PtNPs表面的铂原子要比AuNPs表面的金原子和AgNPs表面的银原子更稳定^[32-33],这意味着Pt-S键的流动性比Au-S键和Ag-S键弱,因此PtNPs的表面构象工程比AuNPs及AgNPs的难度更大。在金、银、铂3种NPs中,AgNPs稳定性最差,虽然有利于多肽进行构象调控,但AgNPs在含Cl⁻等溶液环境中可以溶解,这就对银抗体的储存和使用环境提出了一定要求,而PtNPs因为更稳定,因而进行构象工程难度更大,但一旦在PtNPs构象工程成功,制备的铂抗体便具有极好的稳定性。除了这3种贵金属外,许多金属,包括非贵金属都可以制备成NPs。在没有进行共价修饰之前,这些NPs表面的金属原子处于高能态并都具有一定的流动性,因而都可能作为进行构象工程的“骨架”。但另一方面,部分金属NPs表面常常容易被氧化,表面被氧化后的金属

NPs可能失去了流动性,也就不再适合进行构象工程。

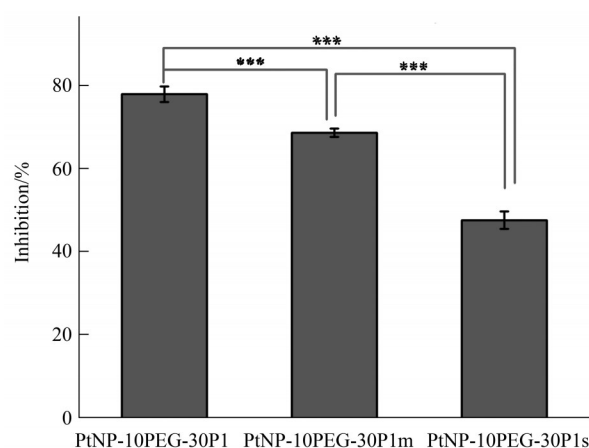


Fig. 9 Inhibition of lysozyme by the anti-lysozyme artificial antibody (Platinumbody, PtNP-10PEG-30P1) and the two controls that cannot restore the native conformation of the CDR fragment

*** $P < 0.005$.

3 结 论

本文通过分子构象工程技术,在PtNPs表面成功地实现了对柔性多肽构象的控制,制备出了一种全新的抗溶菌酶人工抗体——铂抗体。该铂抗体可以特异性结合溶菌酶并显著抑制其酶活。该工作拓

展了分子构象工程方法的适用范围,证明了分子构象工程方法的普适性,也为基于NPs的天然蛋白质模拟和具有靶向功能的药物载体的开发提供了一种全新思路。而蛋白质片段在NPs上的重新折叠,以及仅依靠NPs和一小段蛋白质片段就能重现天然蛋白质的功能,也为阐明蛋白质结构-功能机制带来新的启示。

参 考 文 献

- [1] Yang S T, Liu Y Y, Wang Y W, *et al.* Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions. *Small*, 2013, **9**: 1635-1653
- [2] Zhang N, Ma P, Xu S, *et al.* Research advances and applications of nucleic acid-modified techniques for biomedical nanomaterial. *J Alloys Compd*, 2018, **742**: 629-640
- [3] Chen W, Fang X, Li H, *et al.* DNA-mediated inhibition of peroxidase-like activities on platinum nanoparticles for simple and rapid colorimetric detection of nucleic acids. *Biosens Bioelectron*, 2017, **94**: 169-175
- [4] Colombo M, Fiandra L, Alessio G, *et al.* Tumour homing and therapeutic effect of colloidal nanoparticles depend on the number of attached antibodies. *Nat Commun*, 2016, **7**: 13818
- [5] Weissleder R, Kelly K, Sun E Y, *et al.* Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 1418-1423
- [6] Yan G H, Wang K, Shao Z, *et al.* Artificial antibody created by conformational reconstruction of the complementary-determining region on gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(1): E34-E43
- [7] Luo L, Liu Y Y, Gao T, *et al.* Characterization of the specific interactions between nanoparticles and proteins at residue-resolution by alanine scanning mutagenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**: 34514-34523
- [8] Liu R R, Song L, Meng Y, *et al.* Study on biocompatibility of AuNPs and theoretical design of a multi-CDR-functional nanobody. *J Phys Chem B*, 2019, **123**: 7570-7577
- [9] Zhao L, Wang S, Hu Q, *et al.* Conformation-reconstructed multivalent antibody mimic for amplified mitigation of human islet amyloid polypeptide amyloidogenesis. *Nanoscale*, 2022, **14**(7): 2802-2815
- [10] Liu Q, Sheng L, Liu Y Y, *et al.* A potential MDM2 inhibitor formed by restoring the native conformation of the p53 α -helical peptide on gold nanoparticles. *ChemMedChem*, 2022, **17**(5): e202100623
- [11] Wang Y, Wang X, Gao T, *et al.* Folding of flexible protein fragments and design of nanoparticle-based artificial antibody targeting lysozyme. *J Phys Chem B*, 2022, **126**(27): 5045-5054
- [12] 许艳娇, 李文浩, 高天歌, 等. 金抗体替代ELISA中的天然抗体用于溶菌酶检测. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(1): 242-249
- Xu Y J, Li W H, Gao T G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(1): 242-249
- [13] Wilson R. F1000Prime Recommendation of [Yan G. H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A* 2018, **115**, E34—E43]. London: Faculty Opinions, 2018. <https://dx.doi.org/10.3410/f.732327157.793541057>
- [14] Xu J, Gao T, Sheng L, *et al.* Conformationally engineering flexible peptides on silver nanoparticles. *iScience*, 2022, **25**(6): 104324
- [15] Zeng X, Sun J, Li S, *et al.* Blood-triggered generation of platinum nanoparticle functions as an anti-cancer agent. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 567
- [16] Zhou Z, Fan T, Yan Y, *et al.* One stone with two birds: phytic acid-capped platinum nanoparticles for targeted combination therapy of bone tumors. *Biomaterials*, 2019, **194**: 130-138
- [17] Huang X, Li Z, Yu Z, *et al.* Recent advances in the synthesis, properties, and biological applications of platinum nanoclusters. *J Nanomater*, 2019, **2019**: 6248725
- [18] Dasari R, Robinson D A, Stevenson K J. Ultrasensitive electroanalytical tool for detecting, sizing, and evaluating the catalytic activity of platinum nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(2): 570-573
- [19] Gao M, An P, Rao H, *et al.* Molecule-gated surface chemistry of Pt nanoparticles for constructing activity-controllable nanozymes and a three-in-one sensor. *Analyst*, 2020, **145**(4): 1279-1287
- [20] Wu G W, He S B, Peng H, *et al.* Citrate-capped platinum nanoparticle as a smart probe for ultrasensitive mercury sensing. *Anal Chem*, 2014, **86**(21): 10955-10960
- [21] Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta*, 1952, **8**: 302-309
- [22] Yang S T, Wang H, Guo L, *et al.* Interaction of fullerene with lysozyme investigated by experimental and computational approaches. *Nanotechnology*, 2008, **19**(39): 395101
- [23] Nicaise M, Valerio-Lepiniec M, Minard P, *et al.* Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. *Protein Sci*, 2004, **13**(7): 1882-1891
- [24] Bird R E, Hardman K D, Jacobson J W, *et al.* Single chain antigen binding proteins. *Science*, 1988, **241**(4877): 423-426
- [25] Gao T, Liu Y, Lou C, *et al.* PEGylation of Goldbody: PEG-aided conformational engineering of peptides on gold nanoparticles. *RCS Adv*, 2022, **12**: 26123-26133
- [26] Wu X, Yang S T, Wang H, *et al.* Influences of the size and hydroxyl number of fullerenes/fullerenols on their interactions with proteins. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, **10**: 6298-6304
- [27] Giosia D M, Zerbetto F, Calvaresi M. Incorporation of molecular nanoparticles inside proteins: the trojan horse approach in theranostics. *ACC Mater Res*, 2021, **2**(8): 594-605
- [28] Silvestri A, Silvio D D, Llarena I, *et al.* Influence of surface coating on the intracellular behaviour of gold nanoparticles: a fluorescence correlation spectroscopy study. *Nanoscale*, 2017, **9**(38): 14730-14739

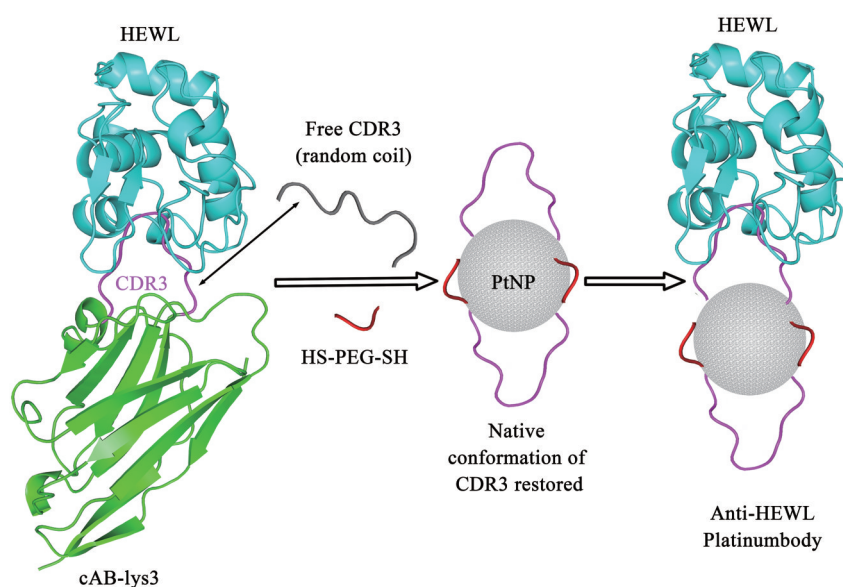
- [29] Gref R, Lück M, Quellec P, *et al.* ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B*, 2000, **18**: 301-313
- [30] Cao A. The last secret of protein folding: the real relationship between long-range interactions and local structures. *Protein J*, 2020, **39**(5): 422-443
- [31] 曹傲能. 蛋白质结构的“限域下最低能量结构片段”假说与蛋白质进化的“石器时代”. *物理化学学报*, 2020, **36**(1): 1907002
Cao A N. *Acta Phys Chim Sin*, 2020, **36**(1): 1907002
- [32] Morrow B H, Striolo A. Platinum nanoparticles on carbonaceous materials: the effect of support geometry on nanoparticle mobility, morphology, and melting. *Nanotechnology*, 2008, **19**(19): 195711
- [33] Chen J, Chan K Y. Size-dependent mobility of platinum cluster on a graphite surface. *Mol Simul*, 2005, **31**: 527-533

Conformational Engineering of Antibody Fragments on The Surface of Platinum Nanoparticles*

SHENG Ling-Jie, XU Jia, DAI Jing-Jing, WANG Hai-Fang, CAO Ao-Neng**

(Institute of Nanochemistry and Nanobiology, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Recent successful restoration of the native conformation and function of the complementary-determining regions (CDRs) of antibodies on gold nanoparticles (AuNPs) demonstrates that the era of molecular conformational engineering is dawning. Basically, molecular conformational engineering aims to precisely tune flexible non-functional molecules into special conformations to carry out novel functions, in the same way as protein folding. In order to explore the general applicability of molecular conformational engineering, as well as to reveal the mechanism of protein structure-function relationship, the objective of this work is to restore the native conformation and function of the CDRs of an antibody on platinum nanoparticles (PtNPs). **Methods** The CDR fragment of the anti-lysozyme antibody cAB-lys3, which has no stable conformation or function in free state, was conjugated onto the surface of PtNPs through two Pt-S bonds. The original antigen-recognizing function of the CDR restored on PtNPs was assessed by the specific inhibition of the

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22071145, 32371318) and the National Key Research and Development Plan of China (2016YFA0201602).

** Corresponding author.

Tel: 86-21-66135277-102, E-mail: ancao@shu.edu.cn

Received: April 11, 2023 Accepted: May 29, 2023

enzymatic activity of lysozyme by the PtNP-CDR conjugates. **Results** After optimization of the peptide density on the surface of PtNPs and modification of PtNPs with polyethylene glycol (PEG), the resulted PtNP-based hybrid artificial antibody (PtNP-10PEG-30P1), dubbed Platinumbody, could bind specifically to lysozyme and significantly inhibit the activity of lysozyme. **Conclusion** This is the first time that the fragment of a protein could refold on PtNPs. Together with the previous Goldbody and Silverbody, current work demonstrates that artificial proteins could be generally created by restoration of the native conformation of natural proteins fragments on NPs.

Key words antibody, lysozyme, conformational engineering, platinum nanoparticles, peptide

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0139