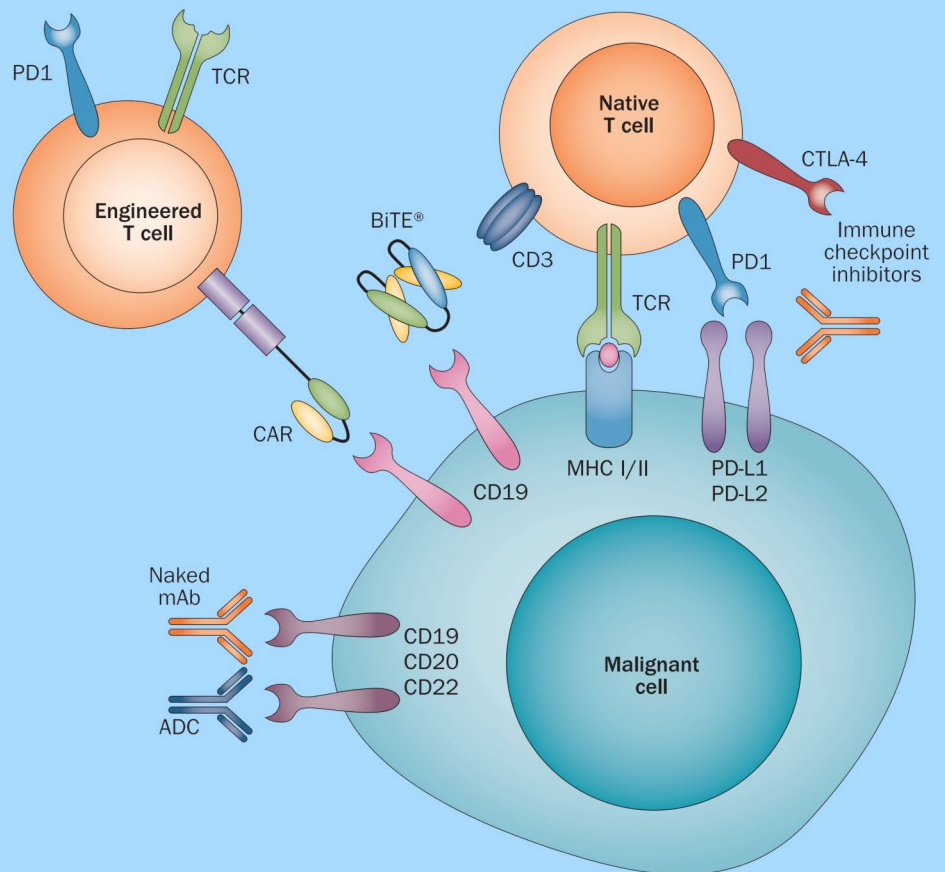


# 抗体药发现服务手册

From Gene to Antibody





# 目录

- 002 ○ 哺乳表达系统：高活性靶点蛋白表达
- 004 ○ 噬菌体展示抗体发现技术平台
- 010 ○ 杂交瘤抗体发现及抗体测序
- 015 ○ Xten™ Mab Single B 兔单克隆抗体开发
- 017 ○ 抗体人源化
- 019 ○ 双特异性抗体
- 021 ○ 抗独特型抗体制备
- 028 ○ 重组抗体生产及亲和力检测
- 030 ○ 抗体药物研发 POC 验证工具

## 哺乳表达系统：高活性靶点蛋白表达

### >>> 服务简介

哺乳动物细胞表达系统具有蛋白折叠和翻译后修饰功能，其表达的蛋白在空间结构、蛋白翻译后修饰以及生物学活性上更接近天然蛋白，因此被广泛地应用于活性蛋白和治疗性抗体药物的表达、生产。

#### 1. 载体构建

- (1) 载体来源：普健提供改造后的载体或客户指定商业化载体
- (2) 方案设计：普健推荐信号肽的选择、标签的选择、表达区段的选择。

#### 2. 瞬时表达 (TGE)

- (1) 与稳定基因表达相比，TGE 主要适用于短期内制备重组蛋白，一般在 10 天内即可获得蛋白
- (2) 普健生物的瞬时表达使用悬浮细胞，能够完成毫升到 100L 的体积的蛋白表达

#### 3. 稳定基因表达

符合长期生产需求，整个实验操作流程提供长期稳定及规模可调的蛋白生产

#### 4. 工艺过程开发及大规模生产。

- (1) 普健生物可优化流加补料流程，提高目的蛋白的表达量，实现大规模生产
- (2) 普健生物可进行不同培养基的筛选，为后期工业化生产降低成本
- (3) 普健生物可进行纯化工艺开发，如亲和纯化、凝胶过滤、离子交换及疏水层析等纯化方法

表达方式	细胞
瞬时表达	HEK293, HEK293 细胞来源于 293 细胞系，采用无血清悬浮培养 CHO-S, CHO-S 细胞是来自中国仓鼠卵巢细胞的克隆分离株，被驯化为无血清悬浮培养
稳定表达	CHO-K1, CHO-K1 由 CHO 衍生而来，该细胞株培养条件简单、贴壁强度适中，比较容易转染
稳定细胞株构建	DG44, DG44 细胞 (二氢叶酸还原酶缺陷型, DHFR-) 由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞衍生而来，常用于构建适合重组蛋白生产的细胞系。DG44 细胞筛选和共扩增标记是 DHFR 基因 (dhfr)

表达载体：pcDNA3.1, pIRES, pTT3, pCEP4, pATX1 等

### >>> 服务优势

1. 经验丰富：团队具有十多年丰富的蛋白表达经验，累计完成 5000+ 哺乳表达项目，500+ 稳转细胞株构建项目
2. 瞬时转染表达：可无血清悬浮培养多种哺乳细胞，自主研发高产表达体系，大幅度提高表达量 (3-6 倍)
3. 重组抗体表达：拥有一套经过反复验证的载体 - 细胞 - 转染高效表达体系，可短期、大规模的生产 g 级以上的重组抗体
4. 稳定细胞株构建：拥有自主知识产权的 CHO-K1 改造细胞系，可构建蛋白及抗体药物大量生产的稳定细胞系，实现工业级原料生产
5. 十万级洁净细胞房：所得产品可实现内毒素 <0.1EU/ml
6. 大规模生产：无血清悬浮细胞培养每批次 200L+ 生产
7. 一站式服务：基因优化、蛋白结构分析与表达方案设计、瞬时转染、稳定细胞株构建、重组抗体生产、数据分析

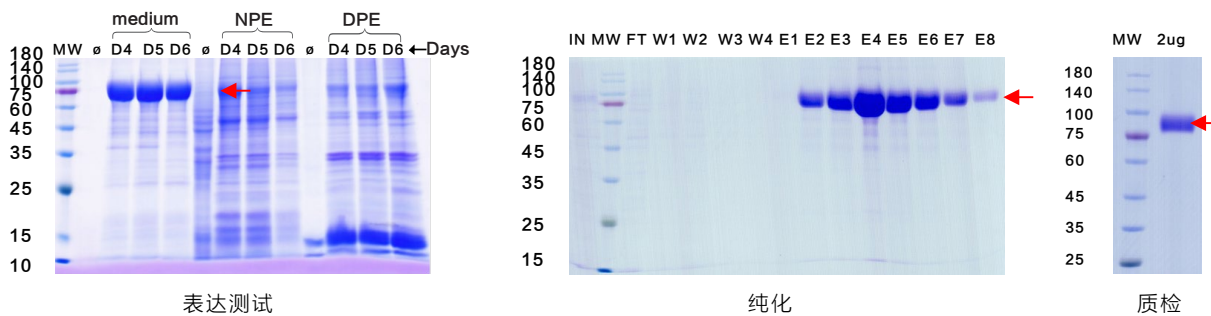
## >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
哺乳动物细胞表达系统	基因序列 载体	基因合成	2-4 周	
		表达及纯化测试	2 周	提供表达及纯化测试报告 决定是否进行下一步放大
		1L 表达及纯化	2 周	提供蛋白样品及报告
		摇瓶或发酵罐放大	2-4 周	提供蛋白样品及报告

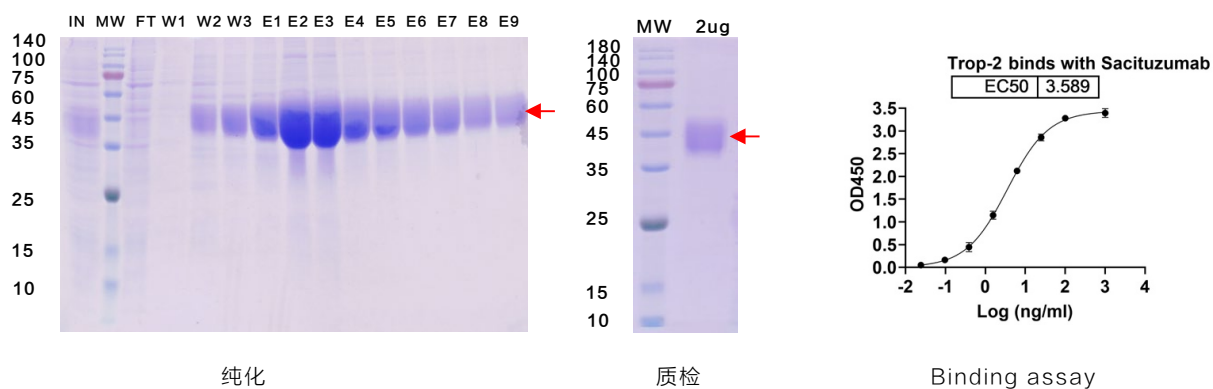
## >>> 案例展示

### 瞬转案例

#### 1. 293 细胞瞬转表达某病毒血凝素 (HA) 三聚体



#### 2. CHO 瞬转表达靶点蛋白 Trop2



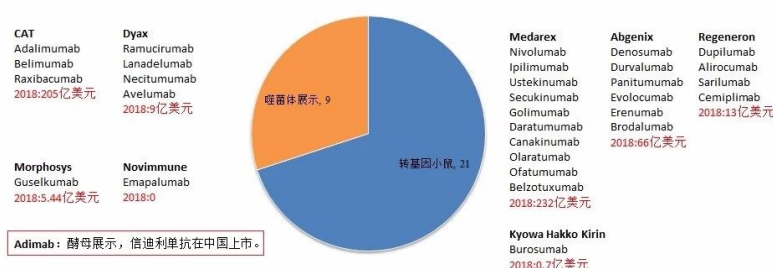
## 噬菌体展示抗体发现技术平台

### >>> 全人源抗体筛选平台

1986年首个鼠单克隆抗体莫罗单抗-CD3 (muromonab-CD3, OKT3) 被美国FDA批准用于器官移植后的免疫抑制治疗, 2002年首个全人源化单克隆抗体阿达木单抗 (Adalimumab, Humira) 批准上市, 人源化抗体和全人源化抗体已经成为抗体药物发展的主流技术。噬菌体展示抗体技术将基因型和表型统一于一体, 将选择能力与扩增能力结合起来, 具有强大的筛选能力, 是全人源化抗体研发的重要技术手段。

目前世界上有很多的全人源抗体库, 可以分为天然抗体库, 半合成抗体库和合成抗体库, 不过大部分抗体文库都存在着供体少、库容低、多样性差、亲和力弱、错配率高等问题, 普健生物构建了千亿级别、高亲和力全人源重组天然抗体文库, 经过验证, 任意靶点从文库中直接筛选, 一般可以获得十几个到上百个高亲和力的克隆, 其亲和力、特异性都达到行业领先水平。

FDA 批准的全人源抗体



已上市全人重组抗体药物 (噬菌体展示 9 个, 转基因小鼠 21 个)

### >>> 千亿级全人重组抗体库

优势:

1. 序列正确性高, 现阶段库容已达近千亿级别 ( $10^{11}$  pfu)。
2. 两步法建库, 先连入轻链再连入重链, 将来自全世界不同地区人种来源的轻链和重链随机组合, 保证了库的高质量和多样性。
3. 分为  $\kappa$  和  $\lambda$  两种轻链亚型的单链抗体库, 与大多数商业化混合库不同, 即可用于筛选  $\kappa$  型抗体, 也可用于筛选  $\lambda$  型的高亲和力抗体。
4. 带有 His 标签, 可直接用 phagemid 表达抗体, His 标签纯化。

QC 检测:

1. 总插入率及正确率

片段插入率 100%, 抗体序列正确率 >90%。

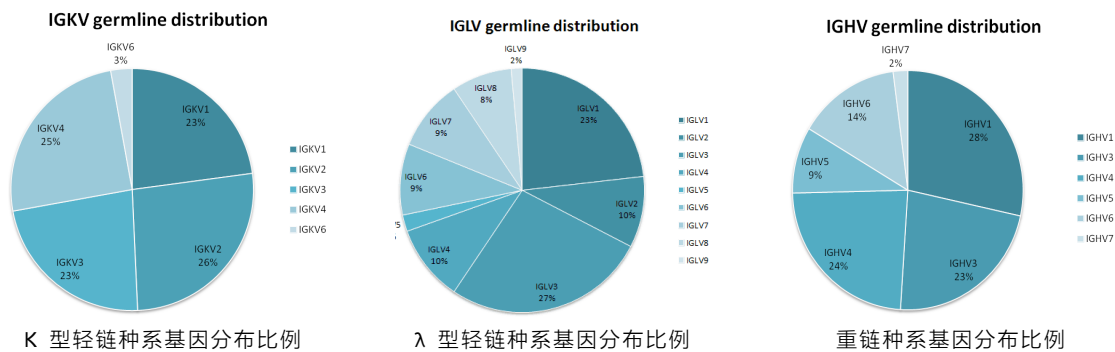
2. 抗体序列多样性分析

种系基因 (Germline) 分析: 种系基因主要指单倍体生殖细胞和干细胞中所含有, 未发生重排的全部基因。抗体库一般只分析抗体序列里面 V 基因的种系分布。

互补决定区 (CDR) 分析: 抗体分子可分为恒定区和可变区两部分。在可变区内有一小部分氨基酸残基变化特别强烈, 这个区域称高变区 (HVR)。在 L 链、H 链的 V 区中有三个高变区, 该部位因在空间结构上可与抗原决定簇形成精密的互补, 又称互补性决定区。

#### 2.1 种系基因分布特性

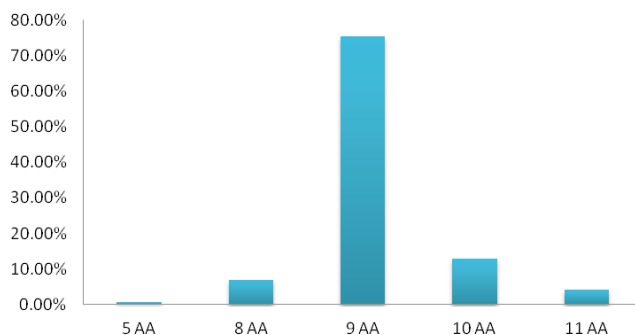
普健全人重组抗体库分为  $\kappa$  和  $\lambda$  两种轻链亚型, 分析两种亚型轻链种系基因分布比例, 及重链种系基因分布比例, 表明普健全人重组抗体库种系基因覆盖较全, 分布特性符合抗体药物种系基因分布规律。



## 2.2 CDR3 长度分布分析

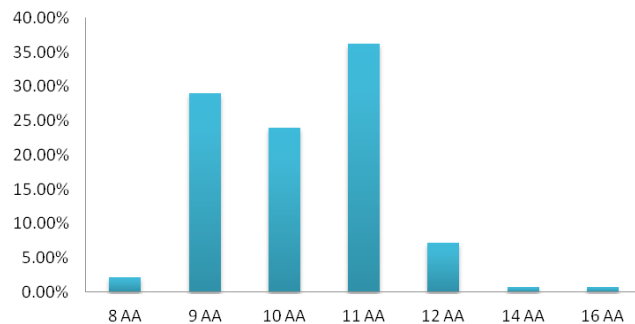
通过对 K 和 λ 两种亚型库的克隆各随机挑选 500 个克隆进行测序分析，无重复序列。其 CDR3 长度分布符合正态分布，与全人重组抗体药物 CDR3 长度分布规律相符合。

Length of VK-CDR3



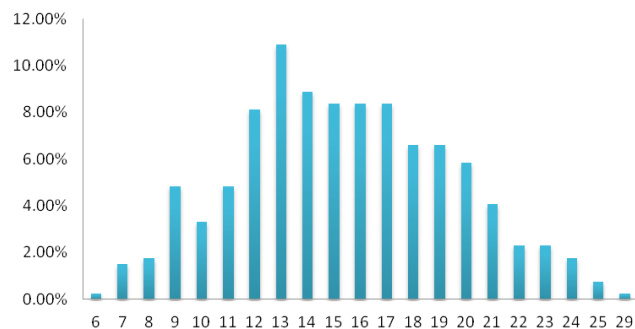
K 型轻链抗体 CDR3 长度分布比例

Length of VL-CDR3



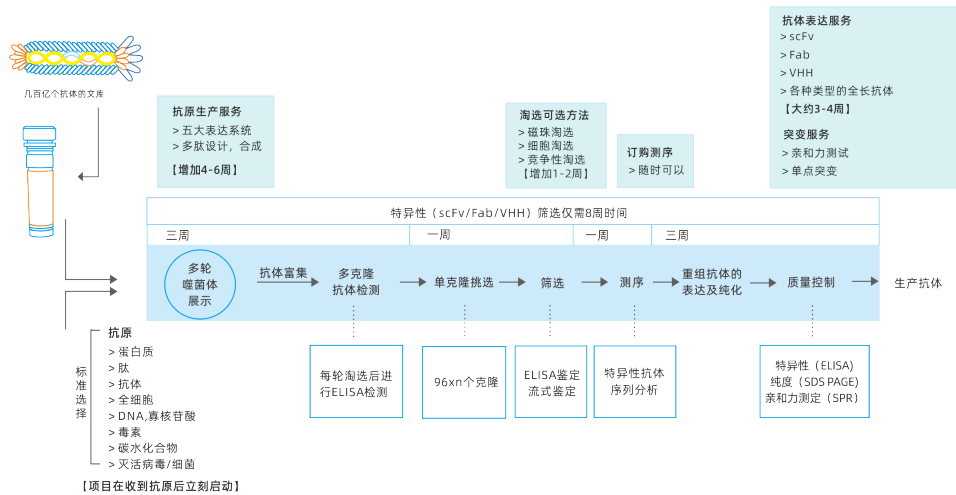
λ 型轻链 CDR3 长度分布比例

Length of VH-CDR3



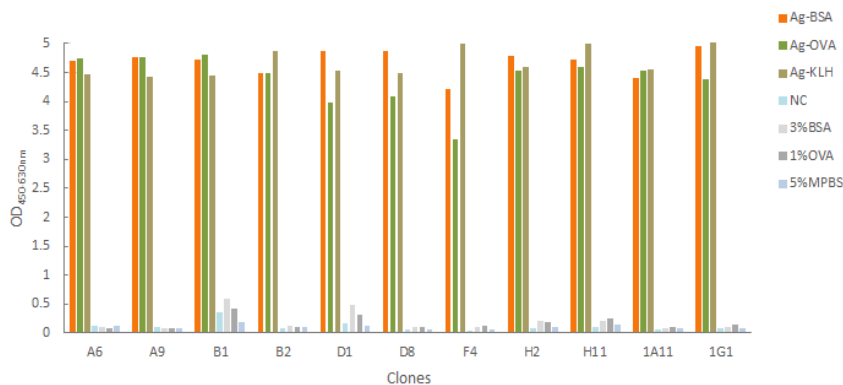
重链 CDR3 长度分布比例

## >>> 服务流程



## >>> 项目实例

Phage ELISA of 11 clones



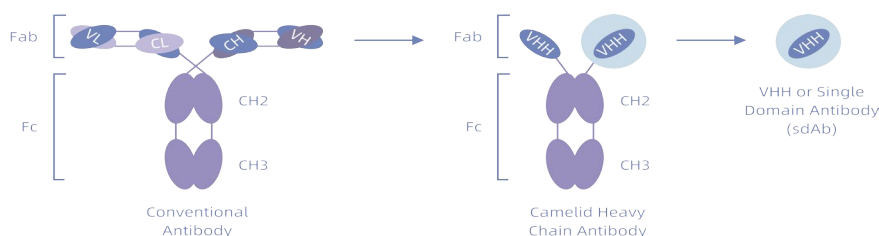
普健生物全人重组噬菌体文库筛选结果

## >>> 纳米抗体发现

近年来, 单域抗体 (SdAb) 的关注度非常高, 单域抗体为驼类和软骨鱼类中天然存在的仅由两条重链组成的特殊抗体, 只包含一个重链可变区 (VHH, Variable Domain of Heavy Chain Antibody) 和两个常规的CH2与CH3区。单域抗体通过重链上的一个可变区 (VHH) 结合抗原, 该可变区可以单独稳定地在体外存在, 被称为驼类单域抗体 (SdAb) 或者纳米抗体 (nanobody)。纳米抗体晶体宽为 2.5nm, 长 4nm, 分子量仅为传统完整抗体的 1/10 (约 15kD) 但依然具有完整的抗原识别能力, 得益于纳米抗体微小的结构、完整的抗原识别能力以及噬菌体筛选技术, 纳米抗体表现出高亲和力、高特异性、强穿透性和易于改造和表达等特点, 并且由于可以获得抗体完整序列, 可以通过体外重组表达进行稳定生产, 有效避免传统抗体的批次间差异问题。

### 纳米抗体特点

1. 有更长的 CDR3 区 (纳米抗体 CDR3 通常由 16~24 个氨基酸组成, 传统单抗 CDR3 仅有 7~12 个氨基酸), 与抗原特异性结合能力更强
2. 结构简单, 易于基因工程改造
3. 制备简单, 易于工业化放大生产
4. 易于人源化



单域抗体结构示意图

普健生物具有近千亿级别的天然纳米抗体库，可提供天然纳米抗体快速筛选服务，最快在 2-3 周内完成针对各类靶蛋白的特异性纳米抗体快速筛选，亲和力达到  $10^{-9}$ M 级别。

## >>> 千亿级别纳米抗体文库优势

1. 样本丰富：源自百余只不同种类的驼类样本 -- 羊驼（Alpaca）、骆驼（Camel）、美洲驼（Llama），提供更高的抗体多样性。
2. 库容量大：总库容近  $10^{11}$ cfu，即将优化到超千亿级别。
3. 超高品质：插入正确率 100%，序列正确率 97%，随机选取 200 个克隆测序，均无重复序列。

普健生物可以提供特定靶点的免疫建库、淘选定制服务；包括抗原制备、羊驼免疫、采血、效价检测、纳米抗体文库构建以及淘选，纳米抗体表达、检测等，目前已经成功交付几十个纳米抗体定制服务项目。

## >>> 案例展示

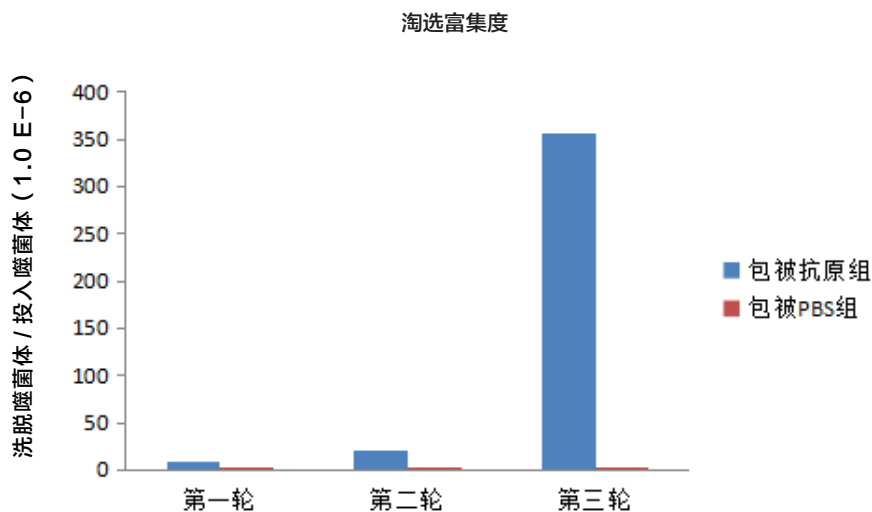
1. 靶点 B 免疫羊驼，进行四轮免疫后采血提取 PBMC，经 RNA 提取，反转录获得 cDNA 后扩增获取 VHH 可变区片段；

2. 免疫羊驼纳米抗体库的构建

将获得的 VHH 可变区片段连入噬菌体展示载体，电转宿主菌，最终获得库容为  $8.76 \times 10^9$  纳米抗体库，插入正确率为 100%

3. 免疫羊驼纳米抗体库的淘选及筛选

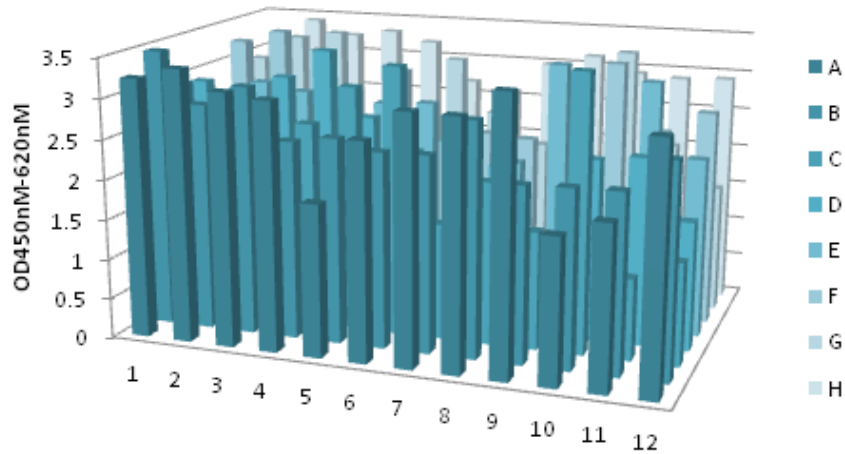
利用构建的免疫羊驼纳米抗体库，针对靶点 B 蛋白，完成三轮淘选，其淘选富集度如下





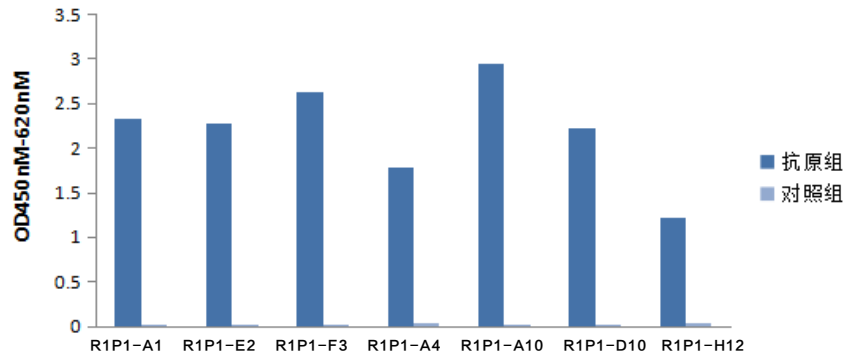
筛选 96 个克隆，其中阳性克隆共 94 个，阳性率为 97.9%。

洗脱噬菌体单克隆筛选（抗原组 - 背景组）



排除重复序列，最终获得了 7 条不同的抗体序列。将这些抗体序列表达成可溶性的 VHH 抗体蛋白，进行再次验证，结果如下：

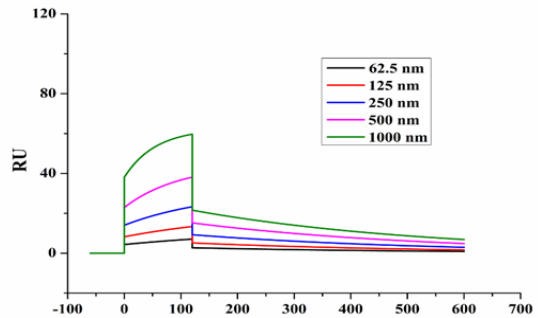
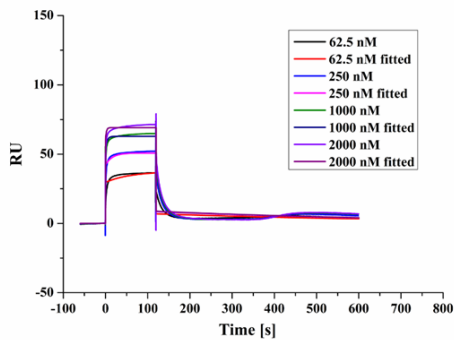
抗体蛋白验证



随机挑选两条抗体蛋白进行亲和力测定，结果如下：

R1P1-A10: KD:  $6.49E-09M$

R1P1-H12: KD:  $1.52E-07M$



## >>> 狗、猫等小物种噬菌体抗体筛选服务平台

随着社会的发展，宠物在人类生活中扮演着越来越重要的角色，宠物疾病治疗市场也受到了广泛关注，2022年1月13日，美国食品和药品监督管理局（FDA）批准了首个缓解猫关节炎疼痛抗体药物：Solensia（frunevetmab 注射液）。这是一个猫源的 NGF（神经生长因子，nerve growth factor）单抗，可以改善猫的活动能力。普健生物与科研机构合作联合欧美制药企业，通过噬菌体展示平台开发了一些针对宠物疾病治疗的单克隆抗体药物，并且构建狗、猫的噬菌体展示抗体文库。

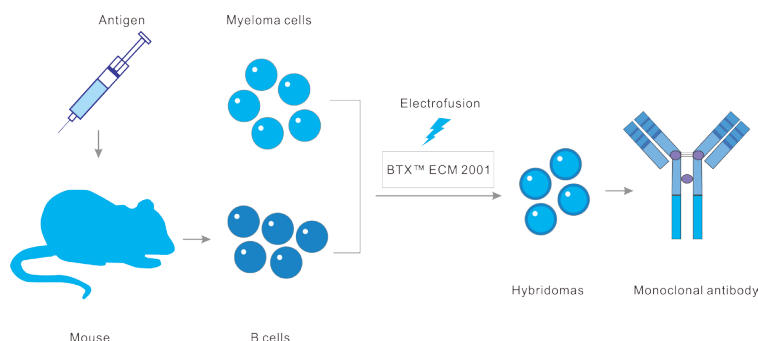
Library	Display Technology	Library Format	Species	Library Size	Insert Rate	Accuracy
CT-ScFv	Phage Display	scFv	Cat	$2.19 \times 10^9$	99%	>95%
DN-ScFv	Phage Display	scFv	Dog	$3.98 \times 10^9$	100%	>95%

## 杂交瘤抗体发现及抗体测序

### >>> 服务简介

杂交瘤技术产生于 1975 年，是整个生命科学发展史上的一个重要里程碑；为此获得了 1984 年的诺贝尔生理和医学奖。鼠单克隆抗体具有特异性强，亲和力高，传代相对稳定，可以大规模生产等优势，在基础研究、体外诊断、靶向药物治疗等方面都有着广泛地应用。

普健生物提供优质的杂交瘤细胞开发服务，提供多种抗原免疫方式，经融合、筛选、检测，定株，亚型鉴定，测序，抗体生产等一系列相关技术服务。



### >>> 服务优势

- 1. 多种抗原可选：**蛋白（五大表达系统）、多肽、小分子、DNA
- 2. 一站式服务：**提供从基因序列到杂交瘤细胞开发及鉴定的整体解决方案
- 3. 成功率高：**单抗项目 2000+，成功率高达 95.4%
- 4. 个性化定制：**提供 WB/IHC/IF/FC 等应用级别抗体开发服务
- 5. 完善的抗体质量评价体系：**WB/IHC/IF/FC 等多种检测方式
- 6. 专业技术团队：**法国首席科学家带队，十余年抗体研发经验
- 7. 下游对接服务：**杂交瘤细胞测序，抗体人源化，重组抗体表达，化学发光应用抗体对筛选及大规模抗体生产等服务

### >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
抗原制备（抗原表达与纯化） 动物免疫（抗原免疫） 杂交瘤细胞株构建（融合细胞，选择培养） 筛选 抗体生产及鉴定（Protein A/G 纯化，SDS-PAGE 及 UV 分析，ELISA 检测）	抗原	抗原制备 小鼠免疫 融合 筛选单克隆细胞株 大规模抗体的制备	4-6 个月	纯化单抗（量可定制） 杂交瘤细胞株（数量可定制） 抗原小样 技术服务报告

## >>> 案例展示

### IL6 诊断抗原开发及抗体对的开发

IL6 是机体内复杂细胞因子网络中的关键成员，具有多种生物学活性，在免疫应答、造血系统及炎症反应中均起重要作用，现应用于多种临床研究，还可作为多种疾病的早期诊断标志物。

普健生物 IL6 抗原——采用哺乳表达系统表达，活性高、稳定性好

(1) 普健生物 IL6 抗原活性研究：

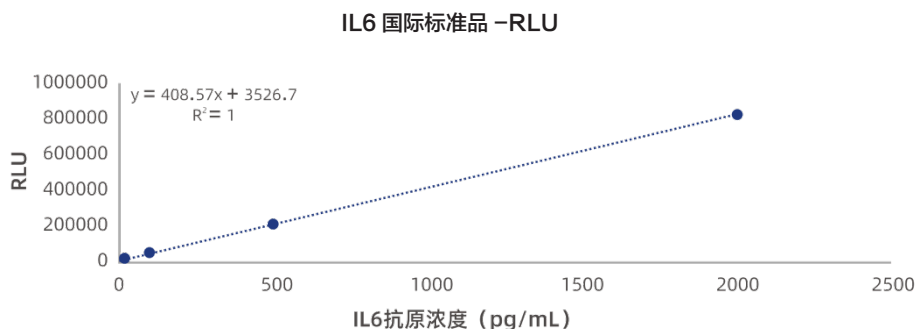
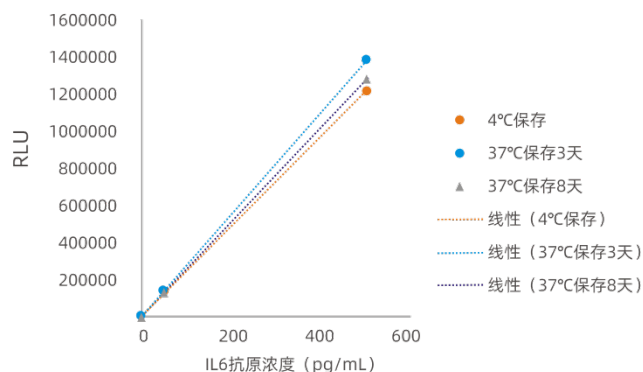


表 1. IL6 普健抗原与 IL6 国际标准品对比

IL6 普健抗原 (pg/ml)	RLU 均值	换算浓度 (pg/ml) (对应 IL6 国际标准品浓度)	比值	比值均值
5	15603	29.56	5.91	6.06
50	130250	310.16	6.20	

普健 IL6 抗原活性较高，1pg/ml IL6 抗原与 6pg/ml 国际标准品反应性相当。(IL6 国际标准品：NIBSC 1st IL6 89/548)

(2) 普健生物 IL6 抗原稳定性研究：



IL6 普健抗原在 37°C 保存 3 天/8 天和 4°C 保存 -RLU 对比

普健生物 IL6 抗原稳定性良好，在 37°C 保存 3 天和 37°C 保存 8 天与 4°C 长期保存的 RLU 值无显著差异，仍保留较高活性。

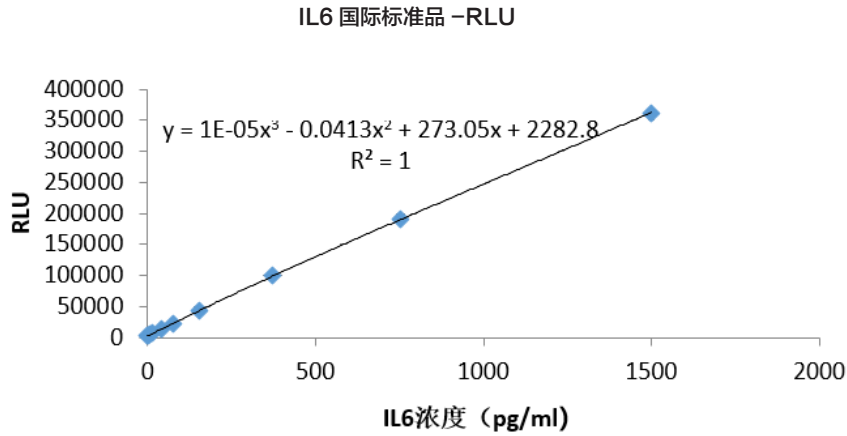
免疫抗原制备：普健哺乳系统蛋白表达

筛选抗原：NIBSC 的 WHO 国际标准品（IL-6, human rDNA derived, NIBSC code89/548）

单抗制备：采用小鼠杂交瘤单抗技术共计筛选得到 44 株 IL6 阳性细胞株，通过标记 biotin 和 Acridinium Ester

通过化学发光平台筛选，共计 1892 种配对组合。

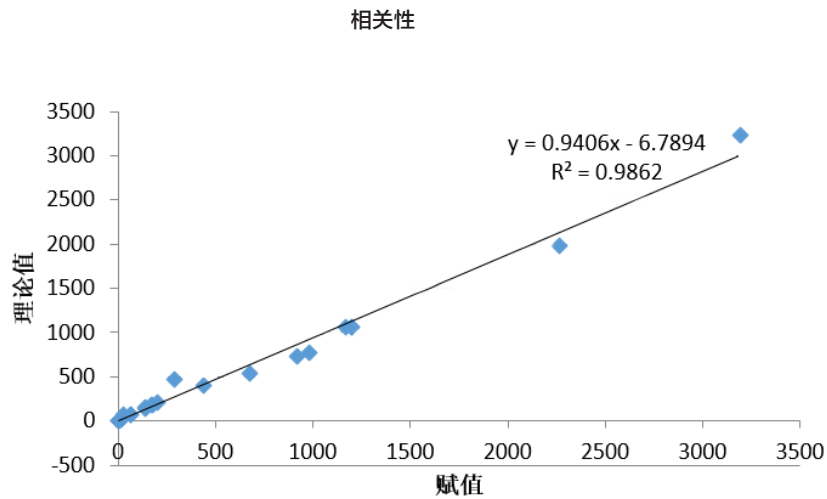
绘制的 IL6 国际标准品 -RLU 标准曲线：



在化学发光平台通过使用罗氏测值样本进行筛选，最终得到 1 对抗体能良好识别血清样本和国际标准品，灵敏度 1pg/ml,  $R^2=1$ 。

平行比较：

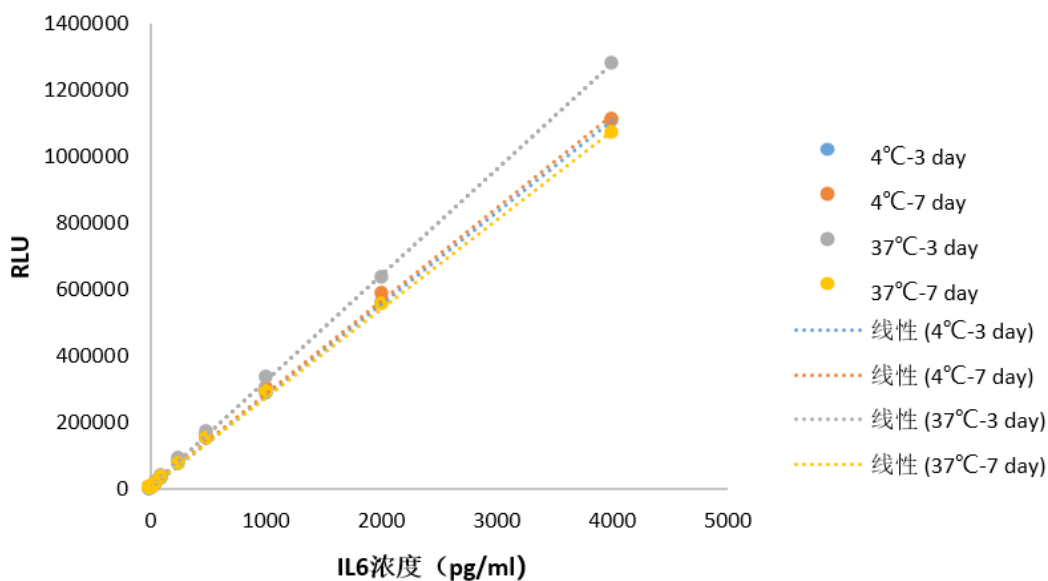
收集 Roche 平台测试的样本使用普健的系统进行赋值，平行比较测值，相关性  $R^2=0.9862$ 。



稳定性试验:

IL6 普健抗体 (pg/ml)	4°C -3 day-RLU	4°C -7 day-RLU	37°C -3 day-RLU	37°C -7 day-RLU
0	1886	3162	2790	2972
1	2022	3341	3172	3504
2.5	2586	3948	3775	3985
5	3442	4924	4815	4932
10	5110	6539	6483	6569
25	9541	11216	11938	11049
50	17791	19547	20801	18950
100	32047	36028	37825	33702
250	76150	83036	90499	78330
500	150229	157355	171096	149662
1000	289376	305072	336157	291227
2000	560092	587798	636806	553922
4000	1106263	1112355	1280067	1070342

工作液分别放置于 4°C 和 37°C 3 天和 7 天之后，上机测试，结果显示，普健 IL6 抗体稳定性良好。

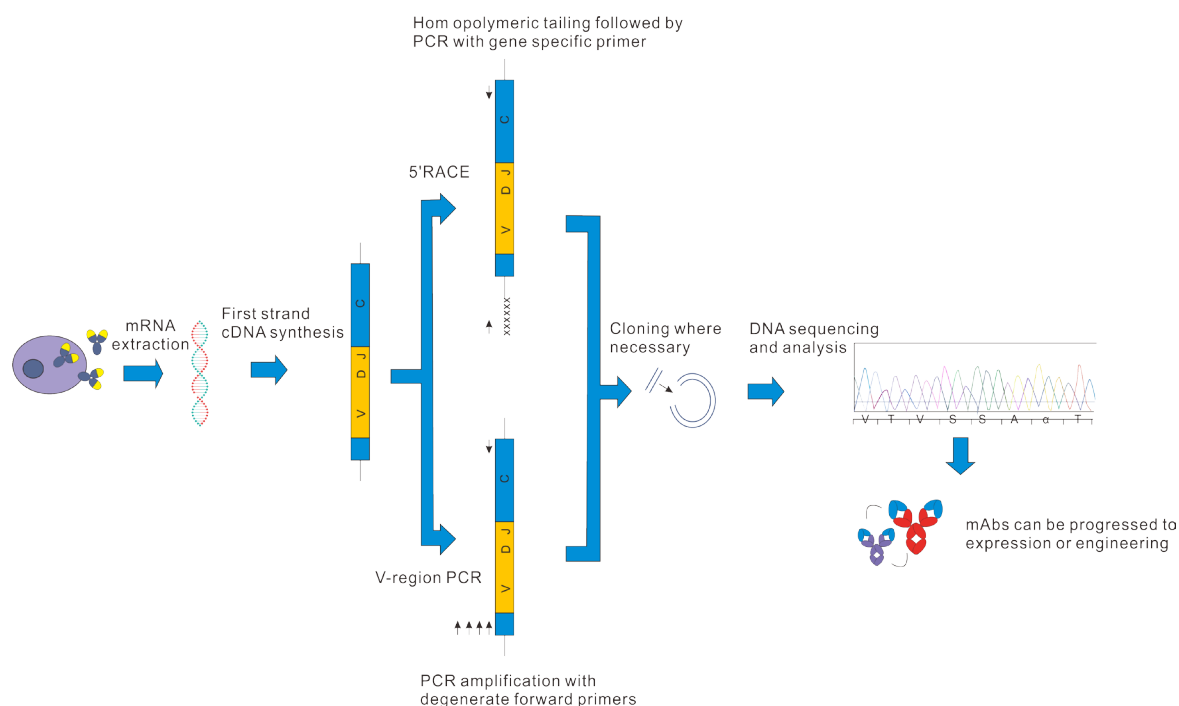


普健 IL6 抗体在 37°C 保存 3 天 / 7 天和 4°C 保存 3 天 / 7 天 -RLU 对比

## >>> 杂交瘤抗体测序

通过 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合制备的杂交瘤单克隆抗体，虽然技术成熟，应用广泛，但由于杂交瘤细胞保存条件要求高（需要长期在液氮中冻存）且在传代过程中会存在不稳定因素，从而影响后续抗体生产。通过对杂交瘤细胞进行测序获得抗体基因序列，不但可以实现永久保存，也是进行抗体工程及抗体人源化研究和重要基因专利申请保护的前提，同时抗体重组表达的生产方式还能避免内源性生物污染。

普健生物可提供从杂交瘤测序到重组抗体表达的整体解决方案：测序准确度高，周期快至 2 周；自有第三代 pATX3.0 系列哺乳表达平台可使重组抗体瞬转产量高达 200-500mg/L，为工程抗体表达纯化提供更高效的服务。



## >>> 服务优势

1. 接受培养好的细胞 / 冻存细胞
2. 周期短：快至 2 周
3. 提供可变区 / 全长测序
4. 完善的实验报告（CDR 分析）

## >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
抗体可变区 / 全长测序	1x10 <sup>6</sup> 个杂交瘤细胞 单克隆抗体所属亚型	RNA 提取 mRNA 反转录 cDNA PCR 扩增抗体重链及轻链基因 重链及轻链基因克隆测序 生物信息学分析测序结果确定功能抗体基因及抗体 CDR 区 抗体测序结果报告	2-3 周	测序报告 序列原始数据 重链 / 轻链分析 含有抗体片段的质粒

## Xten™ Mab Single B 兔单克隆抗体开发

### >>> 服务简介

兔单抗与传统的杂交瘤鼠单抗相比具有更好的抗原识别功能。由于兔骨髓瘤细胞株受专利保护，无法利用杂交瘤技术开发兔单抗，普健生物建立了噬菌体展示抗体文库技术平台以及新型的 Xten™ Mab Single B 兔单克隆抗体开发技术平台。

单个 B 细胞抗体制备技术是近年来新发展的一类快速制备单克隆抗体的技术，是根据每一个 B 细胞只含有一个功能性重链可变区 DNA 序列和一个轻链可变区 DNA 序列，以及每一个 B 细胞只产生一种特异性抗体的特性，从免疫动物脾组织或外周血中分离抗原特异性 B 细胞，通过单细胞 PCR 技术从分泌抗体的单个 B 细胞中扩增 IgG 重链和轻链可变区基因，然后在哺乳动物细胞内表达并获得具有生物活性的单克隆抗体。

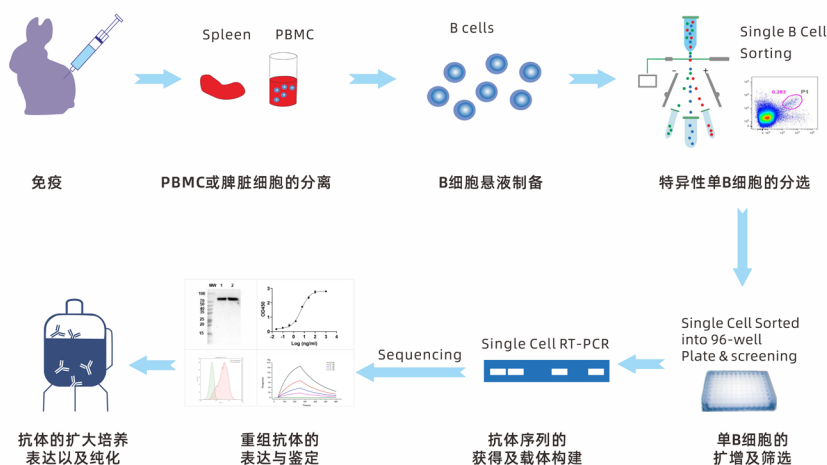


Fig 1. Xten™ Mab 兔单克隆抗体开发流程

### >>> 服务优势

- 1. 高特异性:** 与小鼠和其他啮齿动物相比，兔免疫系统更优秀，产生的抗体特异性更强，亲和力更高
- 2. 高稳定性:** 与常规小鼠生产的单克隆抗体相比，兔 IgG 结构稳定性高
- 3. 高亲和力:** 兔的 B 细胞成熟过程产生的亲和力是啮齿动物的 10-100 倍
- 4. 高多样性:** 兔拥有丰富的 B 细胞反应库，其产生的抗体在表位变异、突变、构象变化等方面优势显著，且多样性高

### >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务内容	服务周期	交付内容
Xten™ Mab 兔单克隆抗体开发	抗原序列	抗原制备 动物免疫 脾细胞分离及阳性 B 细胞筛选 阳性克隆抗体可变区扩增及测序分析 重组抗体表达及纯化	20-24 周	100 μg/ 株单抗 pUC 质粒 3 株最优的抗体序列 技术服务报告



## >>> 案例展示

利用 B 细胞分选富集策略，在流式分选设备的支持下，有效富集抗原特异性 B 细胞，提高 B 细胞体外培养的成活率，保留 B 细胞的多样性，可开发出不同应用需求的抗体。

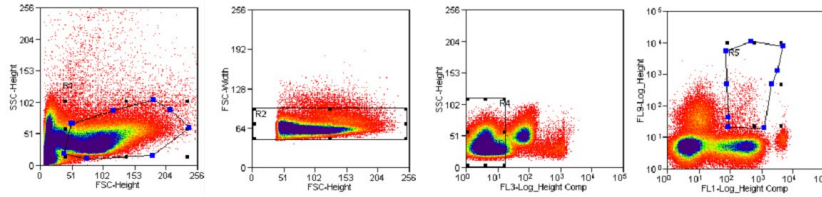


Fig 2. Xten™ Mab 兔单克隆抗体开发之 B 细胞筛选

使用普健生物 XtenCHOTM 高密度瞬转表达系统，体外重组表达部分阳性抗体，纯化后进行功能验证。

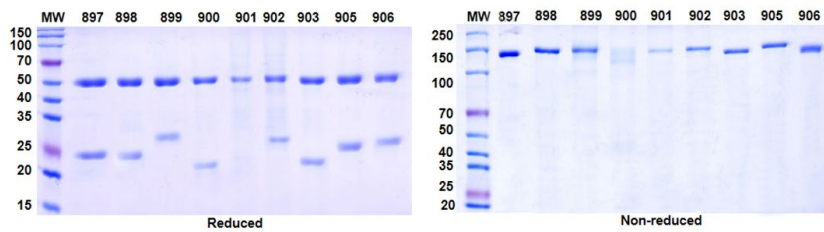


Fig 3. Xten™ Mab 兔单克隆抗体开发之重组抗体表达

	A	B	C	D
EC50(ng/ml)	6.897	145	15.48	23.43

重组表达纯化后的抗体可进行 ELISA、WB、流式等功能性分析。

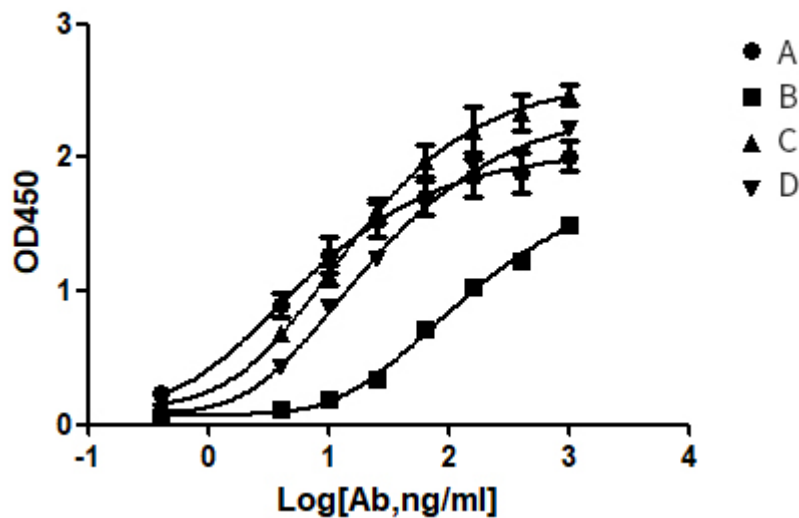
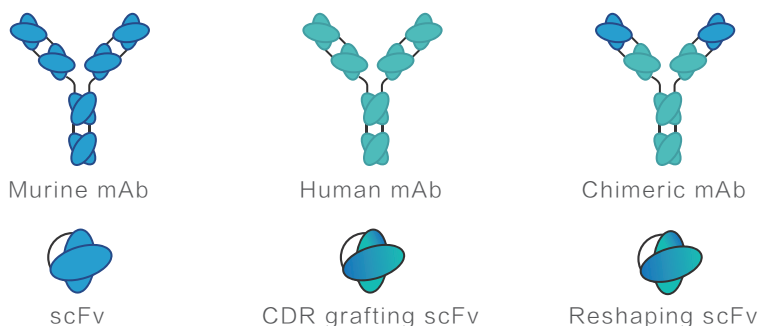


Fig 4. Xten™ Mab 兔单克隆抗体开发之重组抗体 ELISA 检测结果

## 抗体人源化

### >>> 服务简介

抗体人源化是指通过 DNA 重组技术和蛋白质工程技术,将鼠源单克隆抗体的大部分氨基酸人源化,以降低其异源性,保留亲本鼠单克隆抗体的亲和力和特异性,这种通过重组基因所表达的抗体既有鼠源成分,又有人源成分,所以称为人源化抗体。



#### 一、人源化抗体主要包括以下几类

##### 1. 嵌合抗体

利用 DNA 重组技术,将异源抗体的轻、重链可变区基因插入含有人抗体恒定区的表达载体中,转染哺乳动物细胞表达出嵌合抗体

##### 2. 改型抗体

改型抗体也称 CDR 植入抗体 (CDR grafting antibody),抗体可变区的 CDR 是抗体识别和结合抗原的区域,直接决定抗体的特异性。将鼠源单抗的 CDR 移植至人源抗体可变区,替代人源抗体 CDR,使人源抗体获得鼠源单抗的抗原结合特异性,同时减少其异源性

##### 3. 全人源化抗体

全人源化抗体是指将人类抗体基因通过转基因或转染色体技术,将人类编码抗体的基因全部转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中,使动物表达人类抗体,达到抗体全人源化的目的

#### 二、抗体人源化的优点

1. 降低了机体的免疫排斥反应
2. 更有效地募集效应因子或者效应细胞
3. 体内的半衰期时间长,改善了抗体药物动力学

#### 三、抗体人源化的基本原则

1. 保持或者提高抗体的亲和力和特异性
2. 降低或者基本消除抗体的免疫原性,降低免疫排斥反应

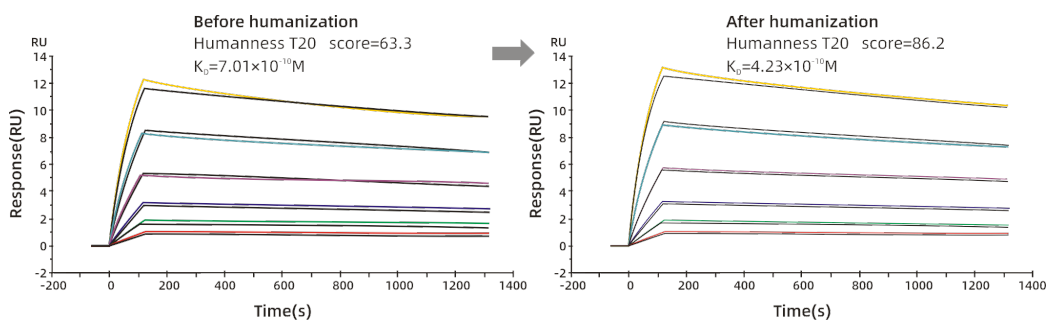
### >>> 服务优势

1. 普健生物拥有经验丰富的抗体人源化团队,团队的技术专家曾经成功研制,并且上市过治疗性抗体药物
2. 普健生物拥有自主开发的高表达载体及细胞系,以及具有商业开发 license 的细胞系
3. 普健生物具有一站式从细胞系开发,到发酵培养条件优化,再到 150L 细胞罐发酵,完成整个治疗性抗体的研发能力

## >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
抗体序列获取	目的抗体序列	抗体人源化设计 人源化序列表达纯化 亲和力测定	2-3 周	性质较好的 3 株纯化的人源化抗体及其序列 保证至少有一株人源化抗体的亲和力与嵌合抗体相当
抗体人源化设计			2-4 周	
基因合成及克隆			2 周	
瞬时转染和纯化			3 周	
数据分析			1-2 周	
稳定细胞系开发 (可选)			18 周	

## >>> 案例展示



## 双特异性抗体

### >>> 服务简介

双特异性抗体 (biospecific antibody, heteroconjugate antibody) 是一类具有双功能的杂交抗体分子, 具有两个不同的抗原特异性结合的 Fab 段, 能与不同的配体结合, 通过特异性结合肿瘤抗原同时结合不同的效应细胞和分子, 达到定向杀伤肿瘤细胞的作用。

#### 1.1 含有 Fc 区的双特异性抗体

抗体的 Fc 结构域的生物学功能有: 抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 和补体介导的细胞毒作用 (CDC)。双特异性抗体的制备技术手段有以下几种:

**Triomabs:** Triomabs 通过 Fv 功能区分别结合肿瘤细胞及 T 细胞, 通过 Fc 功能区募集表达 FcR 的功能细胞, 如 NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞及树突状细胞等, 形成复合体, 刺激 T 细胞分泌细胞因子清除肿瘤细胞, 因此 Triomabs 又被称为三功能抗体。Triomabs 双特异性抗体技术平台由德国 Fresenius 和 Trion Pharma 公司合作开发。

**Knobs-into-holes:** 这项技术由 Genentech 公司开发。具体方法是将其中的一个抗体的重链 CH3 区 366 位体积较小的苏氨酸 (T) 突变为体积较大的酪氨酸 (Y), 形成突出的 “Knobs” 型结构 (T366Y); 同时将另一个抗体重链 CH3 区 407 位较大的酪氨酸 (Y) 残基突变成较小的苏氨酸 (T), 形成凹陷的 “holes” 型结构 (Y407T); 利用 “Knobs-into-holes” 结构的空位阻效应实现两种不同抗体重链间的正确装配。突变后, 产品正确装配率由野生型的 57% 提高至 92%, 能够满足规模化生产的要求。但重链 CH3 的这一改构方式降低了抗体结构的稳定性, 为了克服这一缺点, 研究者通过噬菌体展示技术进行随机突变筛选, 构建了更为稳定的 “3 + 1” 模式 Knobs-holes 结构: 即 T366W 突变形成突出的 “Knobs” 型, 3 个氨基酸突变 (T366S, L368A 和 Y407V) 形成凹陷的 “holes” 型。Knobs-holes 结构设计有利于 2 种异源抗体重链的装配。

**Crossmab:** Crossmab 技术的代表产品为罗氏公司的 RG7221 和 RG7716, 两者均为抗 Ang-2 /VEGF 双特异性抗体。其结构是在 “knobs-holes” 结构基础上通过链交换技术, 将 Ang-2 抗体 Fab 结构域中的 CL 与 CH1 互换, 而 VEGF 抗体的 Fab 结构则保持不变。经过改造的 Ang-2 抗体轻链不易与血管内皮生长因子 (VEGF) 抗体的重链发生错配, 同时 “knobs-holes” 结构可促进两条重链异源二聚化。

**Ortho-Fab:** 该技术是 Lewis 等报道的一种克服轻链错配的设计策略。Lewis 等通过计算机模型化并结合 X 晶体衍射技术对 VH/VL 及 CH1 /CL 进行正交互补突变设计, 从而减少轻链错配现象, 将此技术结合重链异源二聚化方法, 可以实现双特异性抗体在单一细胞内的高效表达。近期, 静电转向技术 (electrostatic steering) 也被应用进行 Orthogonal Fab 双特异性抗体的构建。

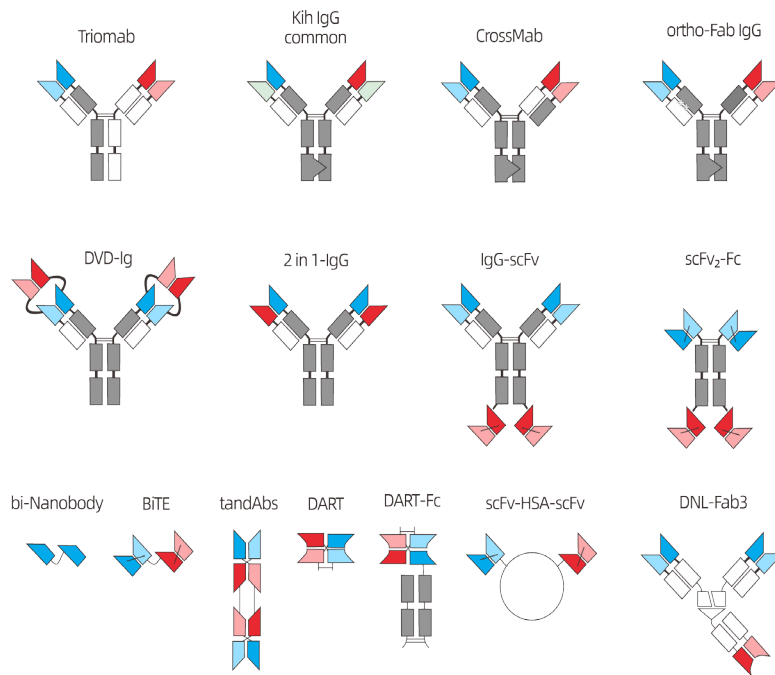
**IgG-scFv 及 scFv2-Fc:** IgG-scFv 双特异性抗体是将单链抗体 (scFv) 连接在正常 IgG 抗体分子的 C 末端, 通过分子两端的 CDR 区与靶分子结合实现双功能。而 scFv2-Fc 分子与 IgG-scFv 结构类似, 是将两个 scFv 分子分别连接在 Fc 功能区的两端, 形成双功能区。

#### 1.2 不含 Fc 区的双特异性抗体

另一类双特异性抗体不含 Fc 区, 其优点是相对分子质量小、可以在原核细胞中表达且更易穿过组织及肿瘤细胞到达靶位点; 缺点是由于不含抗体 Fc 区, 不能介导相应的生物学功能且半衰期通常较短, 如已上市的 Blinatumomab 血液半衰期只有 2.11 h, 需要通过注射泵连续给药 28 d。目前, 此类双特异性抗体主要有 BiTE, DART, TandAbs, bi-Nanobody 等。

**BiTE 双特异性抗体:** 德国 Micromet 公司开发的 BiTE 系列产品是不含 Fc 区结构类双特异性抗体的典型代表。BiTE 是将抗 CD3 单链抗体 (scFv) 与不同抗肿瘤细胞表面抗原的单链抗体通过肽段进行连接而获得, 可同时结合 CD3 阳性 T 细胞及肿瘤细胞。BiTE 通过结合 T 细胞表面 CD3, 将 T 细胞募集至肿瘤细胞表面, 从而激活 T 细胞进行肿瘤杀伤。BiTE 技术研究者克服了 scFv 稳定性差、表达量低、溶解性低等生产问题, 成功实现了 BiTE 产品的商业化。

**bi-Nanobody 双特异性抗体:** Nanobody 是 Ablynx 公司参考骆驼及美洲驼的单域抗体结构 (无轻链及 CH1 区), 通过结构简化, 仅保留 VH 区而开发的专利平台技术。在实际应用中, Nanobody 是将 2 个或多个抗体分子的 VH 区进行连接而实现多特异性结合。该类产品的优点是分子小、稳定性高、易于人源化、易于连接, 并可通过多种途径进行给药。此外, 在分子设计时可选择加入与人白蛋白结合的功能区, 将半衰期延长至 2 ~ 3 周, 并且可以通过白蛋白将药物运输至靶位点。

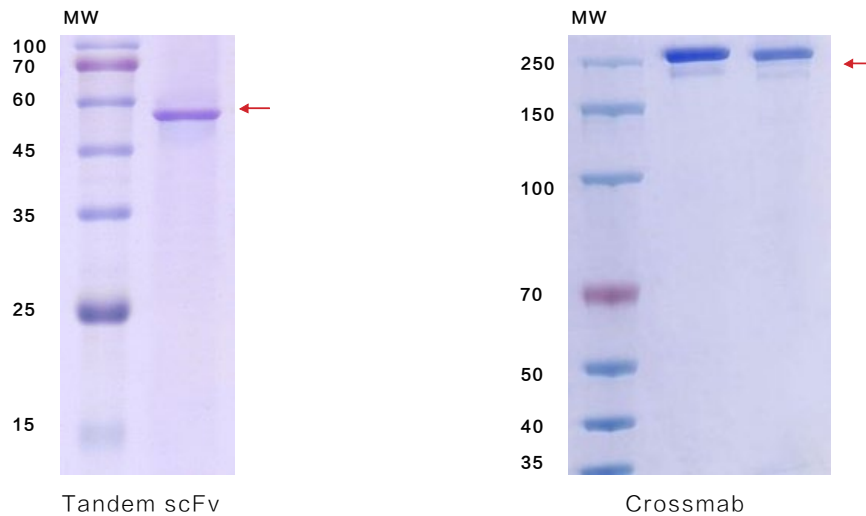


普健生物具有经验丰富的双特异性抗体制备团队，能够提供以上双特异性抗体类型的设计

## >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
双特异性抗体	抗体序列	基因合成及密码子优化 载体构建 表达及纯化 QC 分析	5 周	纯化抗体 技术服务报告

## >>> 案例展示



## 抗独特型抗体制备

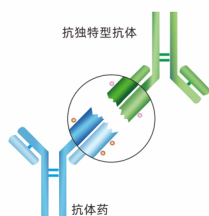
### >>> 服务简介

抗独特型抗体 (Anti-idiotypic antibody) 是指能够特异性结合待测抗体位于可变区的独特位 (Idiotypic) 的抗体。在抗体药物开发过程中, 它可以特异性的检测体内的抗体药物, 是药代动力学研究的关键试剂。主要应用领域: 抗体药物药代动力学分析、抗体药物免疫原性分析、抗药物抗体的临床开发。普健生物拥有多年的抗独特型抗体开发经验, 可以提供从抗原制备, 抗独特型抗体开发到检测试剂盒开发全套技术服务。

#### 抗独特型抗体的类型

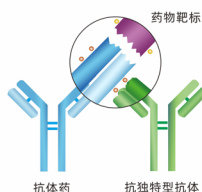
##### 一、单克隆抗独特型抗体

单克隆抗独特型抗体可应用于药代动力学研究中游离型, 结合型和抗体药物总量的检测。根据待检测抗体药的类型, 普健生物可以提供抗原中和, 非中和及药物靶标复合物三种类型的抗独特型抗体。普健生物也可提供保证型配对抗体服务, 交付识别不同独特位且配对成功的抗体, 将大大提高下游 Sandwich ELISA 检测试剂盒开发的成功率。



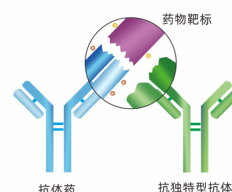
#### 抗原中和型

- 抗原阻断型
- 检测游离型药物



#### 非中和型

- 抗原非阻断型
- 检测抗体药物总量



#### 药物靶标复合物型

- 抗原非阻断型
- 检测结合型药物

##### 二、多克隆抗独特型抗体

潜在免疫反应 (Immune response) 的检测已成为药物开发和上市后重要的监管要求。高灵敏度及多样性的多克隆抗独特型抗体可作为免疫原性研究中的阳性参照物, 模拟 ADA 在人体中产生的情况。普健生物提供高亲和力和特异性的多克隆抗独特型抗体开发服务, 针对客户不同抗体量的需求, 我们将最大程度为客户节省开发成本。

### >>> 服务优势

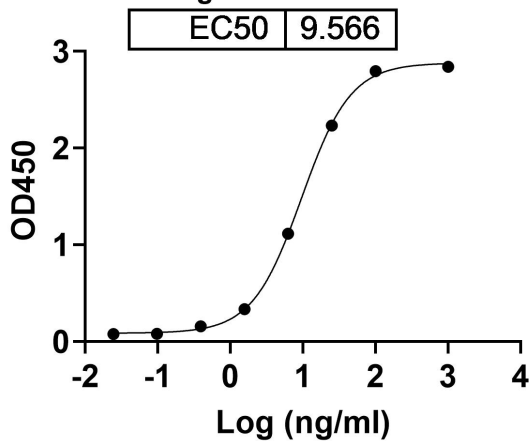
1. 同时拥有鼠单克隆抗体和兔单克隆抗体技术平台, 可以制备出高亲和力、高特异性的抗独特型抗体
2. 完善的抗原制备平台, 重组抗体表达平台可以实现 F(ab')<sub>2</sub> 全长抗体的高通量表达, 全长抗体的酶切以及纯化经验丰富
3. 可以建立后续的检测方法, 以及试剂盒的开发

## >>> 服务内容

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
抗独特型兔多克隆抗体制备服务	纯度 > 85% 的靶向抗体药 同型对照 / 人源 IgG	抗原复核 抗原制备 免疫及血清效价检测 纯化 QC 分析	4-6 个月	免疫前后血清 纯化后的抗体 技术服务报告
抗独特型鼠单克隆抗体制备服务		抗原复核 抗原制备 免疫及血清效价检测 融合及筛选 抗体生产及纯化 QC 分析 ELISA 配对检测	4-6 个月	阳性克隆的杂交瘤细胞培养上清 纯化的抗体 杂交瘤细胞系 技术服务报告
抗独特型兔单克隆抗体制备服务		抗原复核 抗原制备 免疫及血清效价检测 建库及筛选 抗体生产及 QC 分析 ELISA 配对检测	2-3 个月	纯化的抗体 完整的抗体序列(包括重链和轻链) 技术服务报告

## >>> 案例展示

Anti-Pembrolizumab antibody, pAb, Rabbit  
Binding with Pembrolizumab



Elisa binding of Anti-pembrolizumab Antibody, pAb, Rabbit with pembrolizumab coating Antigen:  
pembrolizumab, 1ug/mL

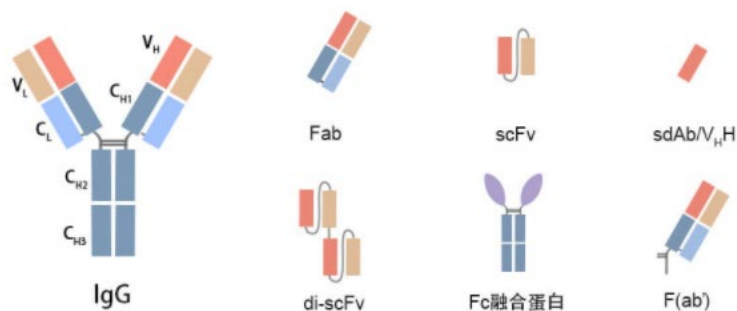
Anti-pembrolizumab Antibody, pAb, Rabbit dilution from 1000ng/mL

EC50=9.566ng/mL

## 重组抗体生产及亲和力检测

### >>> 服务简介

重组抗体包括嵌合抗体、人源化抗体、抗体片段、双特异性抗体、纳米抗体等。与传统的单克隆抗体相比，重组抗体具有抗体基因序列明确、可以进行基因工程改造、便于大量生产等诸多优势，现已被广泛应用于科学研究、免疫诊断以及治疗性抗体领域。



普健生物作为武汉国家生物产业基地指定的光谷抗体发现与筛选公共服务平台，拥有完善、高效的重组抗体表达技术平台，可以实现抗体发现、抗体测序、抗体表达、重组抗体生产一站式服务。

### >>> 服务优势

1. XtenCHO™ 细胞是 Atagenix 开发的一种经基因改造的 CHO 细胞株，使用含配套元件的载体，可以使转染进入细胞的表达载体拷贝数增加，延长游离质粒在细胞内的停留时间，从而使载体携带的目的基因获得高水平持续表达。

2. XtenCHO™ 高密度瞬转表达系统改进了 CHO 常规转染方法，采用新颖的高密度转染方法和特殊的细胞培养模式，提高了转染后的细胞活率，使转染细胞存活时间从常规 6-7 天延长至 10-14 天，进一步提高了目的蛋白产量。

3. XtenCHO™ 高密度瞬转表达系统的转染试剂、表达培养基和补料培养基相较于常用的阳离子脂质体转染试剂、商业化 CHO 瞬转培养基以及补料培养基，成本大大降低，更适用于工业生产，在规模较大的重组蛋白瞬时表达生产中更能体现其性价比高的特点。

4. 普健生物可以生产多种形式的重组抗体，包括全长抗体、嵌合抗体、scFv、Fab、VHH，多样化的 Fc 融合蛋白等。

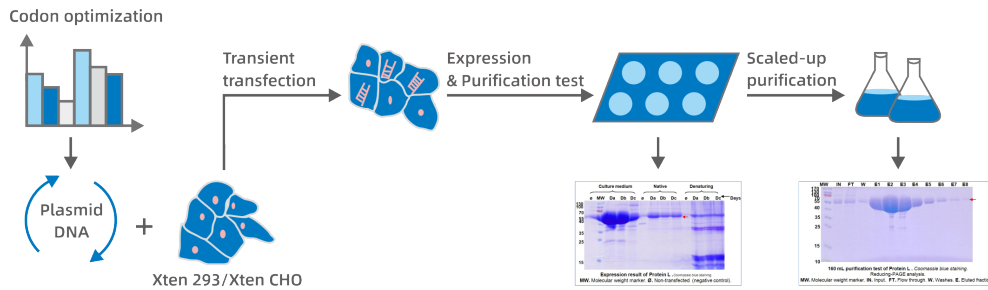
5. 产能高，一次性可以同时进行 200 个抗体的转染，生产周期快。

6. 低内毒，纯化后重组抗体内毒素含量可低至 0.1 EU/ml

服务内容	客户提供	服务步骤	服务周期	交付内容
高通量低内毒抗体表达	抗体序列	序列优化与基因合成	2-3 周	目的抗体 技术服务报告
		无内毒素质粒大提		
		细胞转染与培养		
		低内毒素抗体纯化		
		内毒素含量测定		



## >>> 服务流程



## >>> 瞬时转染案例

### 1. XtenCHO™ 与其它商业化表达系统的比较

使用 XtenCHO™ 高密度瞬转表达系统和其它公司的两个商业化 CHO 瞬转表达系统 CHO Expression system 1 和 CHO Expression system 2 同时表达一个抗体，转染后的细胞密度和活率监测及抗体产量见图 1 和图 2：

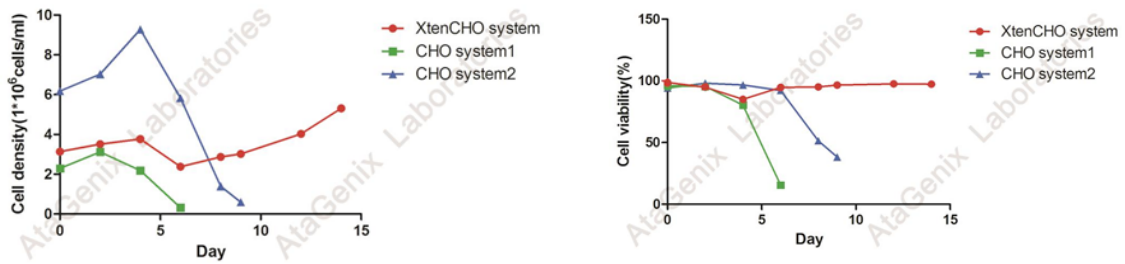


图 1 不同表达系统转染后细胞密度及活率监测

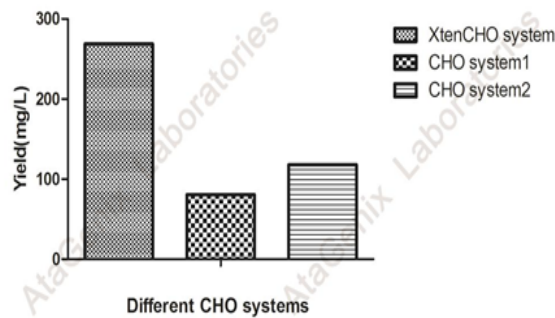


图 2 不同表达系统表达相同抗体产量比较

## 2. 不同治疗性重组抗体表达测试

选取 4 种典型的治疗性重组抗体序列，用 XtenCHO™ 高密度瞬转表达系统进行表达测试。抗体产量见图 3:

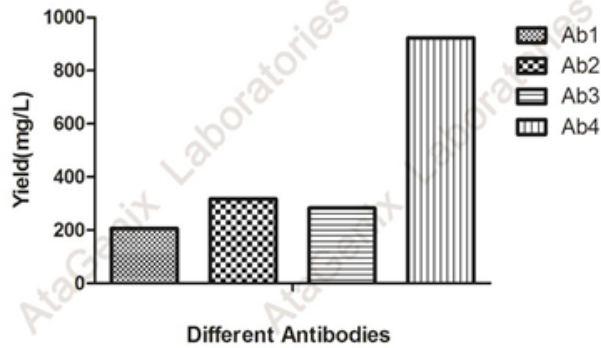
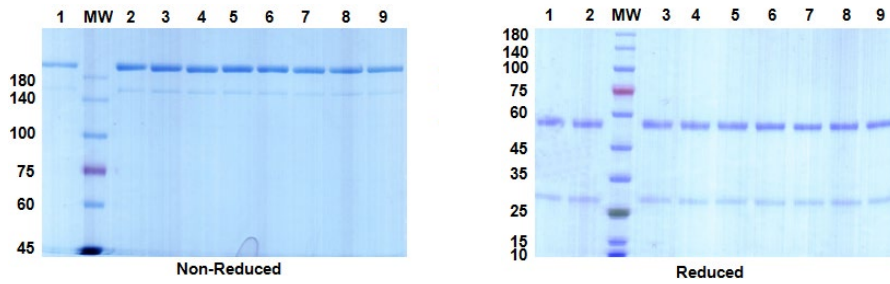


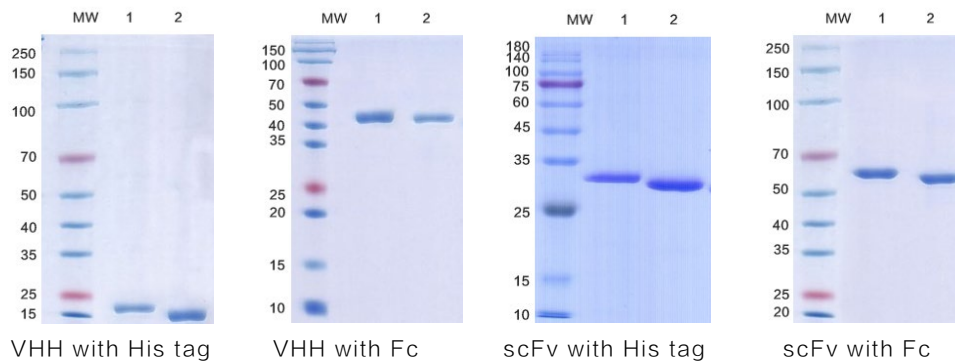
图 3 XtenCHO™ 系统表达不同抗体的产量测定

Ab1: Pembrolizumad, Ab2: Utomilumab, Ab3: Trastuzumab, Ab4: Claudiximab

### 全长抗体生产



### 抗体片段生产

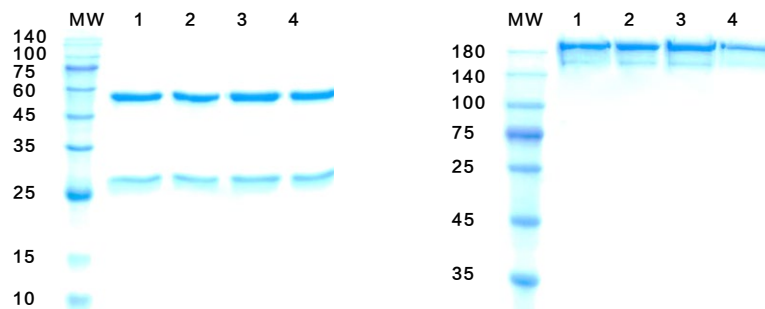


## >>> 稳定转染案例

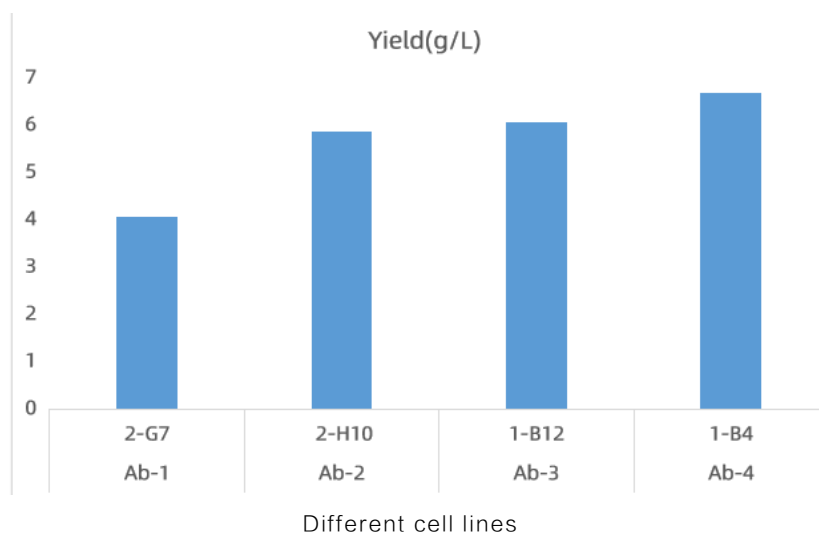
重组抗体生产稳定细胞株构建

Protein name	Cell line name	Yield(g/L)
Ab-1	2-G7	4.05
Ab-2	2-H10	5.86
Ab-3	1-B12	6.07
Ab-4	1-B4	6.68

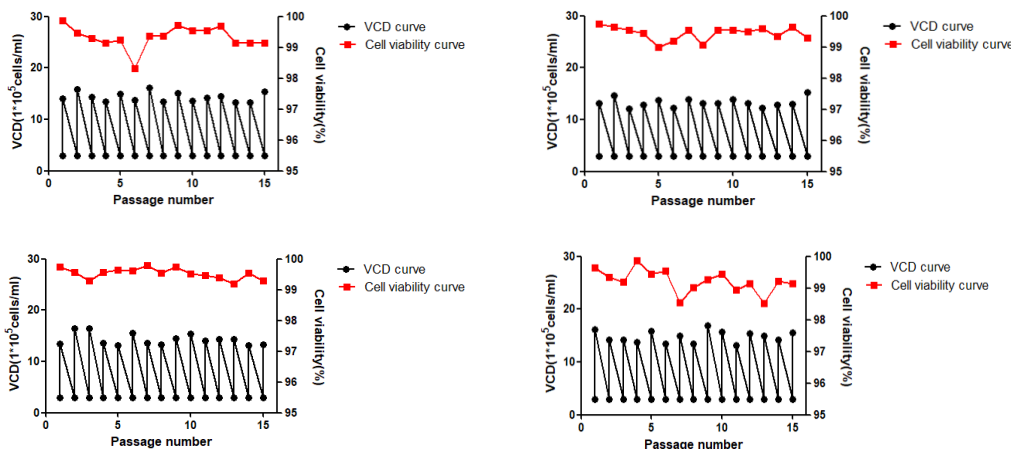
SDS-PAGE 检测



产量分析

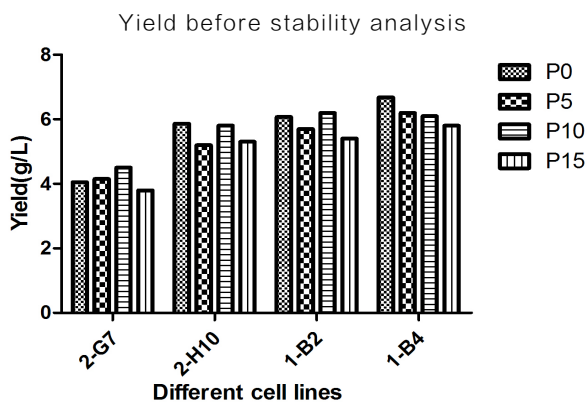


### 生长稳定性分析



Cell line	CV% of VCD	CV% of viability
2-G7	6.59	0.37
2-H10	6.67	0.22
1-B12	7.98	0.18
1-B4	7.71	0.37

### 产量稳定性分析



Cell lines	Yield before stability analysis(g/L)	Yield of P5(g/L)	Yield of P10(g/L)	Yield of P15(g/L)	CV%
2-G7	4.05	4.15	4.5	3.8	7.03
2-H10	5.86	5.2	5.8	5.3	6.1
1-B12	6.07	5.7	6.2	5.4	6.21
1-B4	6.68	6.2	6.1	5.8	5.9

QC (支原体检测 +SEC-HPLC)

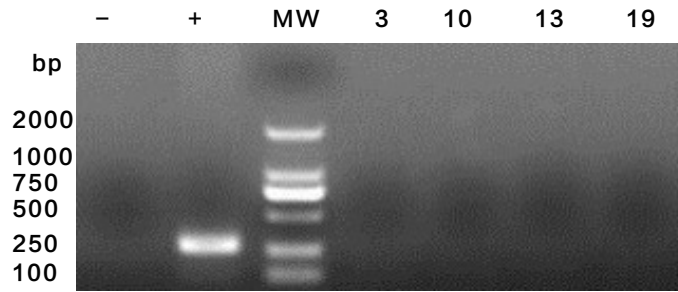
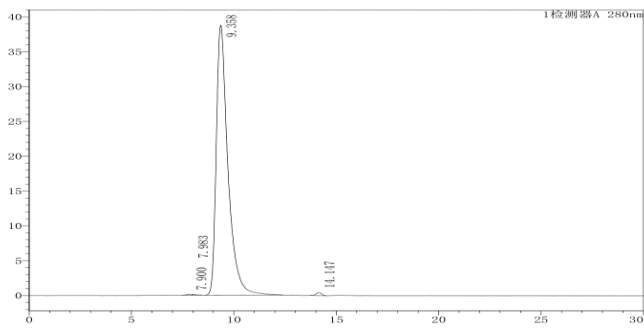


Figure 28. PCR results of mycoplasma test.

MW. DL2000 marker.

+. Positive control (290 bp).

-. Negative control



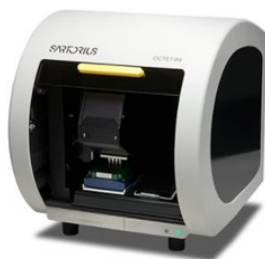
## >>> 亲和力检测

亲和力是判断分子间相互作用的重要参数，是了解分子识别、生物学过程、药物发现与筛选的重要指标。在药效的评价中，大分子及其复合物的稳定性评价需要从热力学、动力学和热稳定性等方面进行全面的研究，它包括分子间的结合、结合的快慢、结合的强弱、结合的机理等方面。

普健生物基于 Biacore、ForteBio Octet 和 Open-SPR 平台为生物医药客户提供相应的分子间互作检测服务，能够实现对蛋白、抗体、抗体片段、抗体融合蛋白等相互作用的分析。



Biacore T200



Octet® R4



Open-SPR

## >>> 服务内容

1. 生物大分子间亲和力检测
2. 小分子亲和力检测
3. Fc 受体蛋白 / 补体与抗体亲和力检测
4. 抗体筛选、亲和力排序

## 药物研发概念验证 (Proof-of-Concept) 工具

抗体药物研究越来越热，但全球新药的研发效率却在持续下降。平均每个创新药的研发成本从 2013 年的 13.27 亿美元，持续上升到 2020 年的 24.42 亿美元；原因在于：低垂的果实总是先被摘走，剩下的果子则越来越难采。

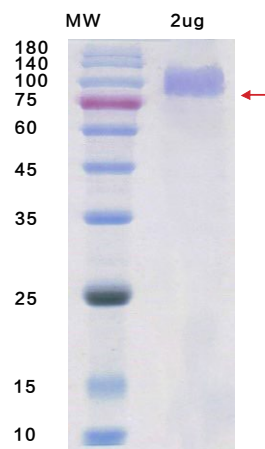
创新药大致分为药物发现及前期研究、临床前药理学实验、工艺开发、动物安评、临床实验等主要阶段。一旦确定了候选分子的结构或序列，后面开发的环节（动物安评、工艺开发、临床 I 期、II 期等等）都是逐步验证成药性的过程。因此，创新药的根本逻辑是尽早尽快的暴露问题、发现风险，尽可能的实现低成本试错；创新药的竞争，其实就是低成本的试错竞争。

那么如何控制风险，尽早暴露风险呢？如何确定我们筛选得到的抗体分子是否具有成药的可能性呢？这个时候成药性的概念验证就非常重要。普健生物提供一系列具有生物活性的靶点蛋白，并提供靶点蛋白对应的已经上市或者正在进行临床的大分子药物类似物。可以通过特异性检测、亲和力检测、细胞功能实验、动物实验室等，对候选靶点或药物进行成药性概念验证，从而在早期确定研发项目的可行性。

### >>> EGFR

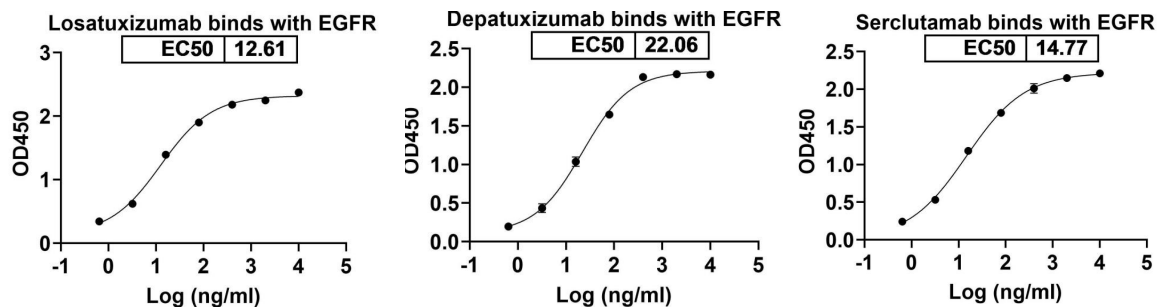
Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane protein that is activated by binding of its specific ligands, including epidermal growth factor and transforming growth factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ). ErbB2 has no known direct activating ligand, and may be in an activated state constitutively or become active upon heterodimerization with other family members such as EGFR. Upon activation by its growth factor ligands, EGFR undergoes a transition from an inactive monomeric form to an active homodimer.

### >>> SDS-PAGE 检测



Human EGFR/HER1 protein , C- His Tag

## &gt;&gt;&gt; 活性检测



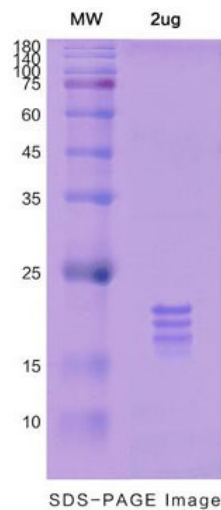
除了 Losatuxizumab、Depatuxizumab 和 Serclutamab 三个之类似物之外，针对靶点 EGFR 上市的和临床的类似物还有：Olinvacimab、Alacizumab、Tanibirumab、Vulinacimab、Modotuximab、Tomuzotuximab、Matuzumab、Demupitamab、Zatuximab、Imgatuzumab、Laprituximab、Nimotuzumab、Zalutumumab、Pimurutamab、Petosemtamab、Icrucumab、Cetuximab、Panitumumab、Ramucirumab、Necitumumab、Amivantamab、Pulocimab、Bafisontamab 等，普健生物对其亲和力和活性也做了一些相关的验证。



## >>>IL17A

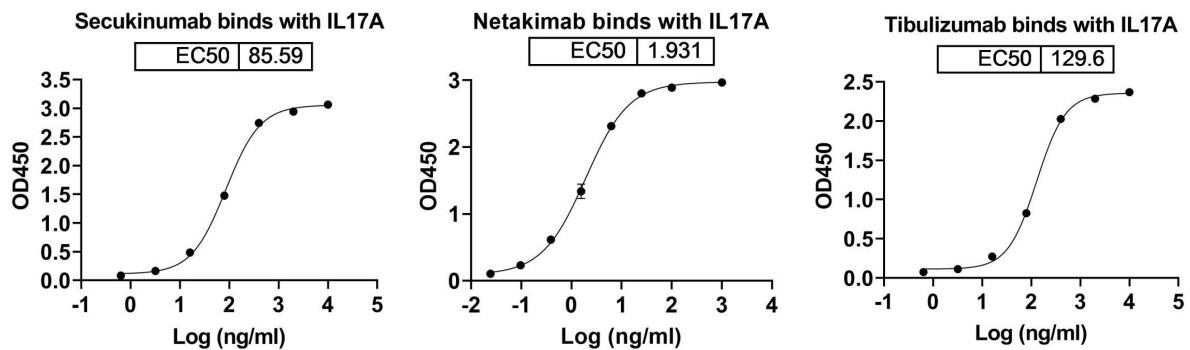
Interleukin-17A is a protein that in humans is encoded by the IL17A gene. In rodents, IL-17A used to be referred to as CTLA8, after the similarity with a viral gene. The protein encoded by this gene is a proinflammatory cytokine produced by activated T cells. This cytokine regulates the activities of NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinases. This cytokine can stimulate the expression of IL6 and cyclooxygenase-2 (PTGS2/COX-2), as well as enhance the production of nitric oxide .

## >>>SDS-PAGE 检测



Human IL-17A / CTLA-8 Protein, No tag

## >>>活性检测



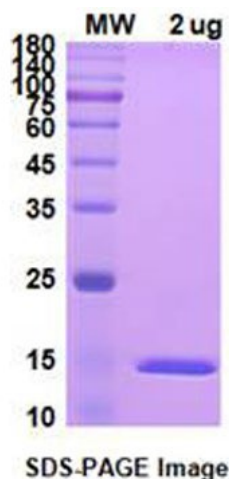
除了 Netakimab、Tibulizumab、Secukinumab，三个之类似物之外，针对靶点 IL17A 上市和临床的类似物 还有：Bimekizumab、Vunakizumab、Perakizumab、Afasevikumab、Sonelokimab、Remtolumab、Ixekizumab、Xeligekimab、Gumokimab 等，普健生物对其亲和力和活性也做了一些相关的验证。

## >>> TNF $\alpha$

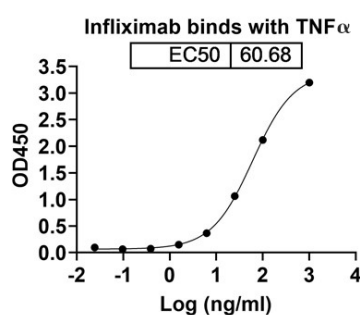
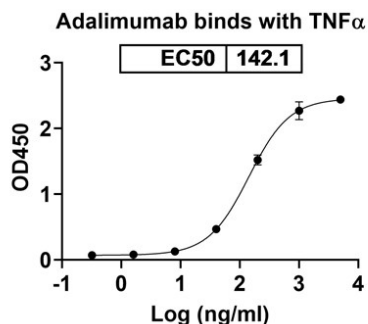
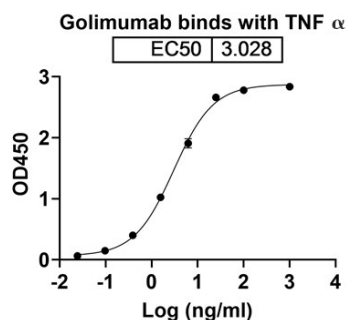
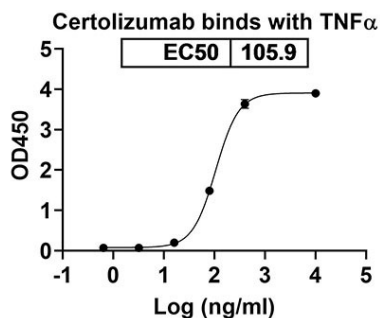
Tumor necrosis factor (TNF, cachexin, or cachectin; often called tumor necrosis factor alpha or TNF- $\alpha$ ) is an adipokine and a cytokine. TNF is a member of the TNF superfamily, which consists of various transmembrane proteins with a homologous TNF domain.

As an adipokine, TNF promotes insulin resistance, and is associated with obesity-induced type 2 diabetes. As a cytokine, TNF is used by the immune system for cell signaling. If macrophages (certain white blood cells) detect an infection, they release TNF to alert other immune system cells as part of an inflammatory response.

## >>> SDS-PAGE 检测



## >>> 活性检测

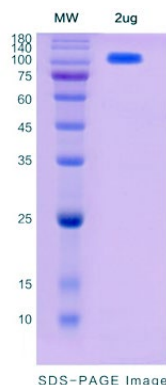


除了 Certolizumab、Golimumab、Adalimumab、Infliximab 四个之类似物之外，针对靶点 TNF  $\alpha$  上市和临床的类似物还有 Remtolumab、Afelimomab、Nerelimomab、Placulumab、Ozoralizumab、Etanercept、Licamilimab 等，普健生物对其亲和力和活性也做了一些相关的验证。

## >>> ERBB2

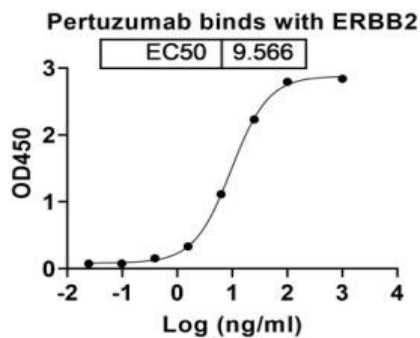
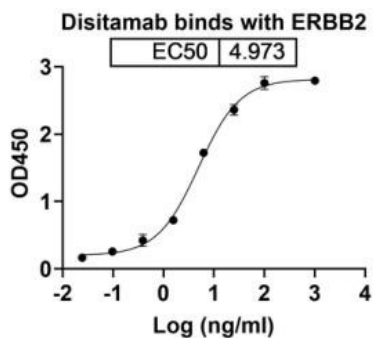
HER2 is a member of the human epidermal growth factor receptor (HER/EGFR/ERBB) family. Amplification or over-expression of this oncogene has been shown to play an important role in the development and progression of certain aggressive types of breast cancer. In recent years the protein has become an important biomarker and target of therapy for approximately 30% of breast cancer patients

## >>> SDS-PAGE 检测



Recombinant Human ERBB2 protein ,C- His Tag

## >>> 活性检测



除了 Disitamab、Pertuzumab，针对靶点 TNF  $\alpha$  上市和临床的类似物还有 Timigutuzumab、

Gancotamab、Zanidatamab、Ertumaxomab、Zenocutuzumab、Anbenitamab、Coprelotamab

Runimotamab、Trastuzumab、Margetuximab、M802、Fidasimtamab 等，普健生物对其亲和力和活性也做了一些相关的验证。

普健生物将所有的靶点蛋白，例如：CD3E、CD269、CD262、CTLA4、CD115、FOLR1、Trop2 等以及靶点蛋白相对应的上市和临床的类似物都做了研发、生产以及活性验证；为抗体药物的研发提供完善的 POC 验证工具，降低抗体药物的研发成本。



电话：027-87433958

邮箱：Info@atagenix.com

网址：www.atagenix.cn

地址：武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋