

武汉大学硕士课程之

药学研究方法论

本节主讲：台万一

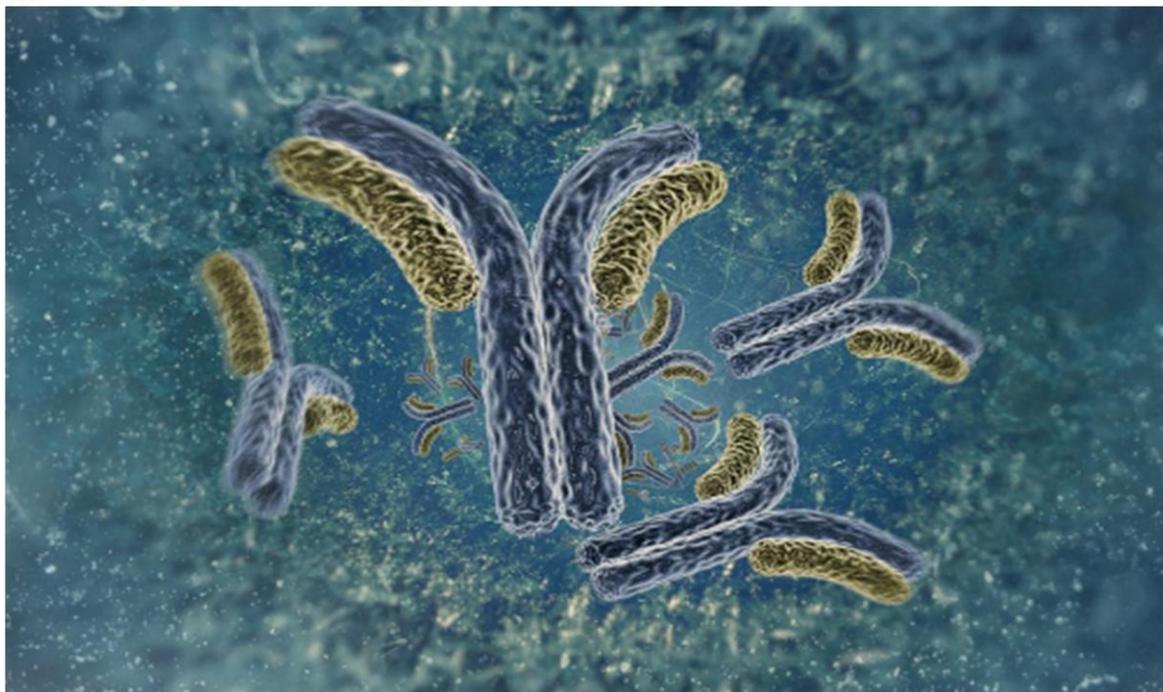
武汉大学药学院

内容概要

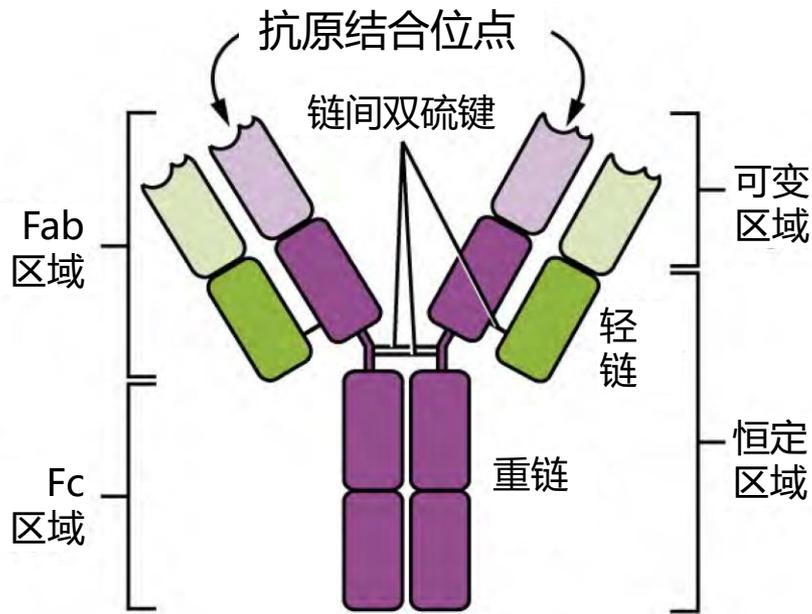
抗体的研究方法与应用

- 抗体的基础知识
- 抗体在科学研究中的应用
- 抗体作为药物的应用方式
- 抗体的研究方法

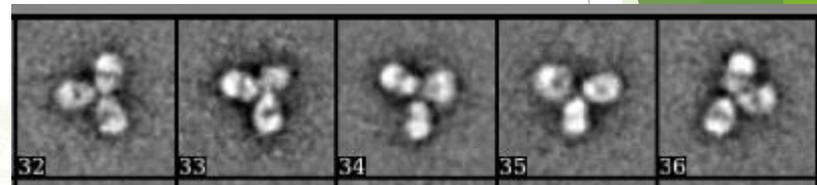
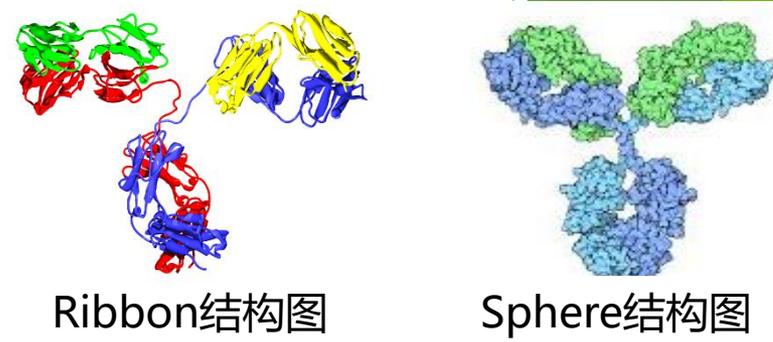
第一节：抗体的基础知识



抗体的基本结构

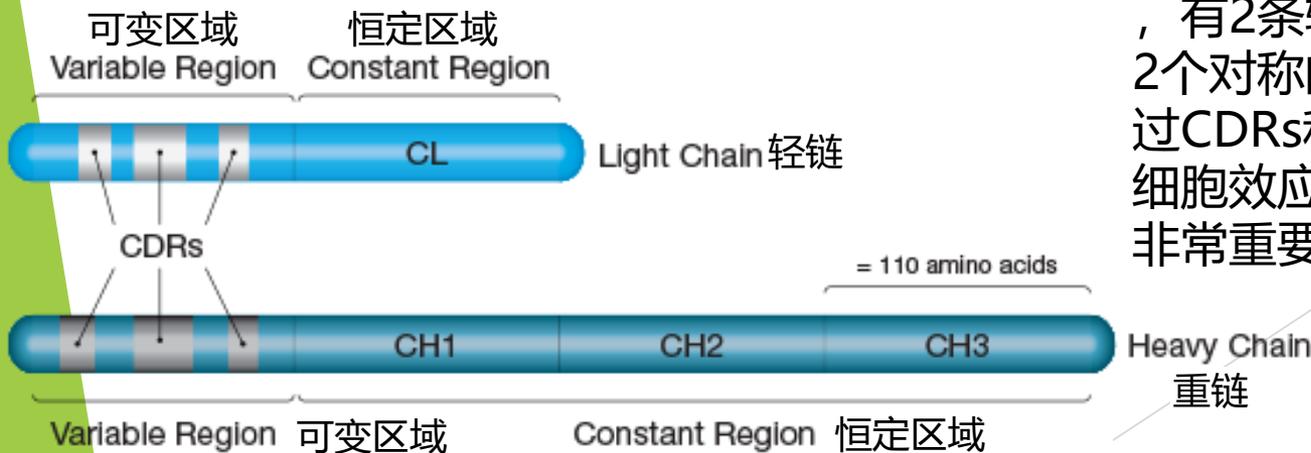


抗体的常见结构示意图



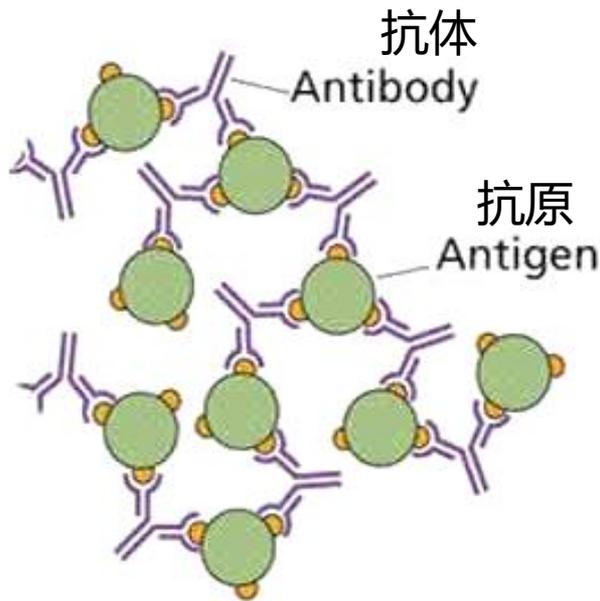
抗体的电子显微镜图影

抗体为Y-型结构的糖基化蛋白质，有2条轻链和2条重链组成。抗体有2个对称的抗原结合区（Fab），通过CDRs和抗原结合。Fc区域是引发细胞效应的重要部位，对抗体的功能非常重要。



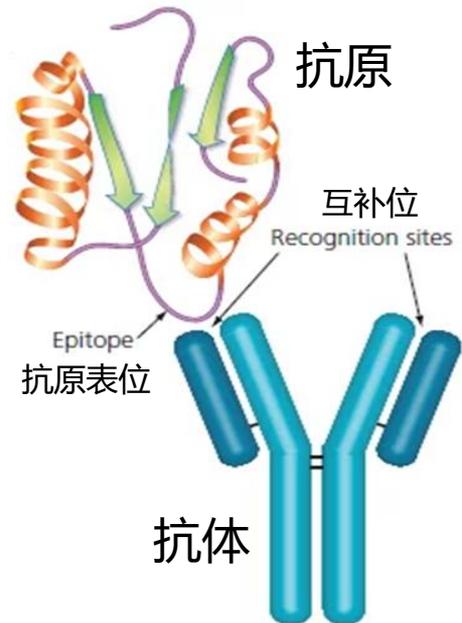
每个成年人有40-100g抗体

抗体与抗原

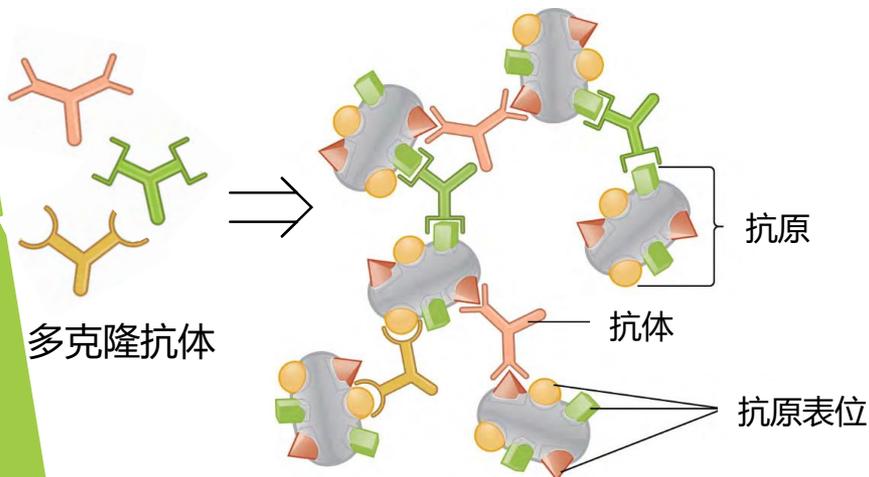


抗体结合抗原表面的一部分，这个被抗体识别的部位称为表位。一个抗原可以有很多个表位。和表位对于的是抗体的互补位。

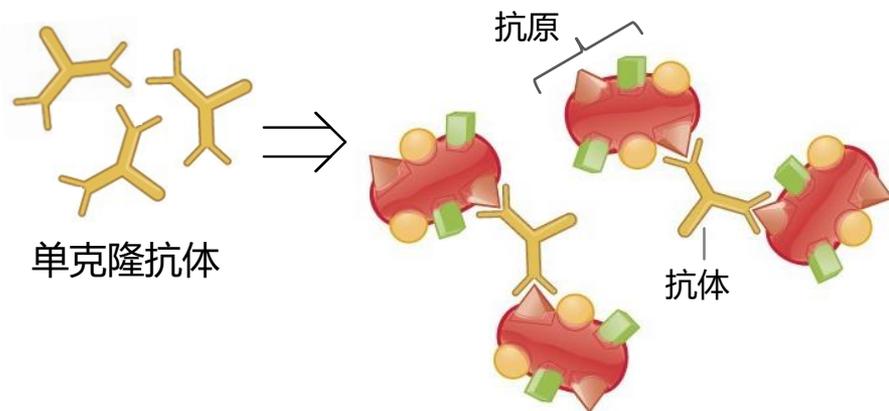
每个抗体只可以识别一种表位，这种纯的抗体称为单克隆抗体。很多种抗体的混合物，可以识别多个表位，称为多克隆抗体。



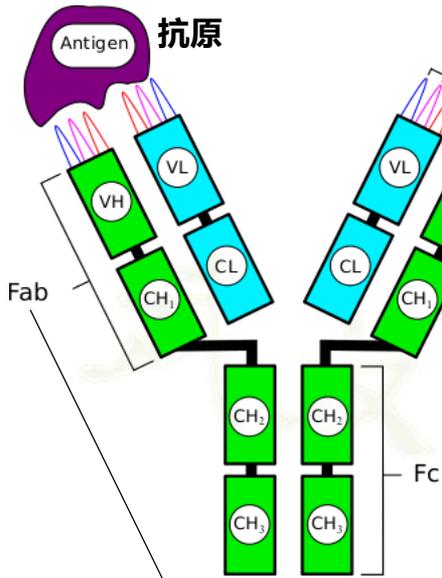
多克隆抗体（结合多个抗原表位）



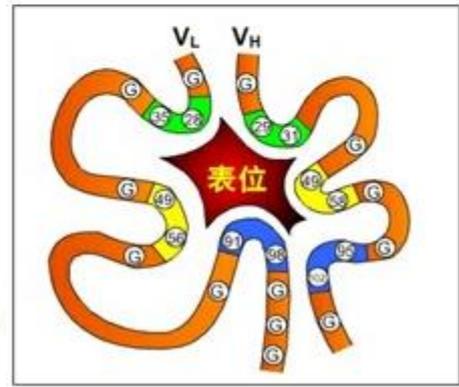
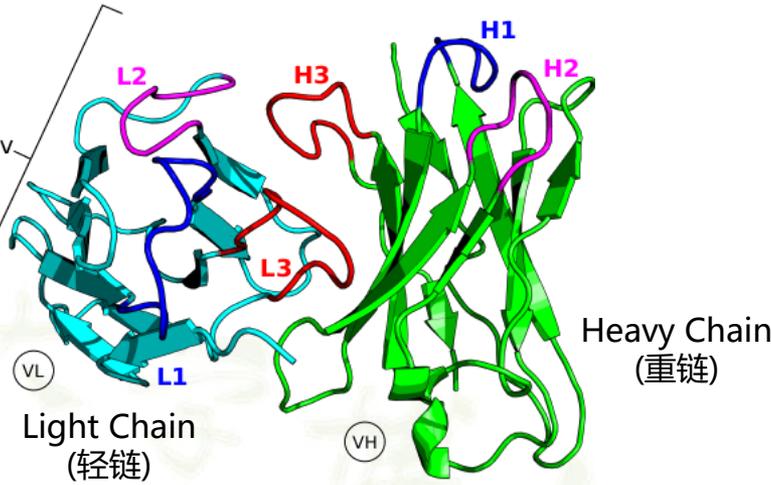
单克隆抗体（结合单个抗原表位）



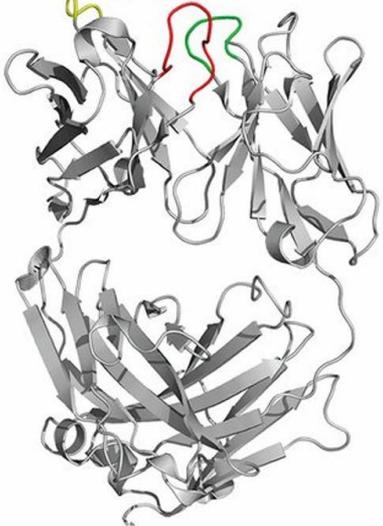
抗体依靠可变区与抗原结合



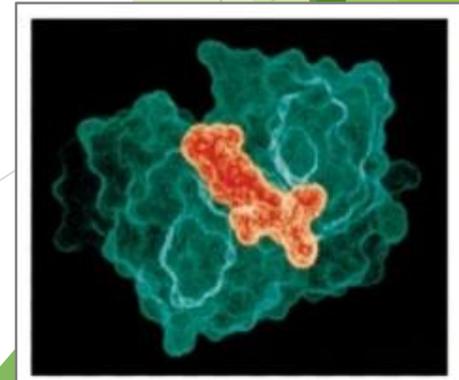
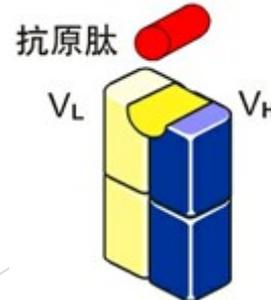
抗体CRD的序列多变，
而其它区域的序列趋保守。



CDR2H CDR3H CDR3L



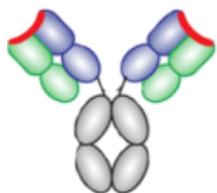
CRD是构成互补位的关键；
支架上的其它个别氨基酸也参与抗原结合。
CRD和这些氨基酸共同构成互补位。



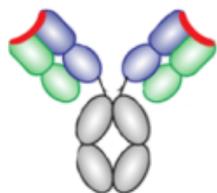
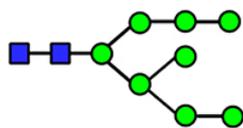
抗体的结合能力和抗原种类

- 抗体对各种抗原分子都具有很好的结合能力

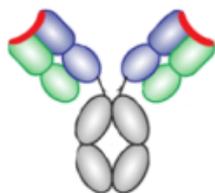
多肽或蛋白



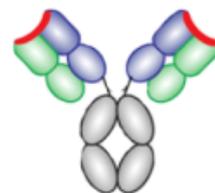
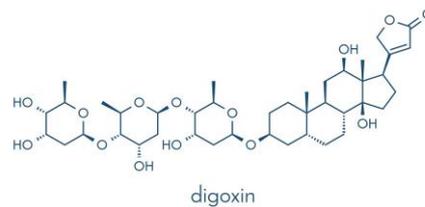
多糖



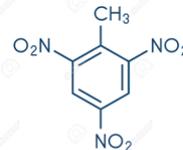
PEG等高分子



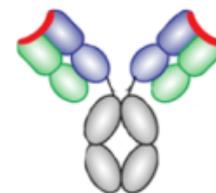
药物



小分子

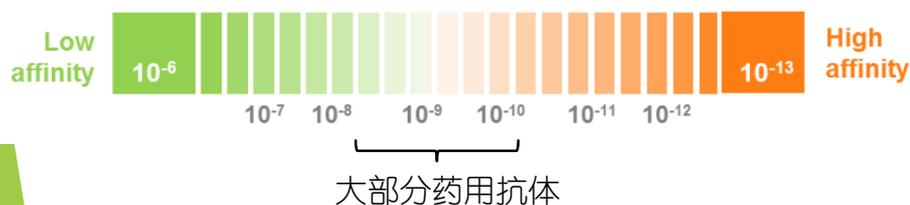


Trinitrotoluene (TNT)

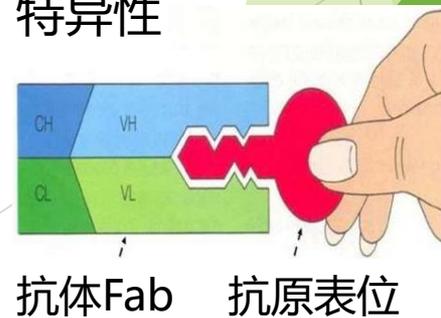


- 抗体的结合能力：亲和力和结合特异性

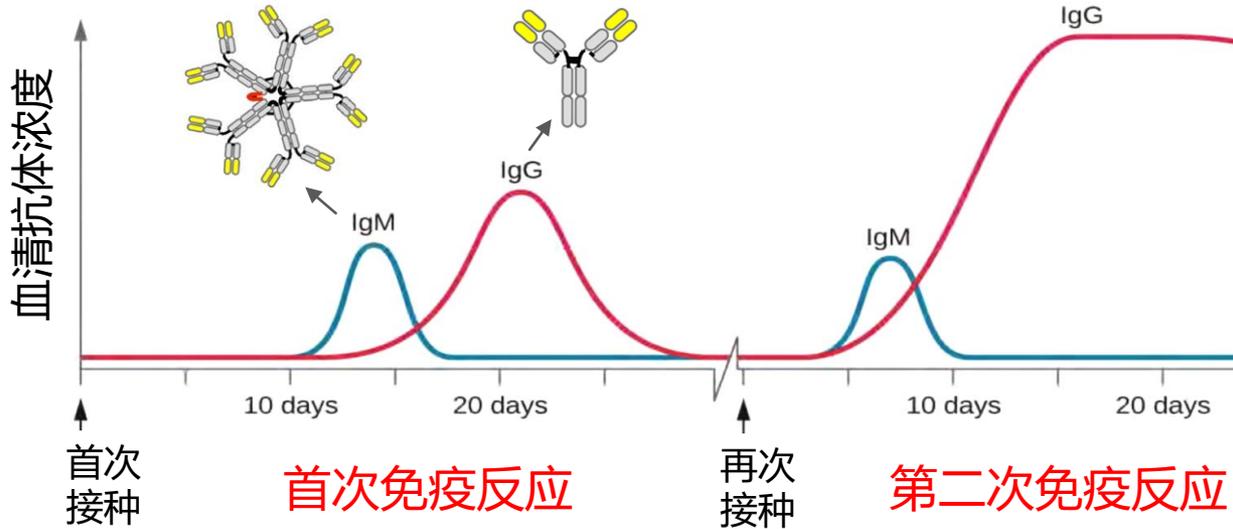
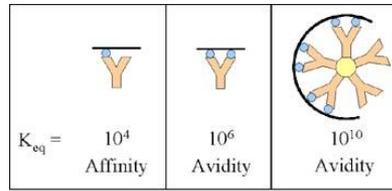
亲和力, K_D



特异性



抗体与机体免疫

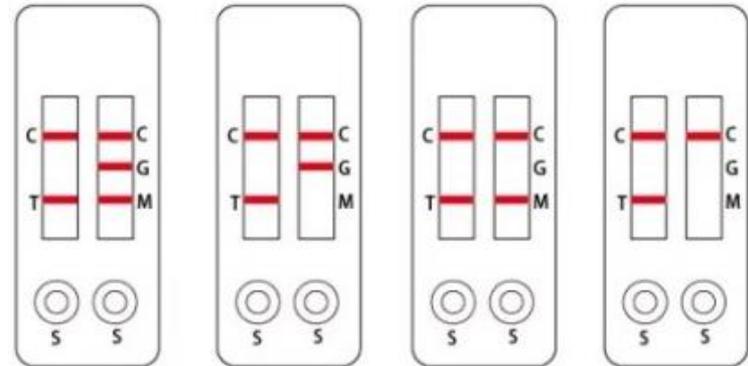


免疫系统接触抗原后会在10天左右产生免疫反应，机体首先产生IgM，然后生产IgG。IgM反应快速但是抗原亲和力较差。首次免疫产生的抗体质量和滴度一般都不高，所以需要第二次免疫接种。第二次机体优化出高质量IgG，并产生免疫记忆，可维持数月，甚至记忆终生。



常规抗体检测试剂盒和测试笔。

- 2滴血液或血清
- 20-30分钟孵育



LgG Positive
LgM Positive

Antigen positive
LgG Positive

Antigen positive
LgM Positive

Antigen positive

检测机制：
lateral flow immunochromatography

第二节：抗体在科学研究中的应用



抗体已经大规模商业化

● 抗体试剂



Abcam公司
>30000种



赛默飞世尔科技
>18000种



>20000种



义翘神州科技
>10000种

● 抗体种属



小鼠 ✓



兔 ✓



羊 ✓



荷兰猪



大鼠



鸡

● 多克隆与单克隆抗体

多克隆抗体是混合物，一般为免疫动物的血清提取物。

- 价格便宜
- 灵敏度高
- 非特异性强
- 批次间重复性差

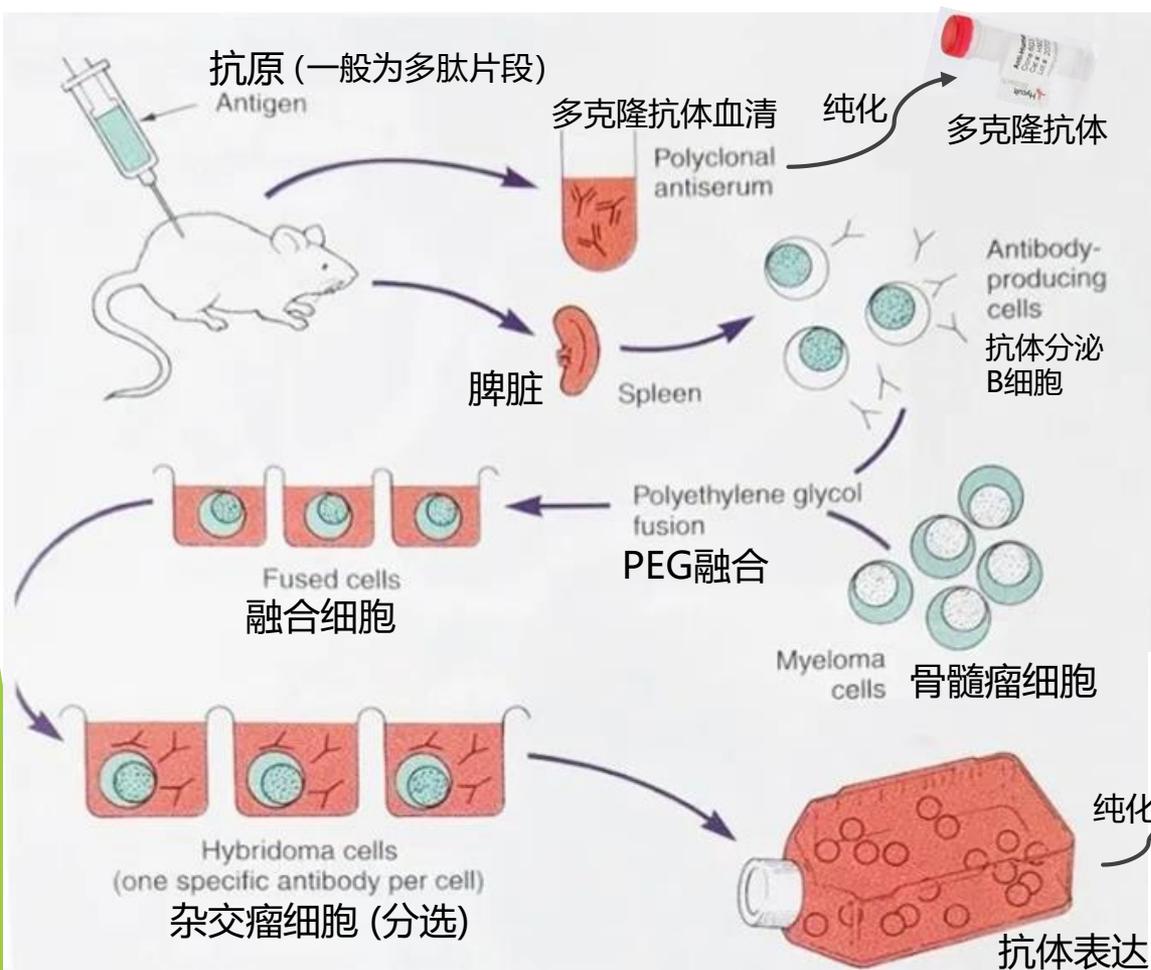
单克隆抗体是通过杂交瘤技术制备的纯化抗体。

- 价格较贵
- 特异性强
- 重复性好

● 抗体个性化定制

各种抗体公司均接受个性化定制抗体，价格数千到数万元，周期几个月到1年多。

商业化单克隆抗体的制备



杂交瘤技术

- 骨髓瘤细胞让抗体分泌B细胞可以无限增殖。
- 每个B细胞只表达分泌一种抗体。
- B细胞存在于血液、淋巴、脾脏中，脾脏最多。
- 不同动物物种的抗体有种属区别，表现在非CDR区域的氨基酸序列不同。



ThermoFisher
SCIENTIFIC

Home > Shop All Products > Primary Antibodies > Protein Specific Primary Antibodies > APO-1 Monoclonal Antibody (clone 10)

APO-1 Monoclonal Antibody (clone 10)

单克隆代号

Search All

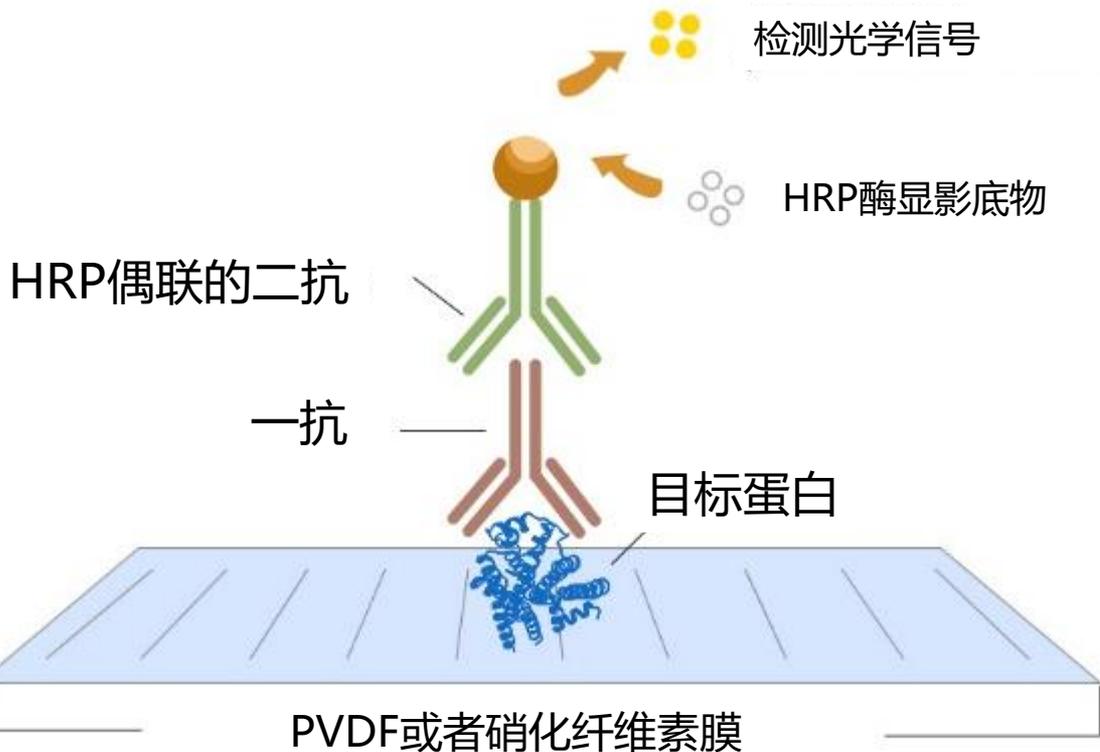
Catalog number: 10217MM10PAB

Related applications: 流式细胞术

Contact us for support

抗体应用：Western Blotting

对细胞裂解液或者组织裂解液中某一种蛋白质进行定量检测。



蛋白质通过疏水氨基酸非共价吸附在PVDF或者硝化纤维素膜上面，一抗识别目标蛋白的表位，二抗识别一抗的种属表位，二抗偶联的HRP催化底物放光，CCD相机显影感光胶片，实现检测。

一抗：

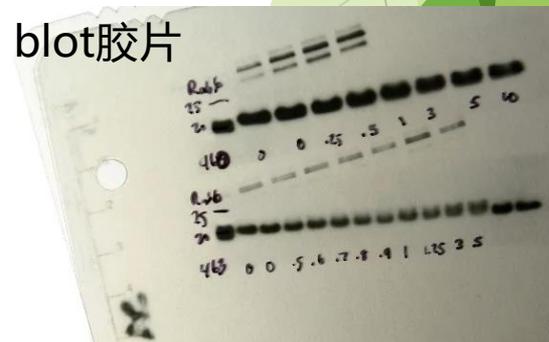
比如鼠抗HER2抗体

二抗：

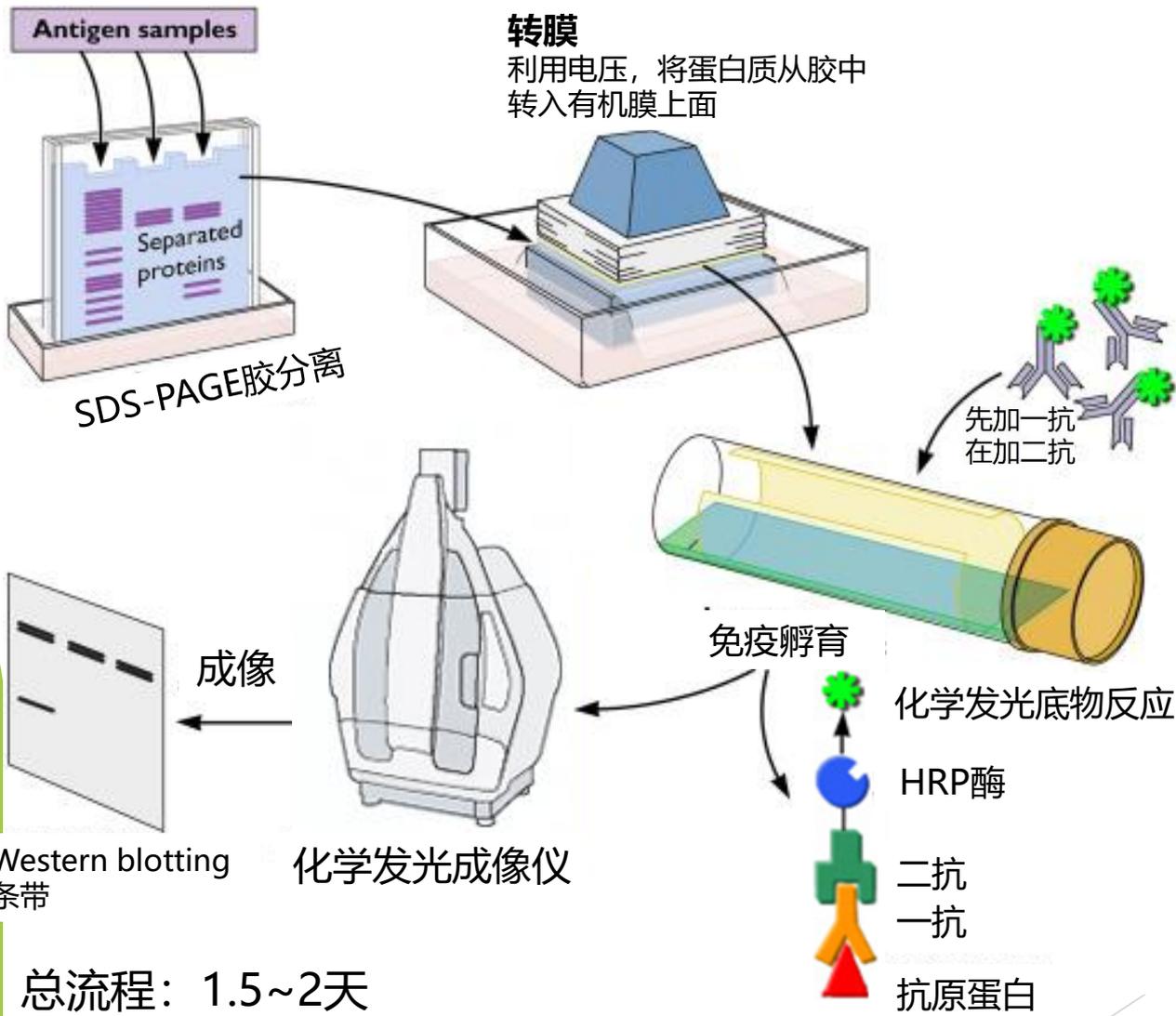
比如兔抗鼠抗体

PVDF膜	有机疏水膜， 甲醇预处理， 吸附性强	0.20微米孔径 (<20K Da) 0.45微米孔径
Nitrocellulose (硝化纤维素)膜	水溶性膜，无 需预处理，吸 附性略差	0.20微米孔径 (<20K Da) 0.45微米孔径

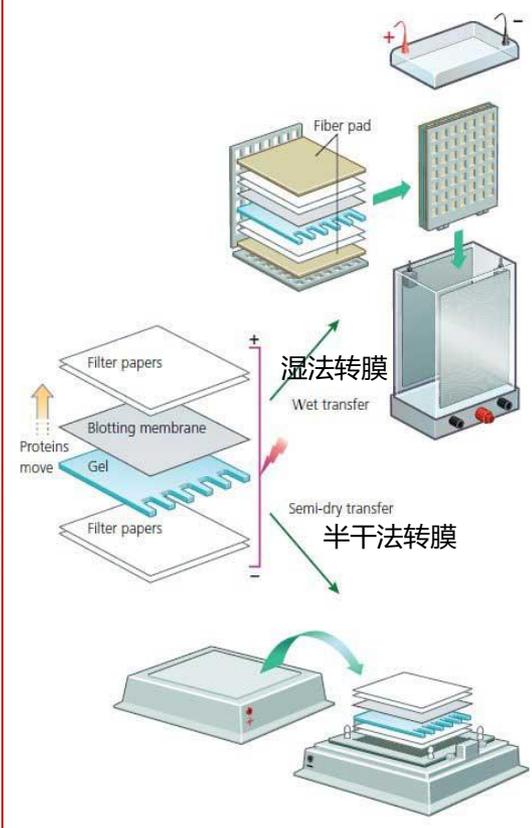
Western blot胶片



抗体应用：Western Blotting 操作步骤



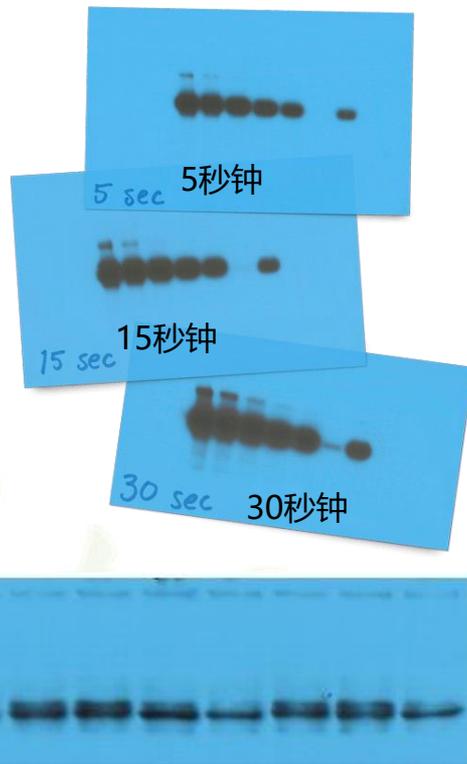
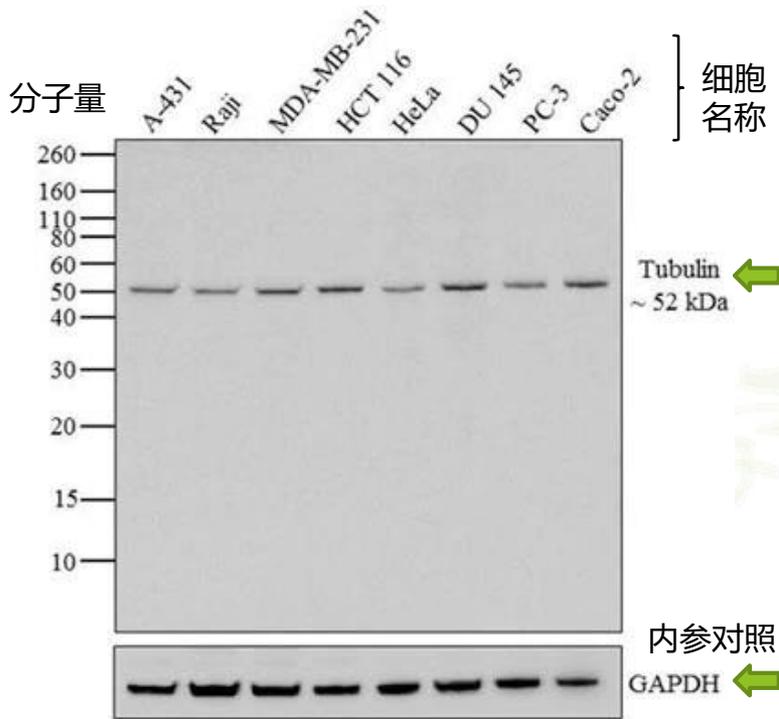
转膜方法



总流程：1.5~2天

抗体应用：Western Blotting应用举例

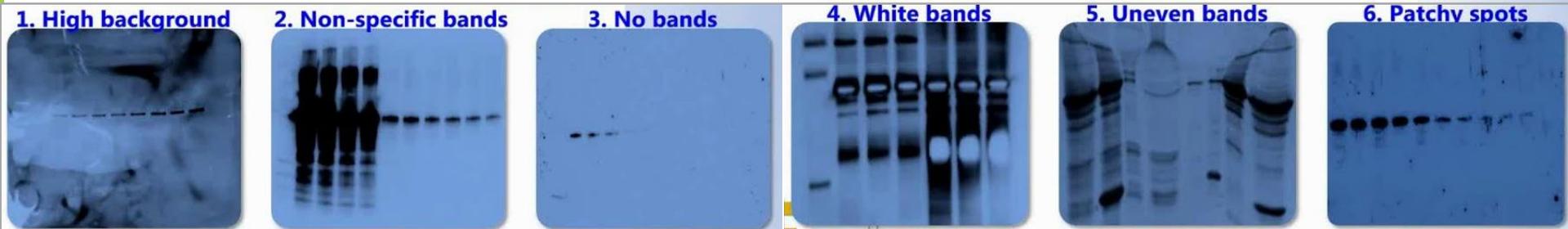
举例：Western blotting 检测不同细胞系中tubulin的表达量



调节曝光时间
增强条带信号
强度

根据条带所
处的分子量
大小、位置
分析鉴定。

常见问题



抗体应用：Western Blotting 显影新技术

Bio-Rad ChemiDoc

高灵敏冷冻 CCD 相机直接对化学发光条带成像，不需要洗胶片。

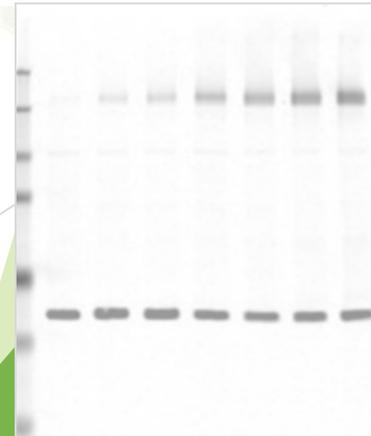
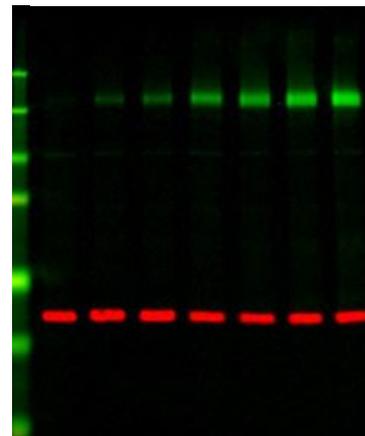
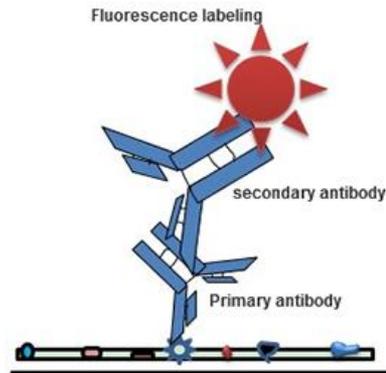


Li-Cor近红外荧光扫描仪



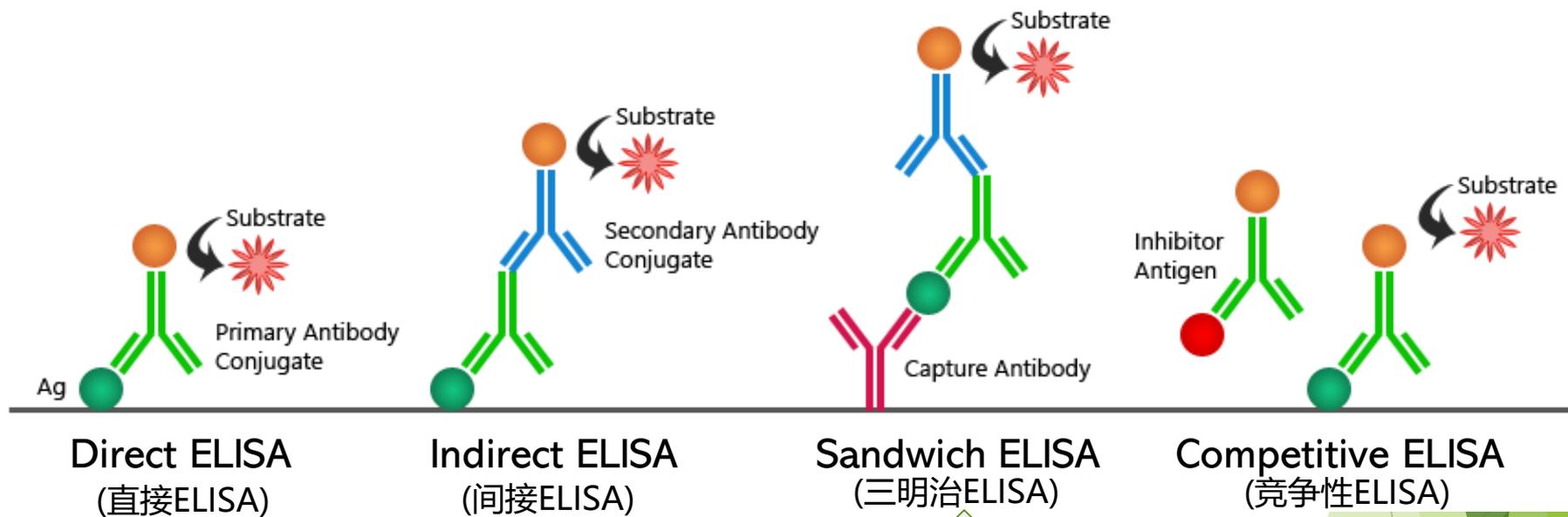
近红外荧光，低背景干扰，非常高的灵敏度。

荧光信号可直接转换为黑白信号



抗体应用：Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA也是蛋白质的检查手段，比western blotting法要快、要准确。在化验实验室应用较多。

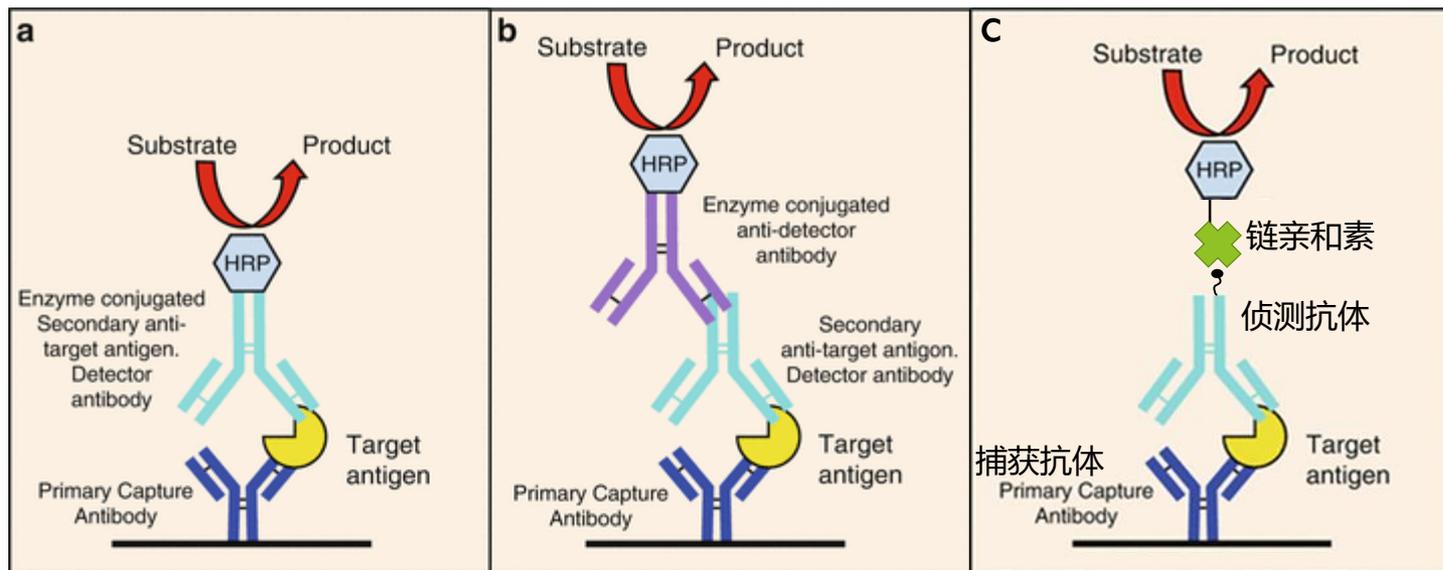


最标准的
ELISA应用方式

- 应用最广泛
- 检测限低
- 重复性好
- 抗干扰强

抗体应用：Sandwich ELISA

Sandwich ELISA 检测方式



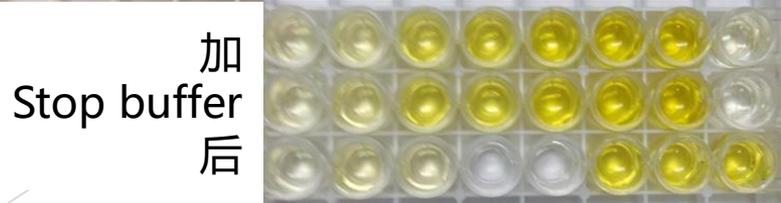
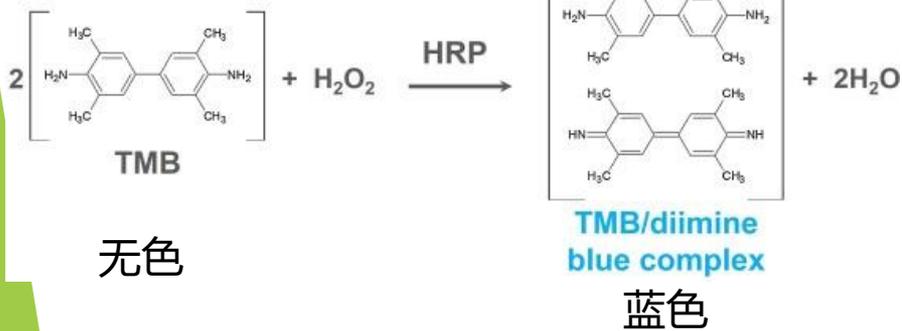
标准Sandwich

Sandwich+indirect

Sandwich+Streptavidin

Sandwich
结构

显色反应



抗体应用：Sandwich ELISA



R&D公司的ELISA试剂盒为例 Human VEGF DuoSet ELISA

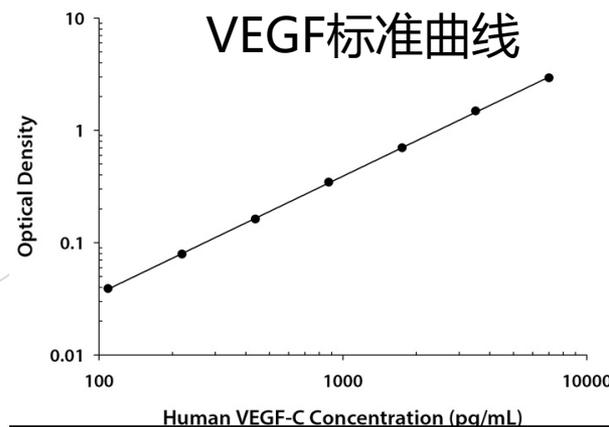
- Capture Antibody
- Detection Antibody
- Recombinant Standard
- Streptavidin-HRP

辅助材料

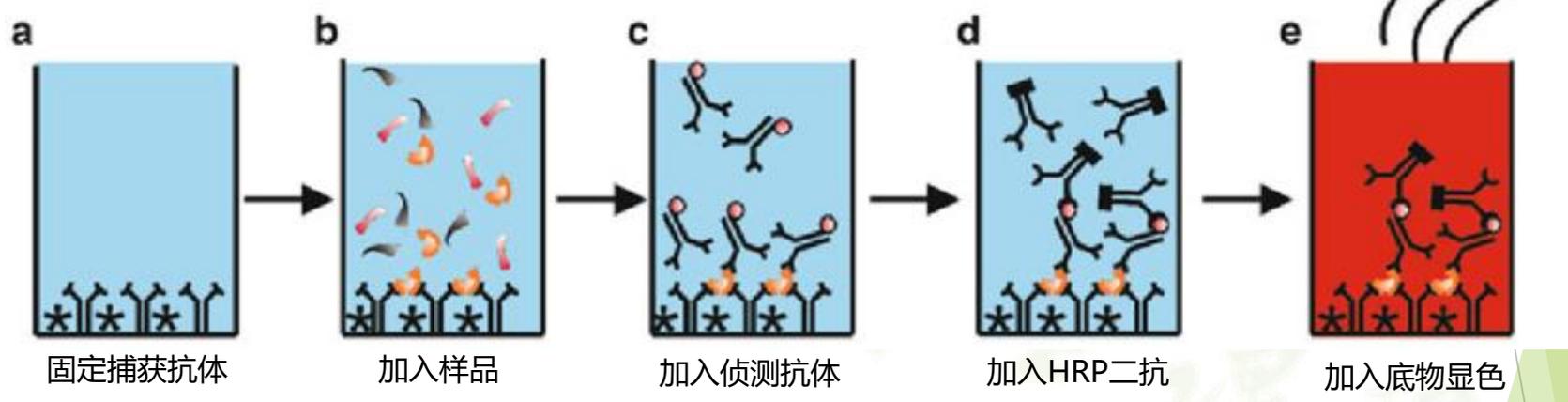
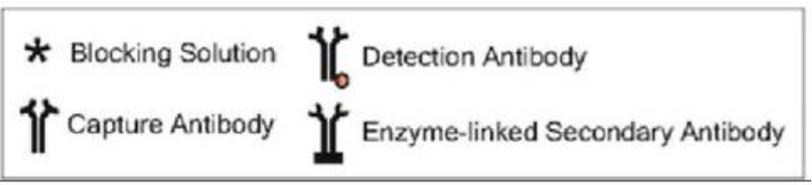
- 可拆卸96孔板
- TMB酶底物
- Stop solution (2M H₂SO₄)
- 缓冲液



可拆卸抗体吸附板



抗体应用：Sandwich ELISA操作步骤

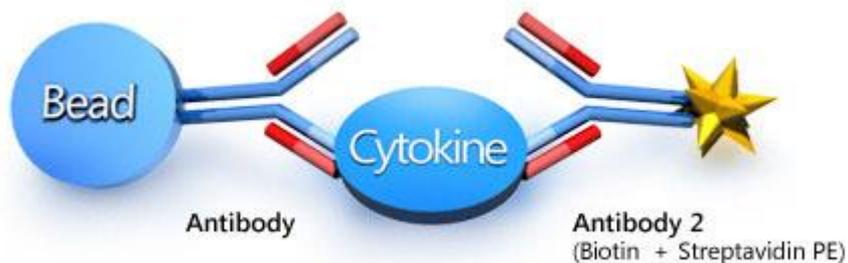


总流程：
5~6小时

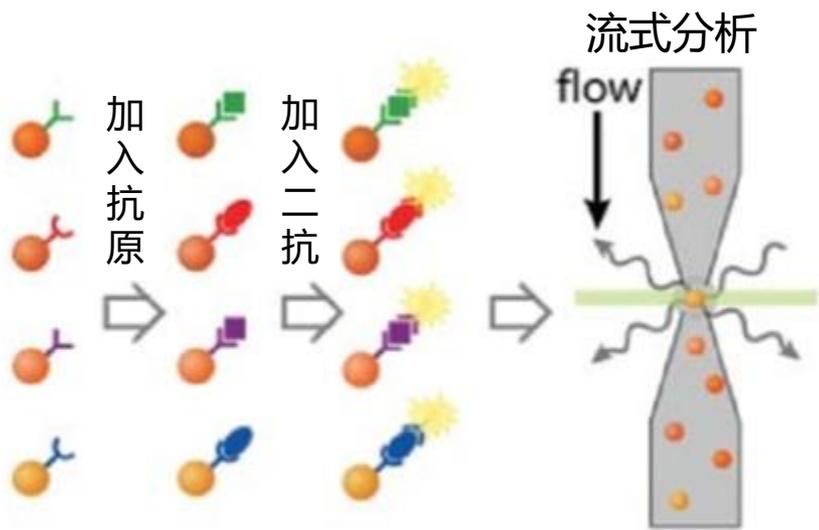


抗体应用：Bead based Immunoassay (ELISA类似)

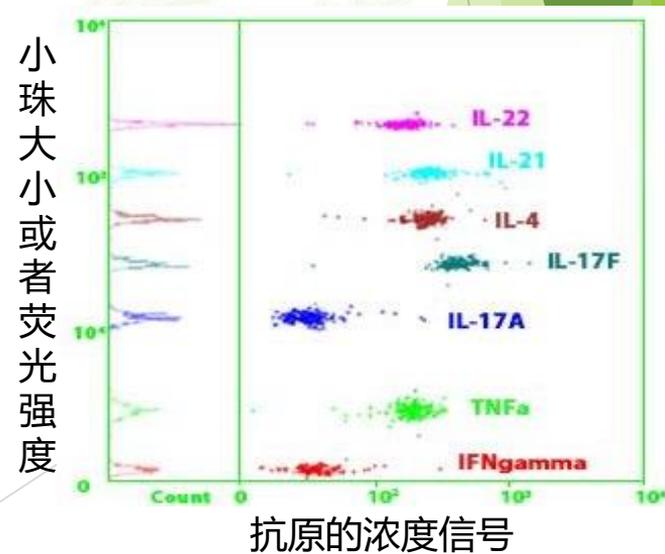
可以高通量检测几十种抗原 (常用于cytokine的检测)



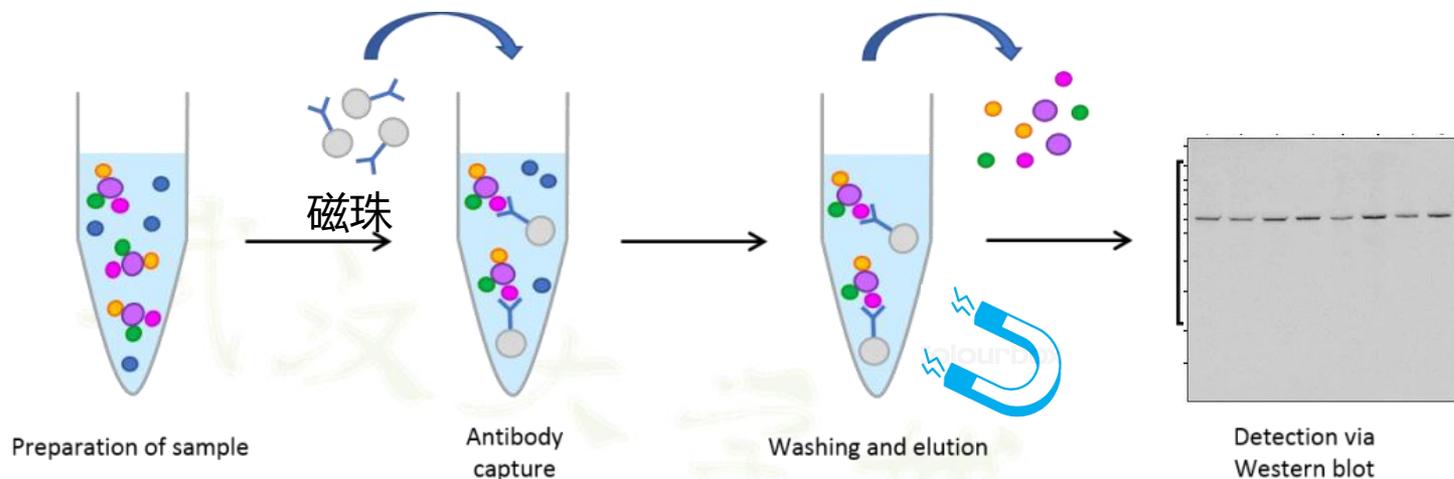
检测步骤:



结果显示方式:

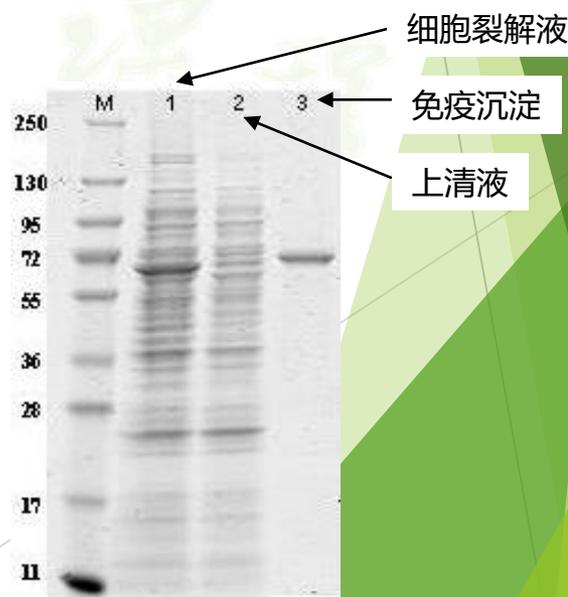
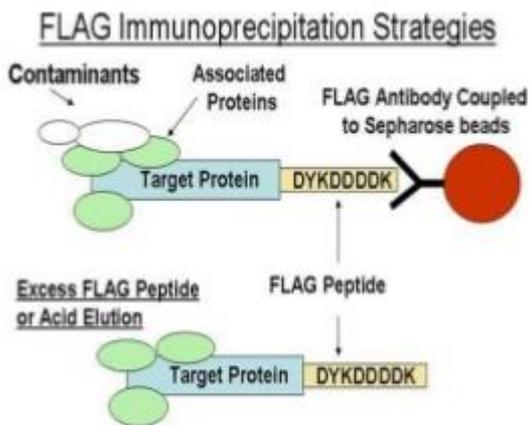


抗体应用：免疫共沉淀 Immunoprecipitation

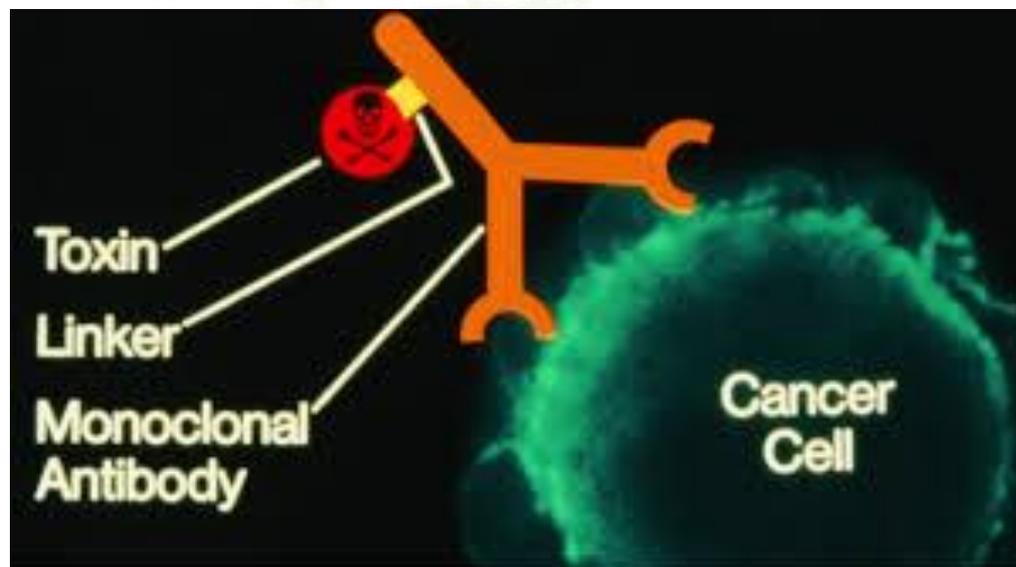


免疫共沉淀特别适用于当抗体特异性差，检测不灵敏时；或者目标蛋白含量非常低，需要富集后检测时。

Flag tag和免疫共沉淀



第三节：抗体作为药物的应用方式



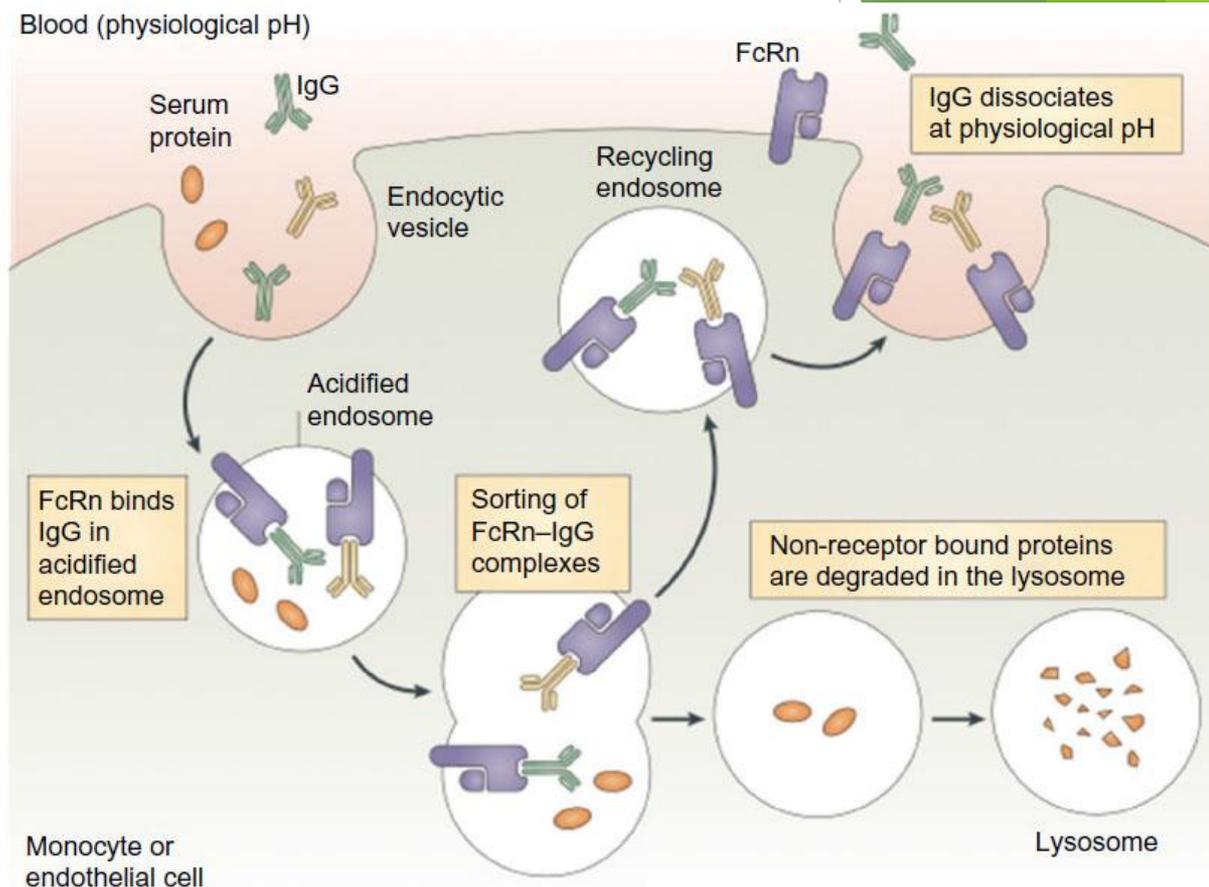
抗体的药动学优势

Fc与抗体的血中长循环，以及抗体的组织穿透性有很大关系。

- 抗体和白蛋白都可以和FcRn结合，实现再回收。
- 人抗体 (IgG) 血中半衰期21天
- 小鼠抗体 (IgG1) 血中半衰期6-8天
- 白蛋白血中循环半衰期为20天
- 鼠源抗体在人体半衰期1天
- 普通大分子量蛋白半衰期几个小时

抗体的长效循环优势可以大大降低给药频率。一般每星期甚至每月注射一次。

FcRn的抗体回收机制



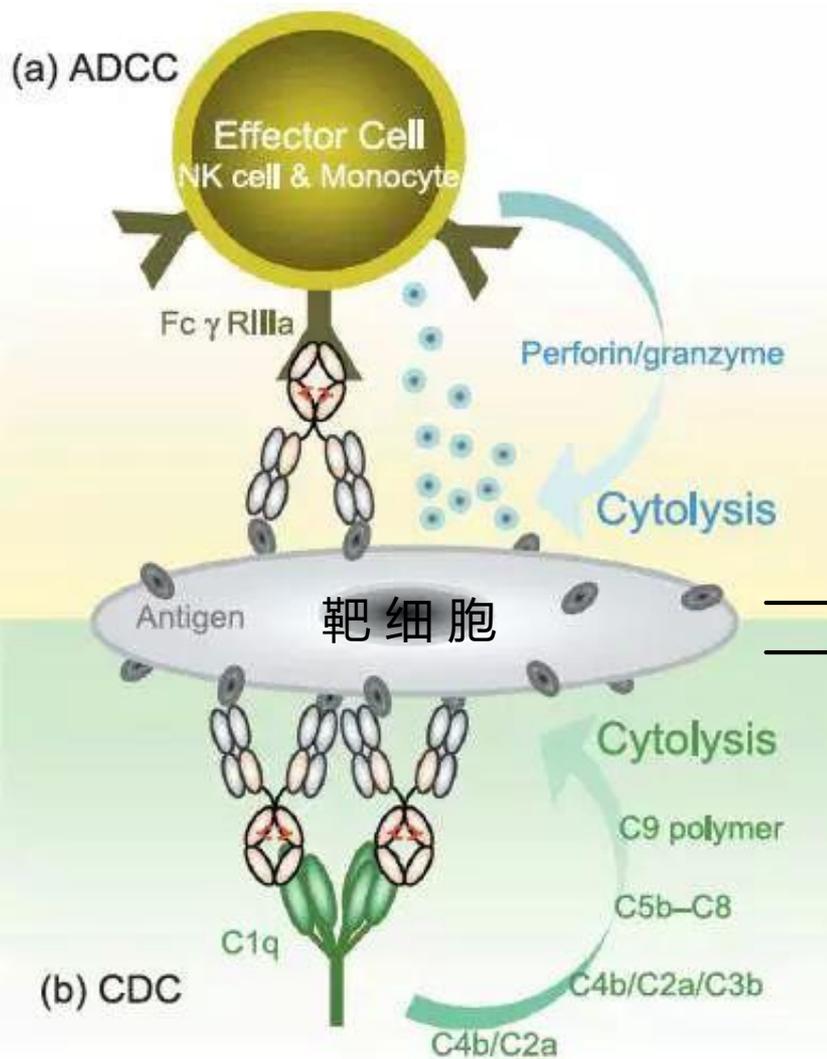
Nature Reviews Immunology, 2007, 7, 715-725

由于抗体与的结合是敏感型的形式，抗体通过胞饮作用进入细胞，在酸性的内涵体中，抗体与结合，介导抗体回到细胞外，在胞外中性条件下，与解离。这样避免了其他血液中蛋白通过胞饮作用进入细胞内被溶酶体降解的命运，从而达到长效目的，半衰期长达几周。

ADCC效应和补体(CDC)效应

ADCC: Antibody-dependent cellular cytotoxicity

效应细胞的Fc受体与IgG的Fc区域结合，效应细胞就会释放细胞因子（如IFN- γ ）和细胞毒性颗粒，包括穿孔素和颗粒酶，进入靶细胞触发细胞凋亡。

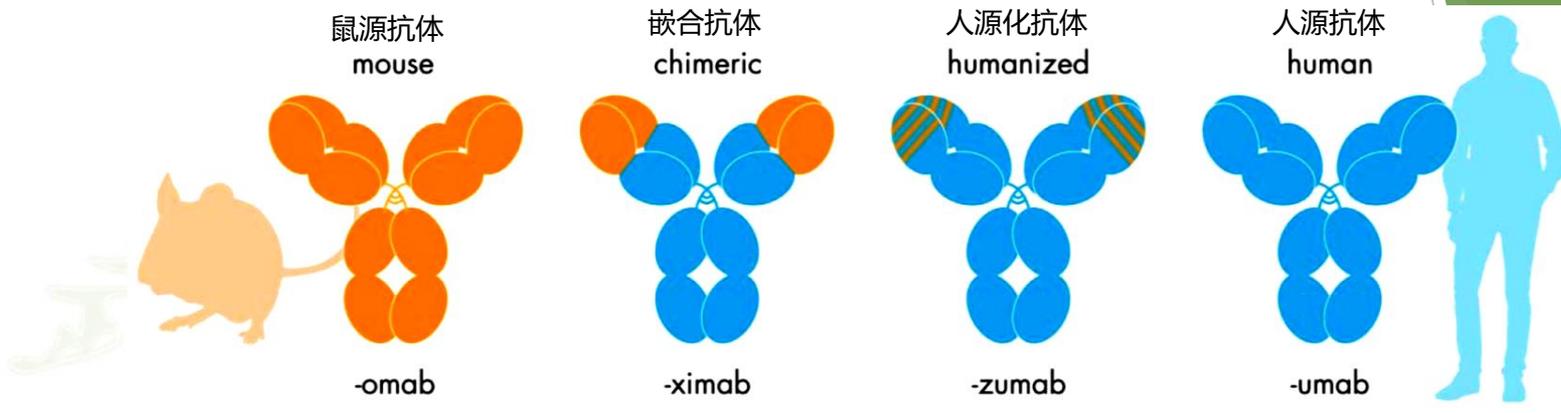


靶细胞溶解

CDC: Complement-dependent cytotoxicity

C1q结合抗体Fc区域激活补体途径，这个生化途径使细胞膜形成一10nm左右的“孔”，导致目标细胞因为渗透压无法维持而肿胀破裂。

抗体药物：抗体人源化



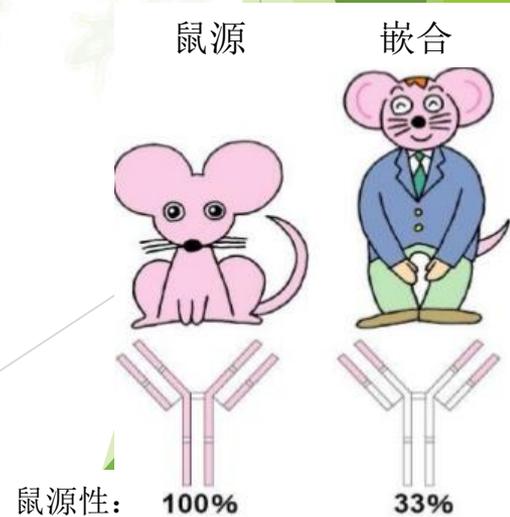
HAMA反应：人抗鼠抗体反应 Human anti-mouse antibody (HAMA)

第一个鼠源抗体muromonab在1980s上市使用，医生发现有50%的病人后期对抗体治疗没有反应。

异源性抗体的副作用：

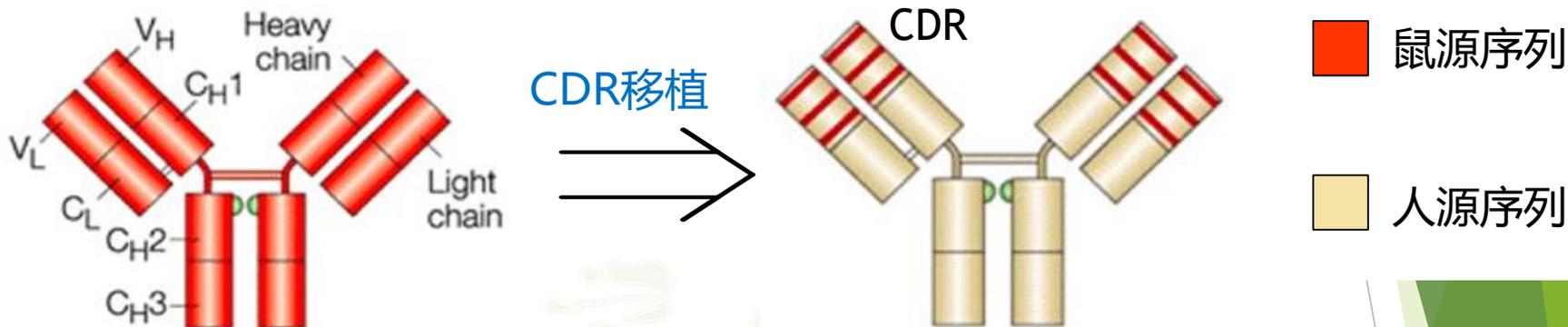
- 抗体的快速清除
- 更弱的肿瘤穿透性
- 超敏反应，比如HAMA反应

Genetch公司于1997年开发的人鼠嵌合抗体Rituximab才部分解决了这个问题。**全人源抗体是未来发展方向。**



抗体药物：抗体人源化方法

CDR移植技术



CDR移植抗体是第二代人源化抗体，CDR移植抗体是研究者在嵌合抗体的基础上进一步用人源框架区（FR区）替代鼠源框架区，仅保留了3个鼠源性CDR，其他全部为人源结构，人源性可达90%以上。

抗体人源化序列：

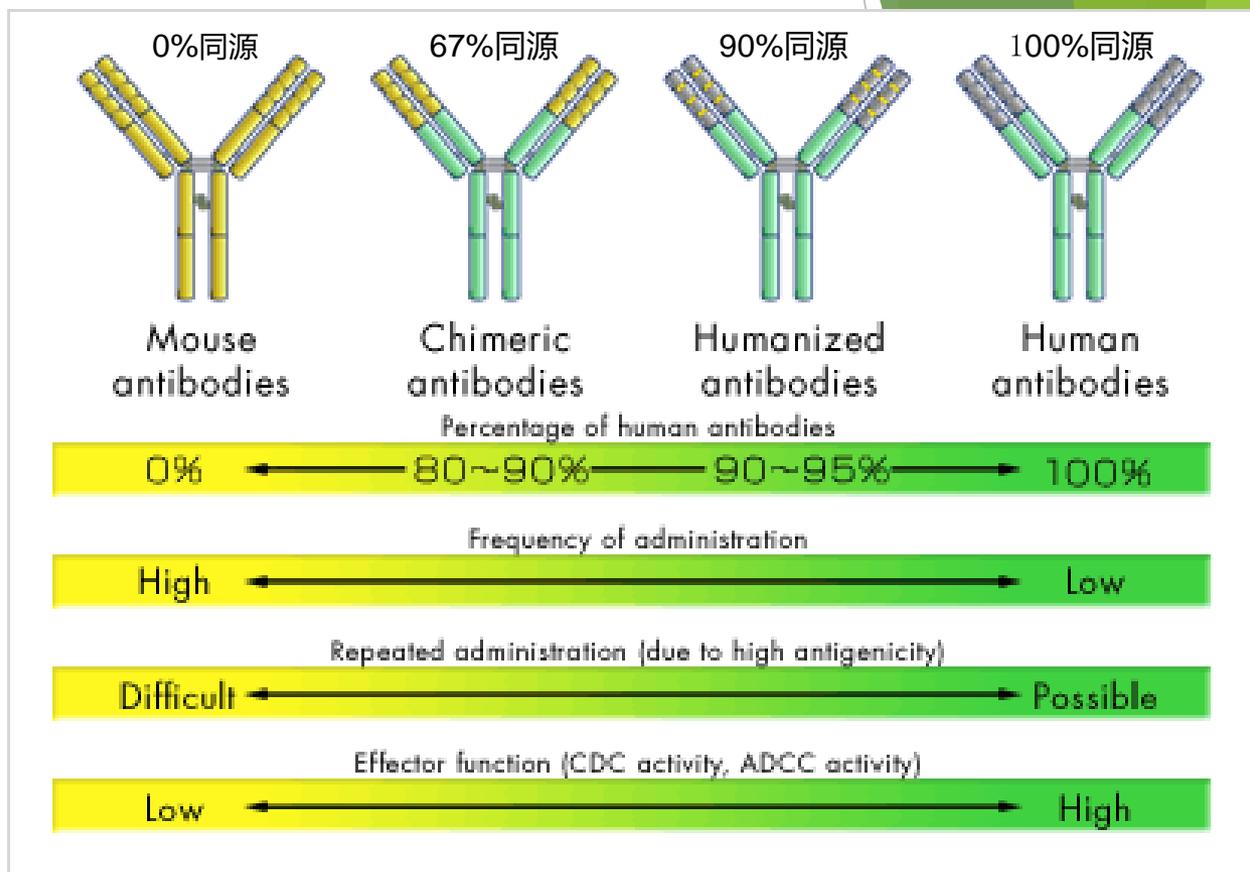
V _H sequences	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
mouse	EVQLEESGGGLVPGGSLKLSCAASGFAFS	SYDMS	WVRQIPEKRLWVA	KVSSGGGSTYYLDTVQG	RFTISRDNAKNTLYLQSSLSNSED TAMYCAR	HNYGSFAY	WGQGTLVTVSA
human	Q---VQ--AEVR---S-VRV--K---GT--		---A-GQ-F--LG		KL--TV-ESTA-VYME-RN-R-D---V----		-----S
Chimeric	Q---VQ--AEVR---S-VRV--K---GT--		---A-GQ-F--LG		KL--TV-ESTA-VYME-RN-R-D---V----		-----S

由于FR上面的个别氨基酸有可能也参与抗原结合，CDR移植后的人源化抗体有可能抗原结合能力会变弱。

抗体药物：人源化的重要性

抗体人源化对活性的影响。

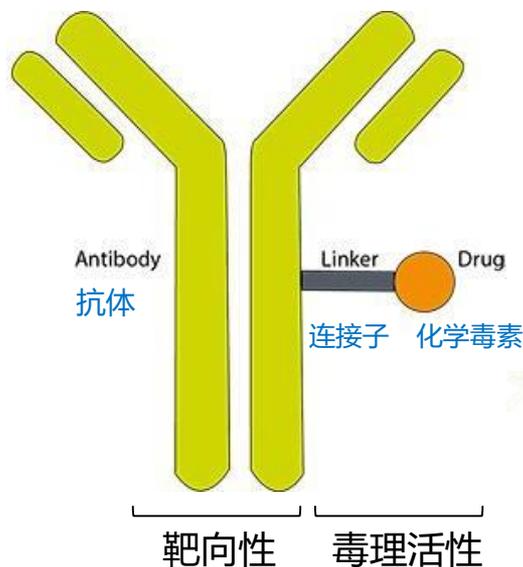
- 人源化后抗体易和人的FcRn受体结合，提高回收，降低清除率，延长血中半衰期，降低给药次数；
- 降低产生免疫反应的几率，更容易重复给药；
- 抗体的Fc效应增强，包括补体效应和细胞毒效应，生理活性更强



鼠源抗体的Fc和人的Fc受体结合差，鼠源抗体在人体内半衰期仅为12小时左右，而鼠源抗体在小鼠体内半衰期可达3天以上。

人的抗体，即人源抗体，和小鼠的Fc受体有一定结合能力，在小鼠内半衰期可达2天以上，但是仍小于在人体内的半衰期，人源抗体在人体内血中半衰期可达一个星期以上。

抗体药物：抗体-药物偶联技术



由重组单克隆抗体 (mAb) 通过合成接头共价结合细胞毒性化学物质 (称为弹头) 组成, 不仅具有高度细胞毒性的小分子药物的抗肿瘤效力, 也结合了mAb的高选择性, 稳定性和有利的药代动力学特征。

抗体-药物偶联物 (ADC) 有三个重要部件组成: **单克隆抗体**、**连接子**和**化学毒素弹头**。

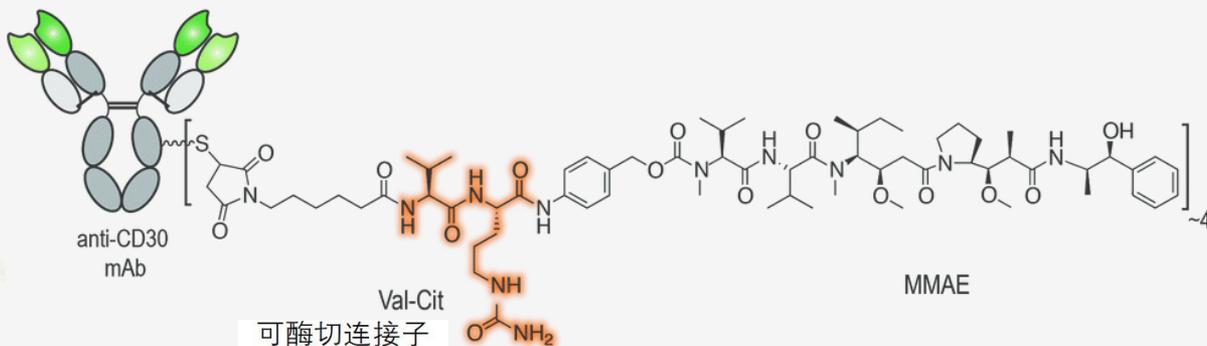
- 抗体主要提供高度靶向性, 并利用其Fc域提供一个长循环的药代动力学优势。
- 连接子链接药物, 决定链接的选择性, 化学药物释放方式
- 化学毒素是对抗体的杀细胞效果的增强, 往往选择强毒性化合物, 起主要的杀癌细胞效果。

附表. FDA已批准的抗体药物偶联物, 更多的在临床试验

Name	Ingredients	Company	Target	Indications	Approval date
Mylotarg	Gemtuzumab Ozogamicin	Pfizer	CD33	Acute myeloid leukemia	May 2000 September 2017
Adcetris	Brentuximab Vedotin	Seattle Genetics	CD30	Hodgkin's Lymphoma, anaplastic large cell lymphoma	August 2011
Kadcyla	Ado-Trastuzumab Emstansine	Roche	HER-2	Breast cancer	February 2013
Besponsa	Inotuzumab Ozogamicin	Pfizer	CD-22	Acute lymphoblastic leukemia	August 2017

抗体药物：抗体-药物偶联技术

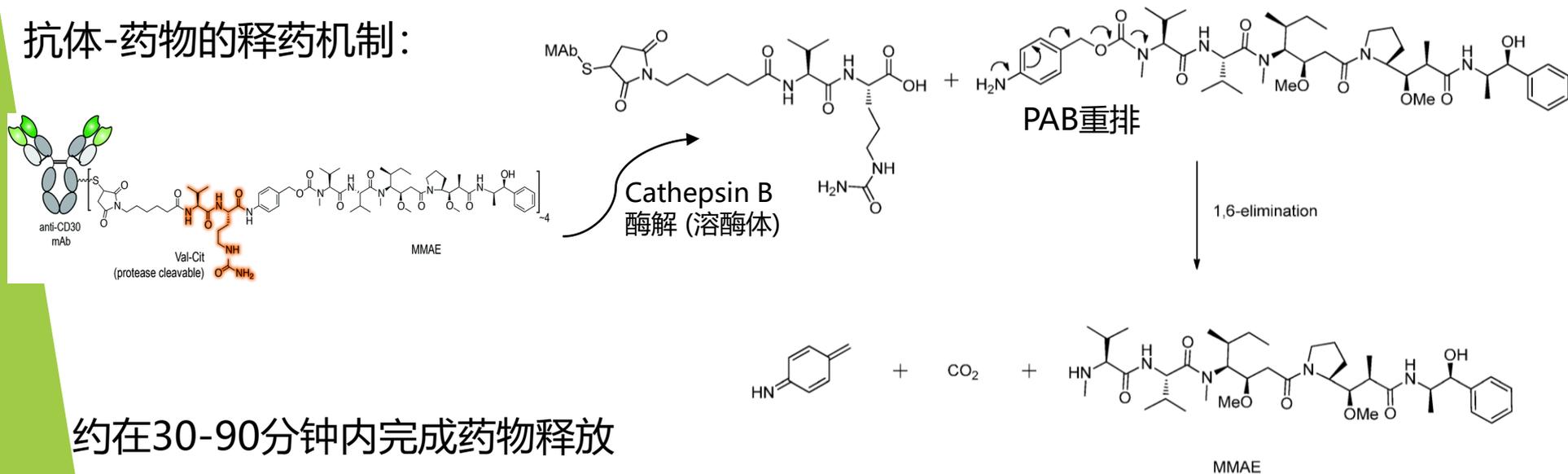
ADC主要通过化学毒素的毒性来杀死肿瘤细胞，所以药物释放非常关键。



SGN-35 , Brentuximab Vedotin (trade name Adcetris, Seattle Genetics)
参考文献: *Chem. Sci.*, 2016, 7, 2954-2963

150 kDa分子量
16个双硫键
多位点偶联
分子热稳定性
连接子特异性

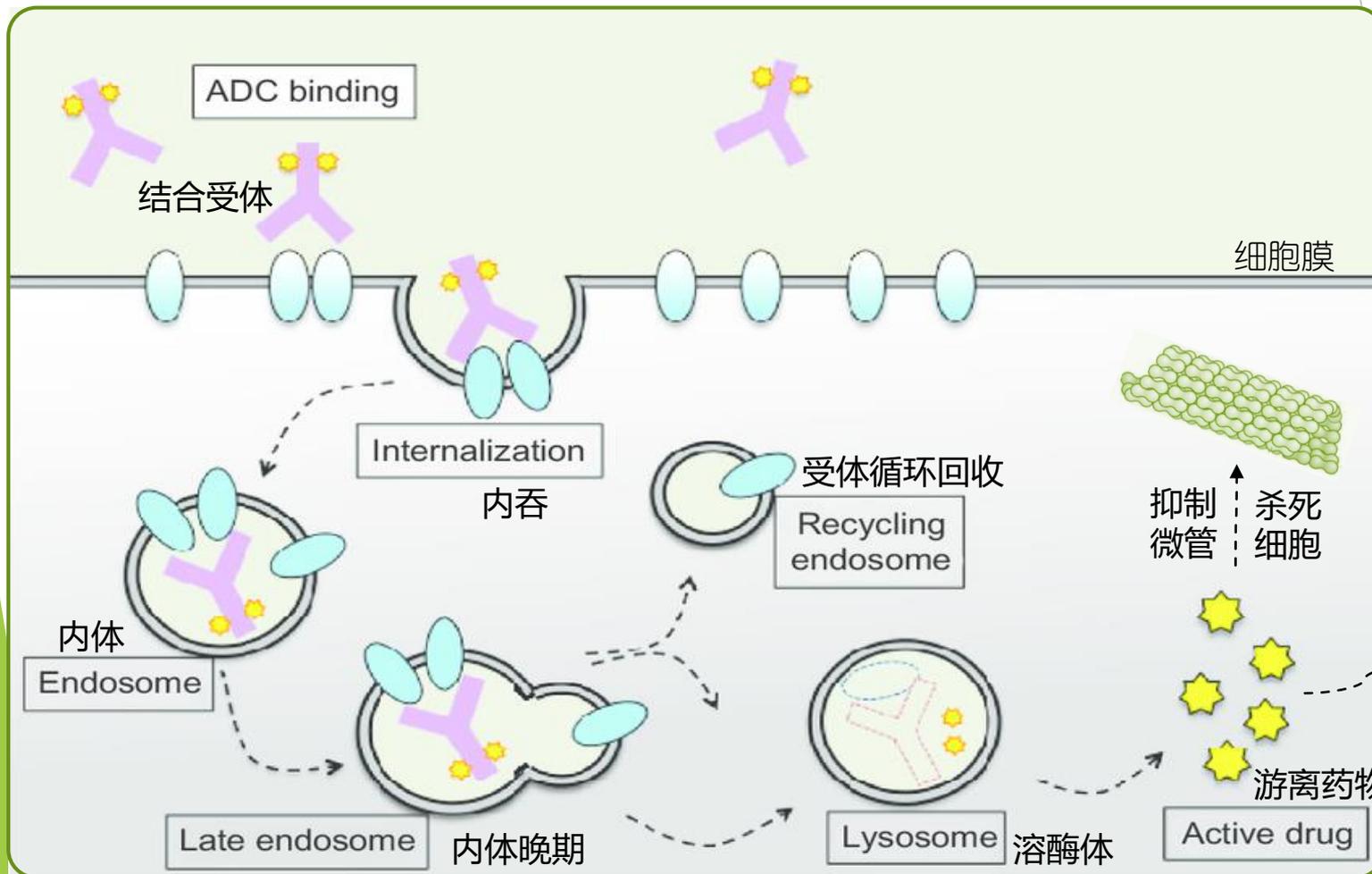
抗体-药物的释药机制:



约在30-90分钟内完成药物释放

抗体药物：抗体-药物偶联物治疗机制

抗体-药物偶联物在靶细胞内溶酶体帮助下释放药物，杀死靶细胞



扩散到其它细胞

抑制微管
杀死细胞

游离药物

Active drug

Lysosome 溶酶体

内体晚期

Late endosome

内体
Endosome

受体循环回收
Recycling endosome

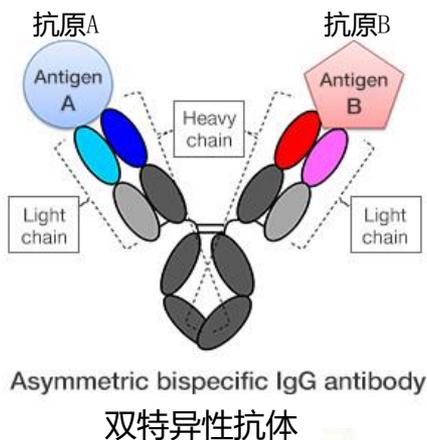
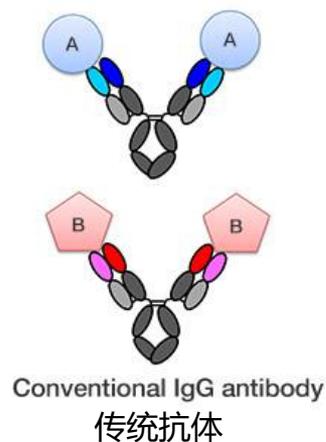
Internalization
内吞

ADC binding

结合受体

细胞膜

抗体药物：双特异性抗体

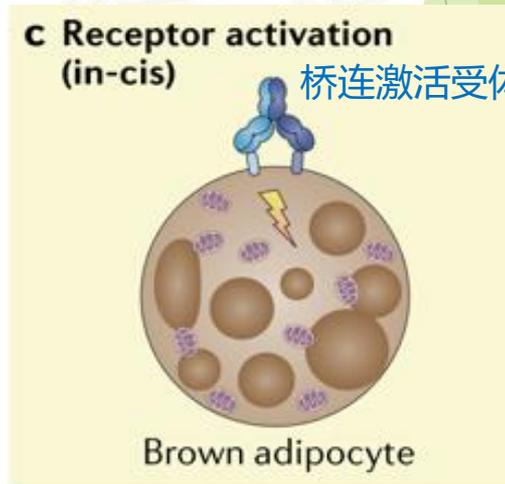
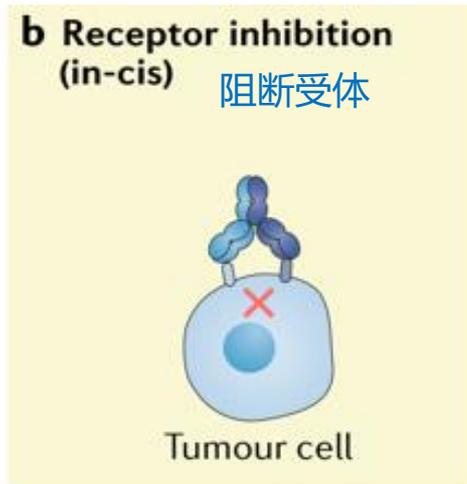
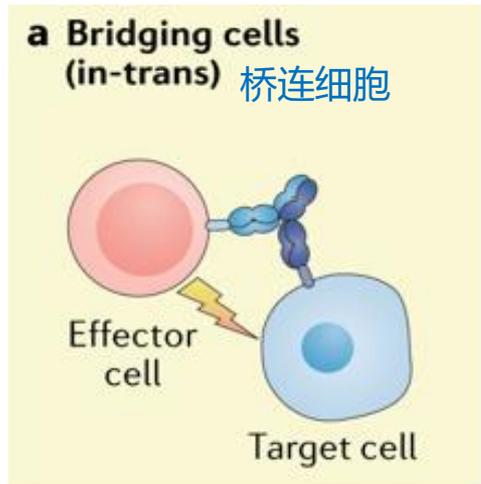


双特异性抗体是指能同时特异性结合两种抗原或两个表位的抗体分子。

两种基本作用模式：

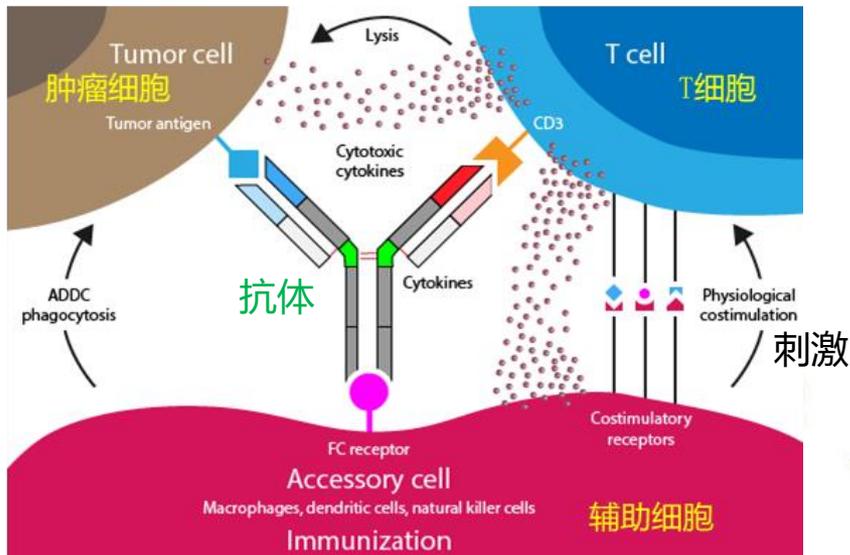
- (1) 同时结合两个不同的抗原表位
- (2) 同时靶向肿瘤细胞与效应细胞

双特异性抗体的应用场景：



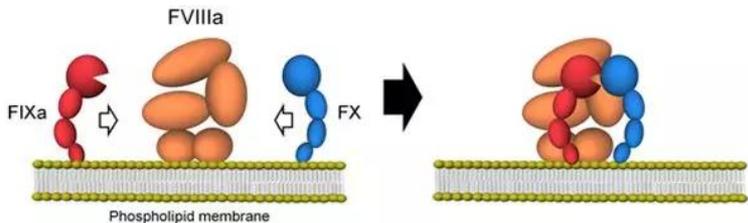
抗体药物：双特异性抗体举例

Catumaxomab的细胞桥连效应

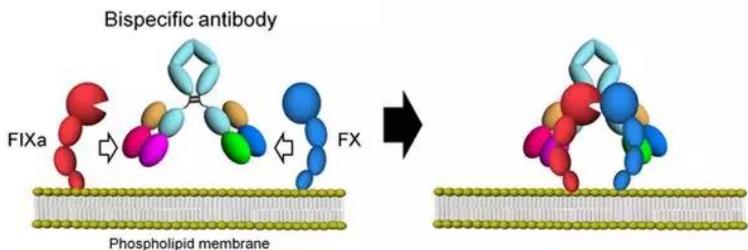


- **Catumaxomab** 是 bispecific T-cell engaging (BiTE) antibody, 一端结合肿瘤抗原EpCAM, , 另一端也结合T细胞的CD3, Fc结合CD16A (效应细胞表面Fc受体), 增强ADCC效应。

Emicizumab的受体桥连效应



凝血因子VIIIa同时结合FIXa和FX激活, 激活凝血途径

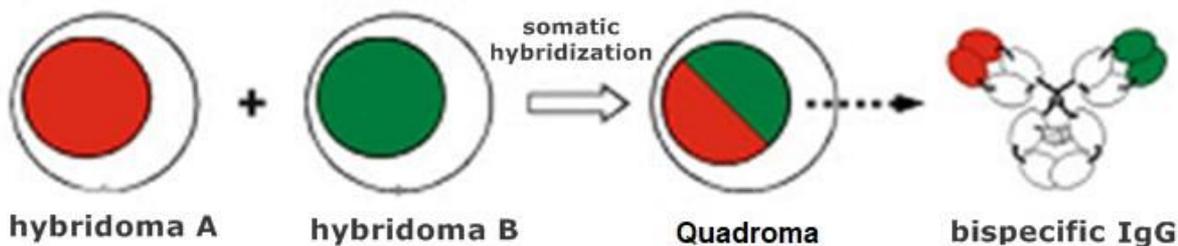


双特异性抗体Emicizumab模拟FVIIIa的功能, 实现激活凝血途径的功能。

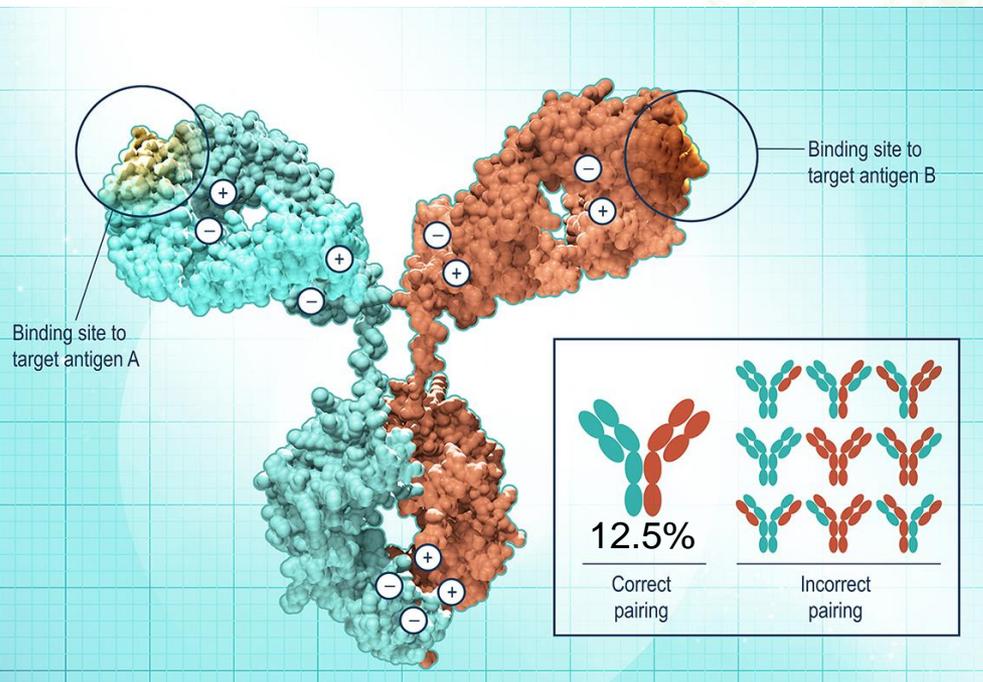
- **Emicizumab**模拟凝血因子VIIIa, 桥连FIXa和FX受体, 用于A型血友病的出血预防治疗, 年销售额10亿美元。

抗体药物：双特异性抗体构建方法

- 常规方法（Quadromas），即杂交-杂交瘤技术（Hybrid-hybridoma Technology）
四杂交瘤（Quadroma）技术诞生于1983年，融合2种杂交瘤细胞可制备双特异性抗体。



- 四杂交瘤细胞分泌的抗体组合模式

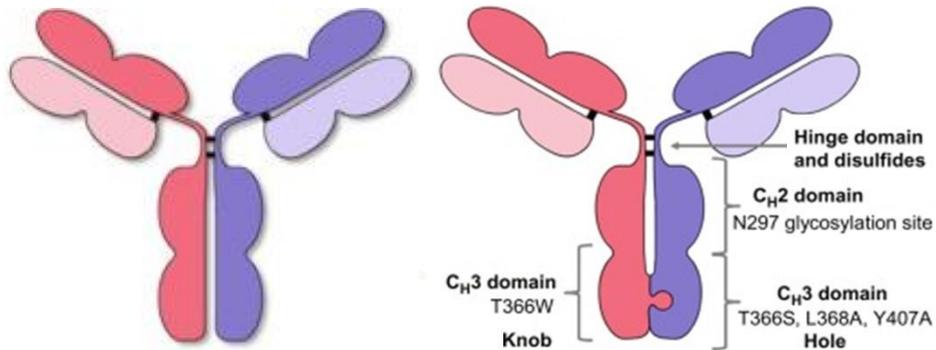


四杂交瘤细胞可以分泌生成4个抗体组件（2种轻链和两种重链），总有16种可能的组装模式。其中有6种是重复的，包括期望的双特异性抗体，所以总共有10种可能。目标抗体的总产率是12.5%（6.25%×2）。所有组装模式中仅有目标抗体有双特异性。

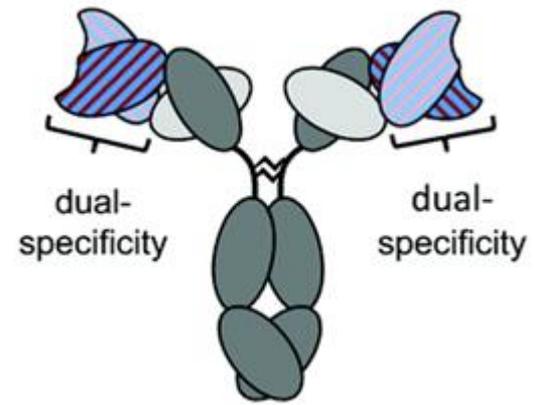
抗体药物：双特异性抗体的构建技术

新构建技术降低错配概率。

- Knob in Hole 技术

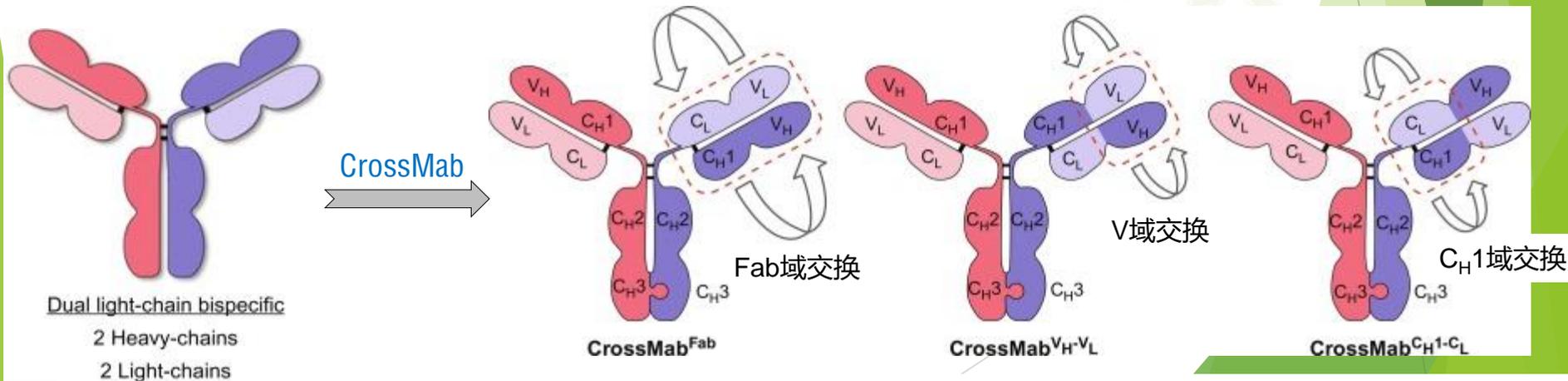


- Two-in-One 技术

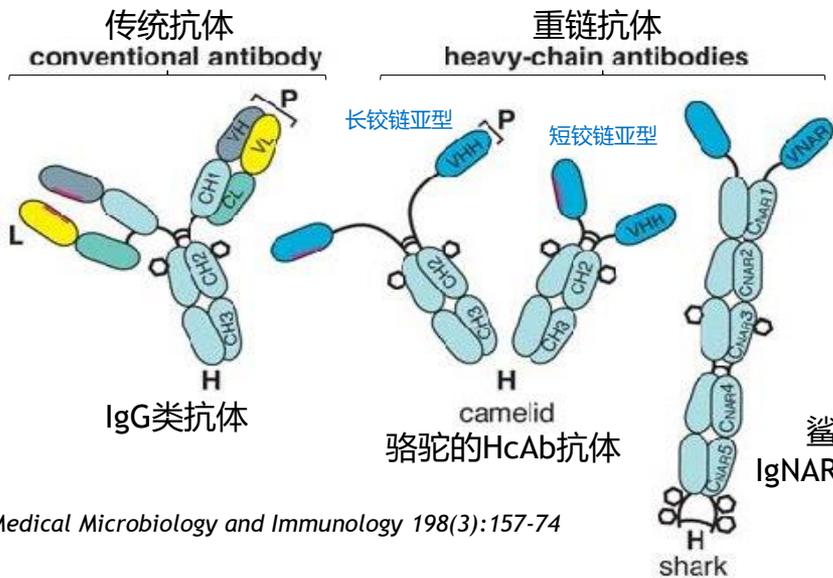


可变区同时对两个抗原都有结合能力

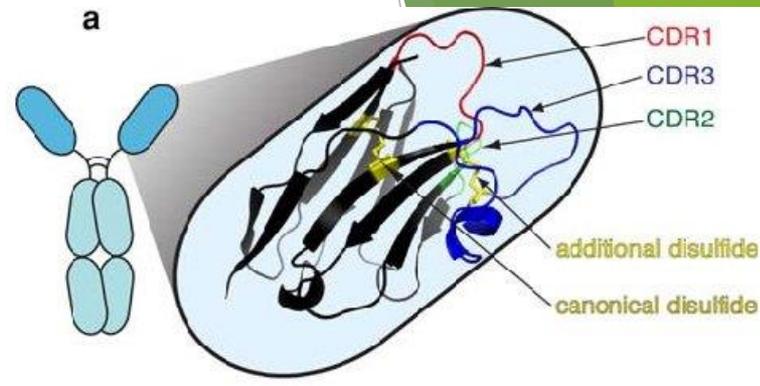
- CrossMab 技术



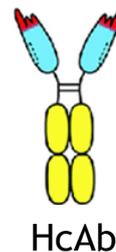
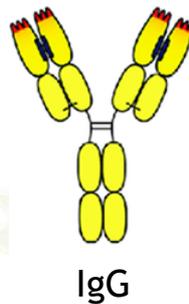
抗体药物：骆驼抗体



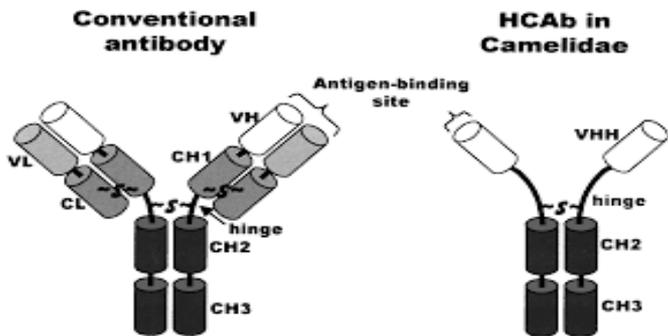
Medical Microbiology and Immunology 198(3):157-74



特色：两个CDR加一个长的CDR3

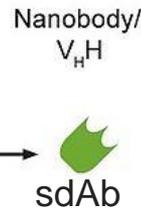
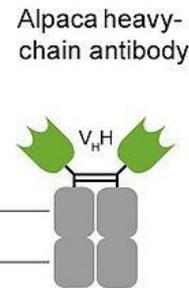
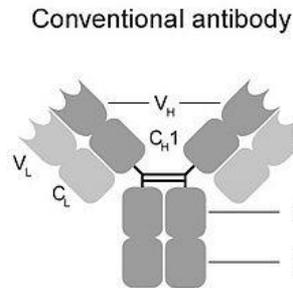


驼抗有加长的CDR3，增强抗原结合能力



×	容忍极端温度和pH值	H	✓
×	识别难识别抗原		✓
×	组织穿透能力		✓
×	生物利用度		✓

从hcAb到单域抗体 (nanobody)

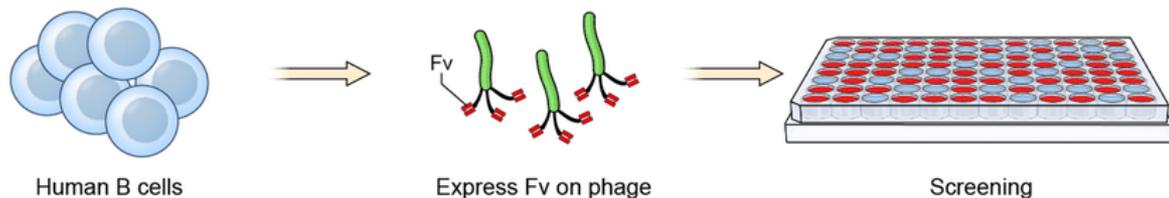


第四节：抗体的研究方法



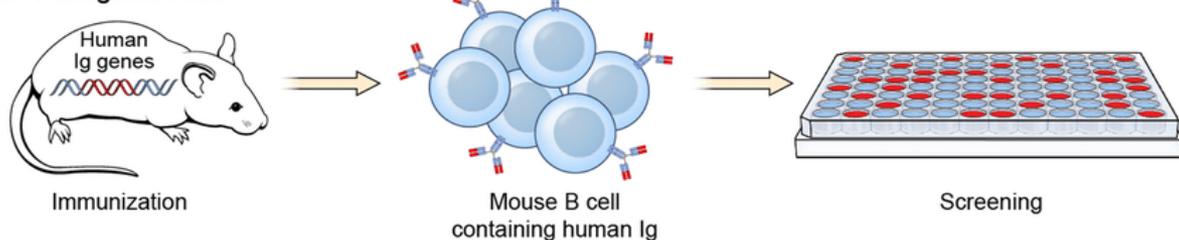
抗体的发现与筛选方法

A Phage display 噬菌体展示技术



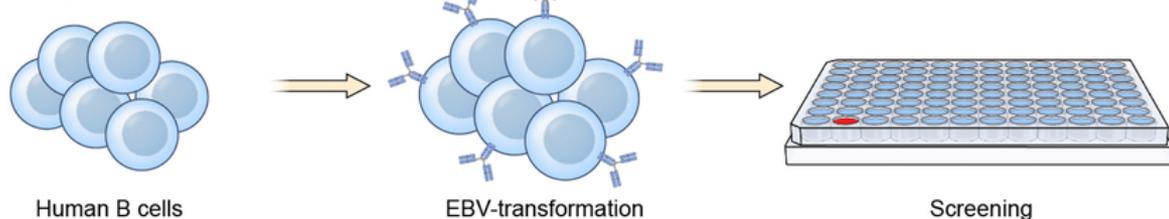
抗体库技术的门槛相对较低，筛选的抗体质量很难保证

B Transgenic mice 转基因动物技术



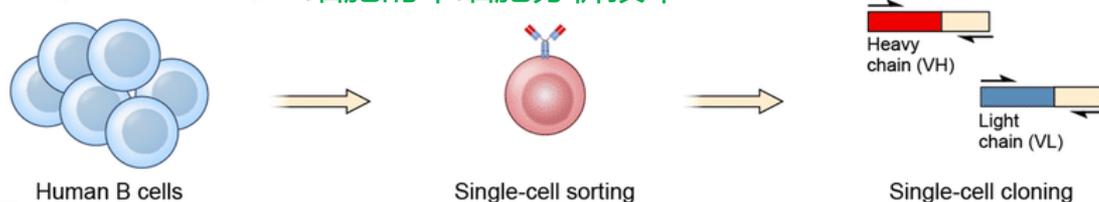
转基因动物的制备技术具有较高的技术壁垒。

C B cell immortalization B细胞增殖技术



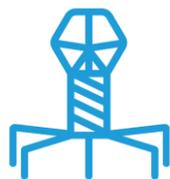
发展初级阶段

D Single B cell cloning B细胞的单细胞分析技术



发展初级阶段

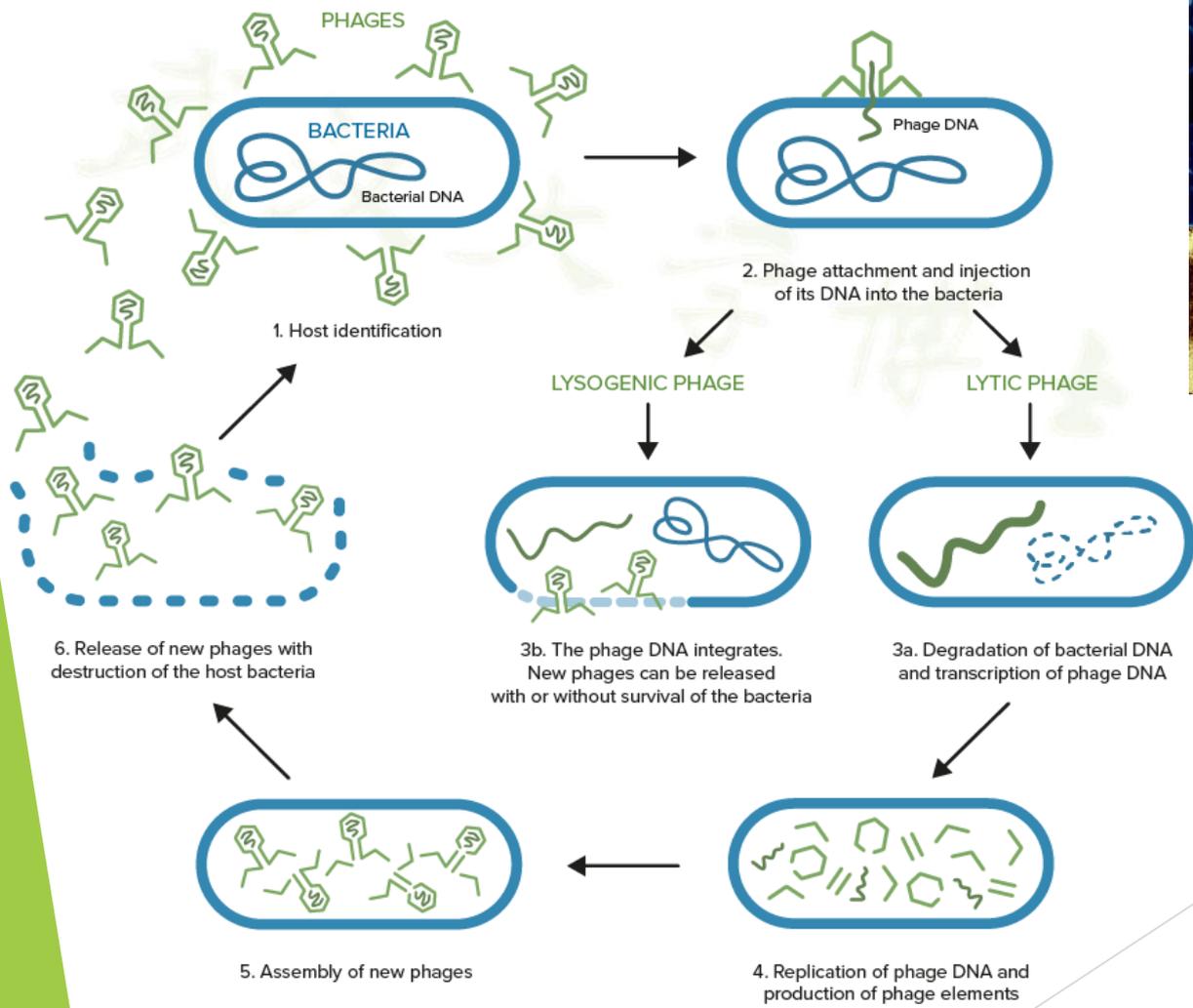
噬菌体展示技术



噬菌体

Phase Display (噬菌体展示技术)

噬菌体的生命周期



噬菌体通过5个触角接触细菌

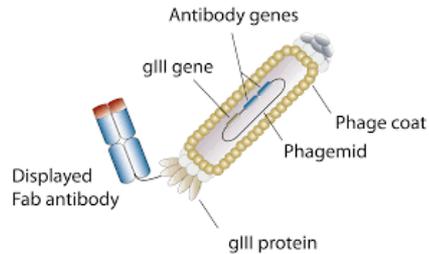
- 噬菌体是细菌的病毒，对人没有健康影响
- 噬菌体繁殖周期很短，平均30分钟
- 噬菌体个体很小 (100nm)，可有大的库容量
- 噬菌体的触角可基因重组，加入一定大小的外源蛋白

噬菌体展示流程

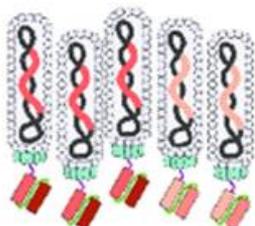
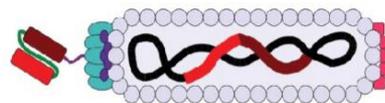
噬菌体展示和库的富集

(10^{10} - 10^{12} 个体)
原生噬菌体库

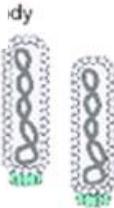
展示Fab



展示scFv



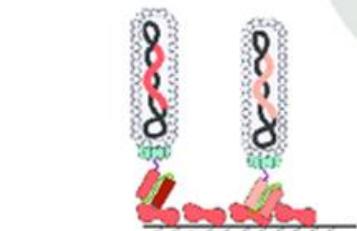
再生库



Helper phage

Panning
2-3轮
循环展示

抗原固定在容器表面作为诱饵



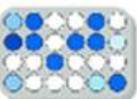
高亲和力噬菌体结合抗原并吸附在容器表面



感染细菌
放大噬菌体库



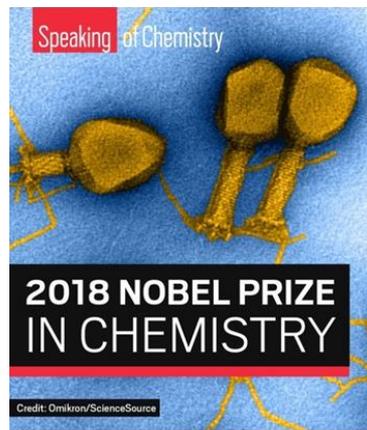
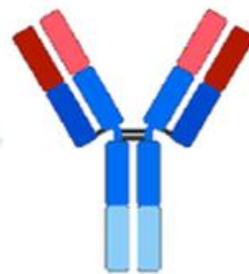
克隆挑选



克隆验证



重组

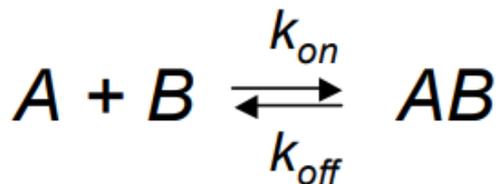


George P. Smith

2018年诺贝尔化学奖

抗体研究：Kd test

解离常数 (dissociation constant, K_D)，即抗体亲和力，它体现了抗体分子和抗原表位结合的能力。



$$[A] \cdot [B] \cdot k_{on} = [AB] \cdot k_{off}$$

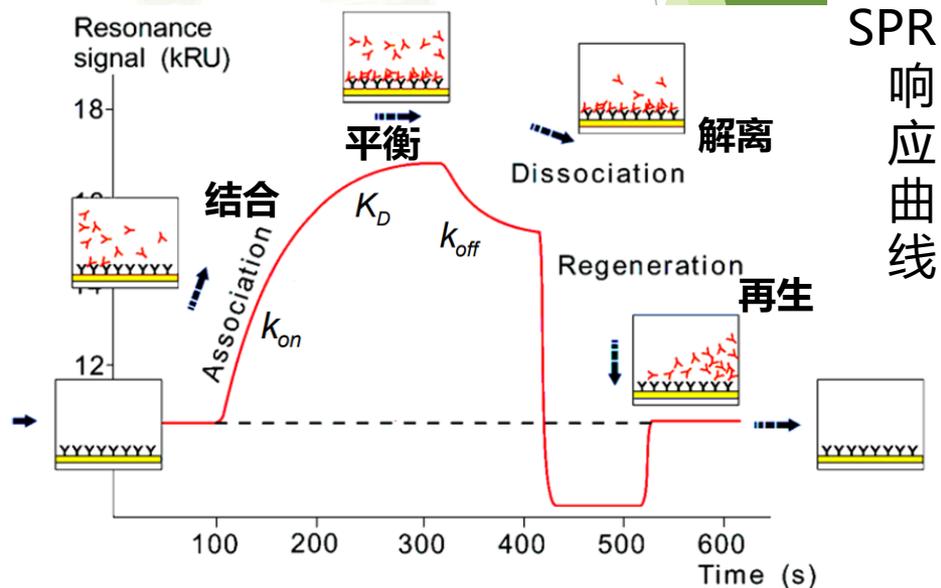
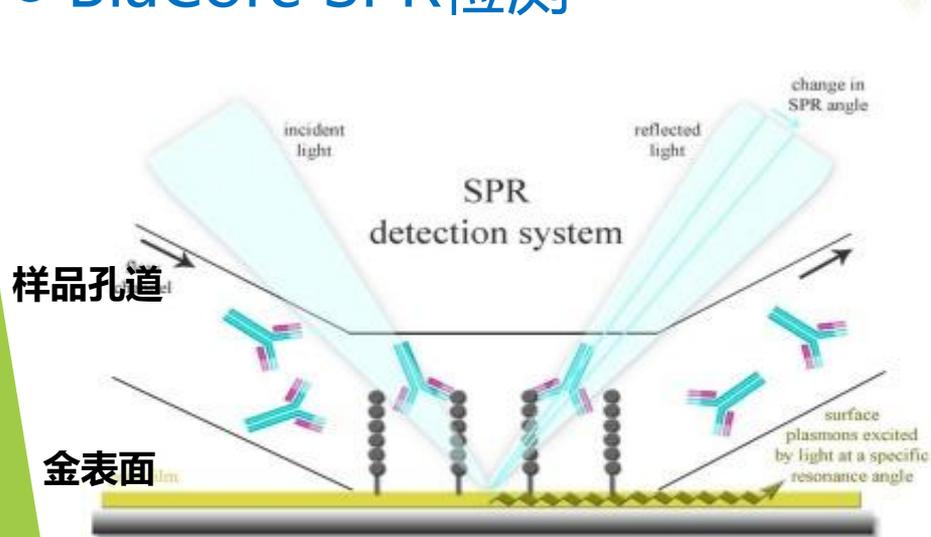
A: antigen (抗原)
B: antibody (抗体)

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

$$k_{off}: \{s^{-1}\}$$

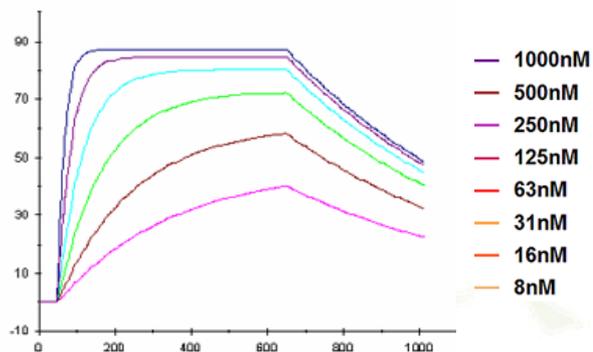
$$k_{on}: \{M^{-1} \cdot s^{-1}\}$$

● BiaCore SPR检测



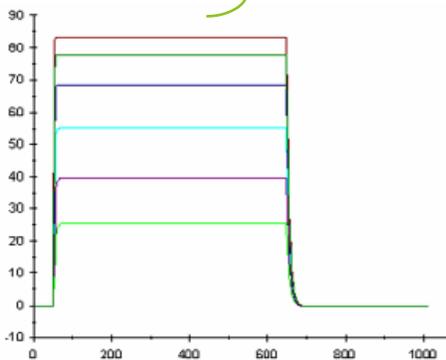
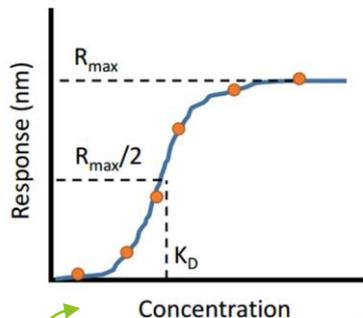
抗体研究：Kd test

● BiaCore SPR检测

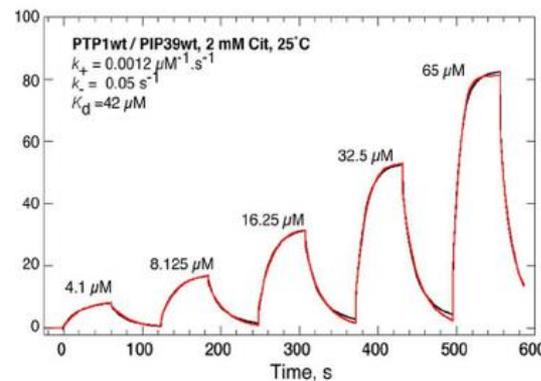


同时监测 Kinetics and affinity

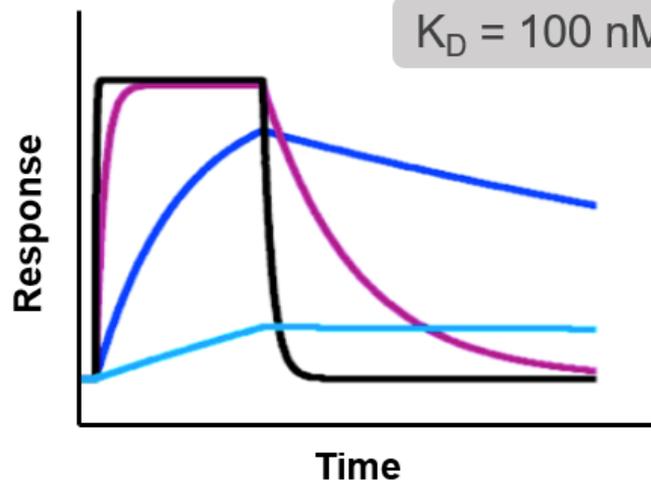
Kinetics 即 K_{on} 和 K_{off}



仅监测 affinity



连续梯度曲线



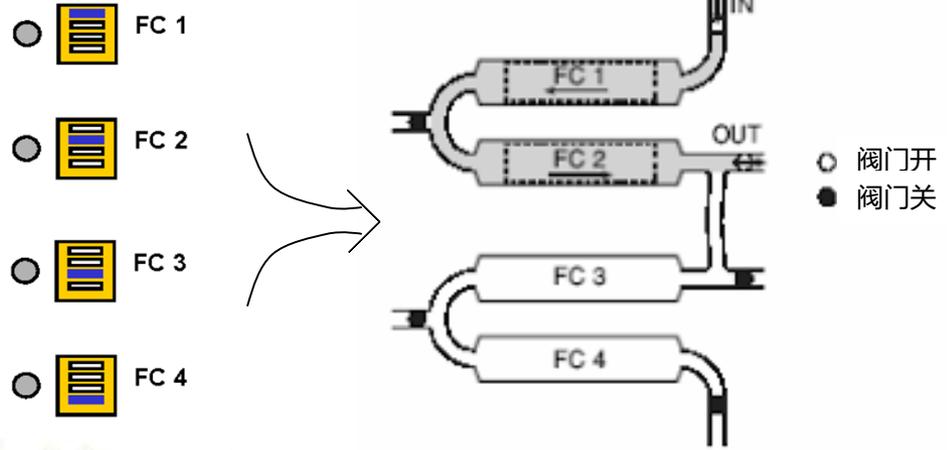
$K_{on} (M^{-1}S^{-1})$	$K_{off} (S^{-1})$
10^5	10^{-2}
10^4	10^{-3}
10^3	10^{-4}
10^2	10^{-5}

相同的 K_D 值，但不同的Kinetics。也就是说不同的 K_{on} 和 K_{off} 。 K_{on} 和 K_{off} 是抗体非常重要的两个参数，决定抗体的性能。

抗体研究：Kd test

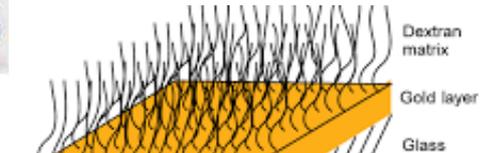


Biacore T100 SPR仪



Chip上的4孔道

高分子表面偶联活化基团



最常见的CM5芯片

Biacore CM5 chip

\$600/5 chips

4 channel/chip

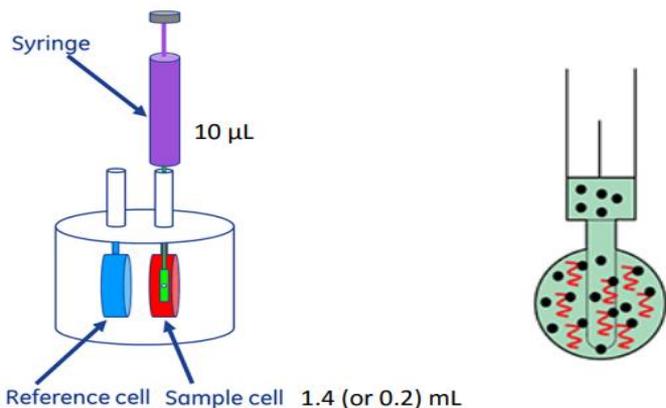


各种表面修饰的Biacore芯片

抗体研究：Kd test

● ITC检测 等温滴定量热法

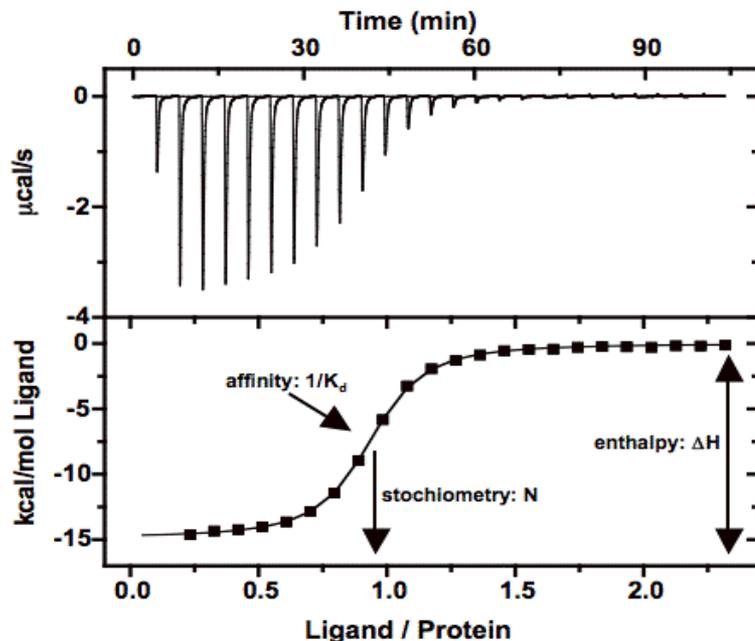
通过测量抗体和抗原结合时释放的热量来检测Kd值。



Malvern MicroCal VP-ITC



Isothermal Titration Calorimetry (ITC)



优点:

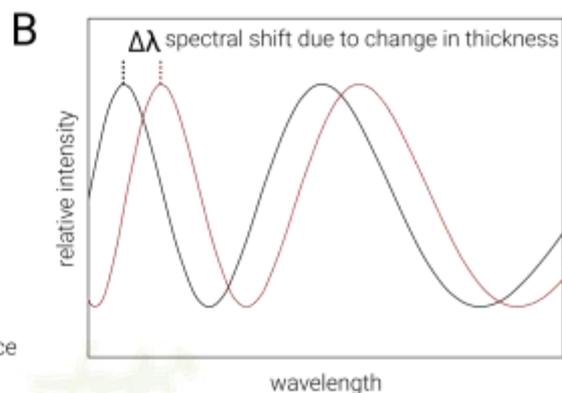
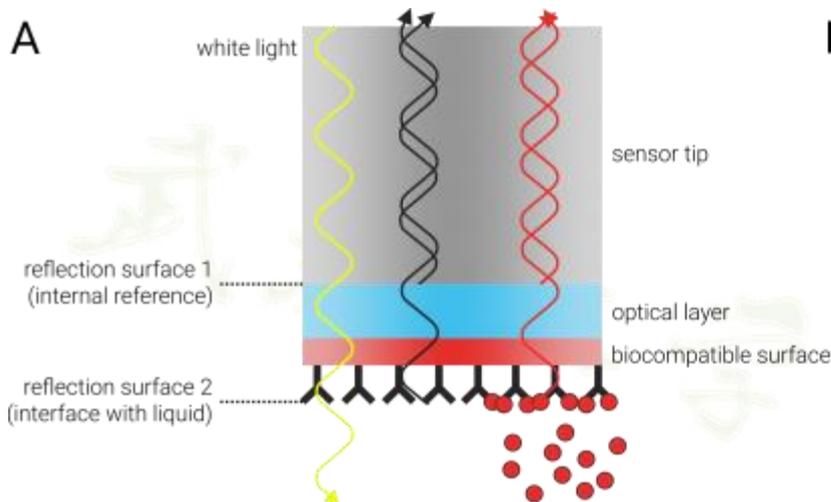
- 不需要偶联反应
- 小分子配体也有信号

缺点:

- 灵敏度低，需要大量样品
- 花费大量时间优化参数条件

抗体研究：Kd test

● BLI检测 Biolayer interferometry (BLI)

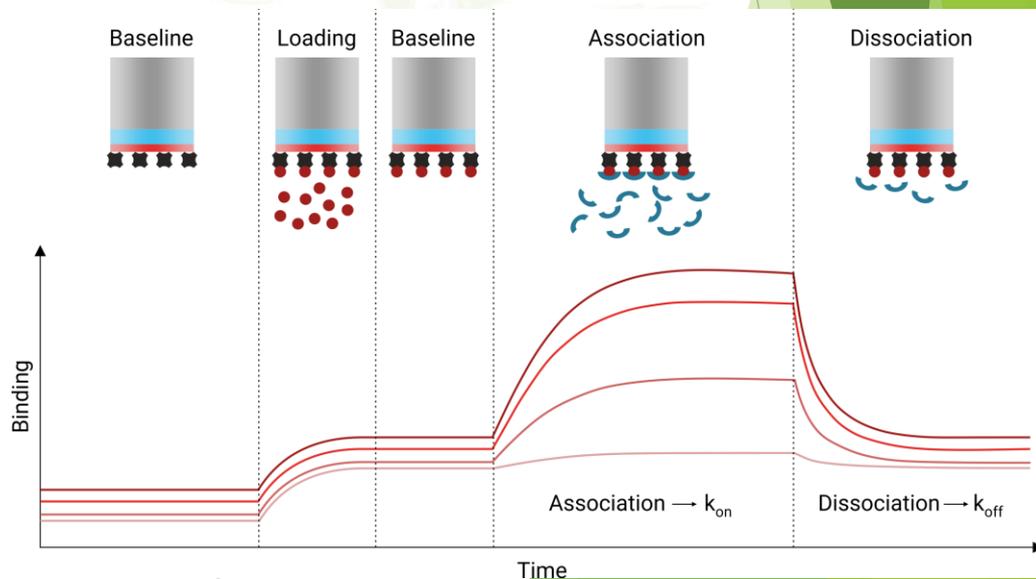


抗原结合后引起厚度的变化，从而测量波长的变化。

和SPR方法类似，只是检测原理不一样。

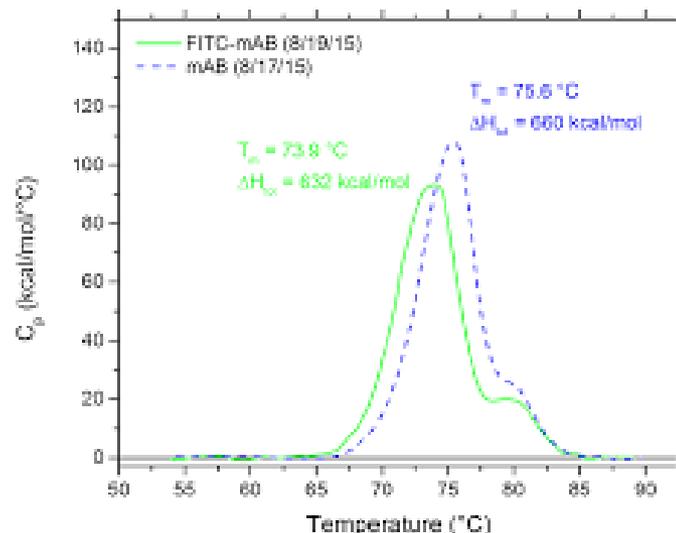
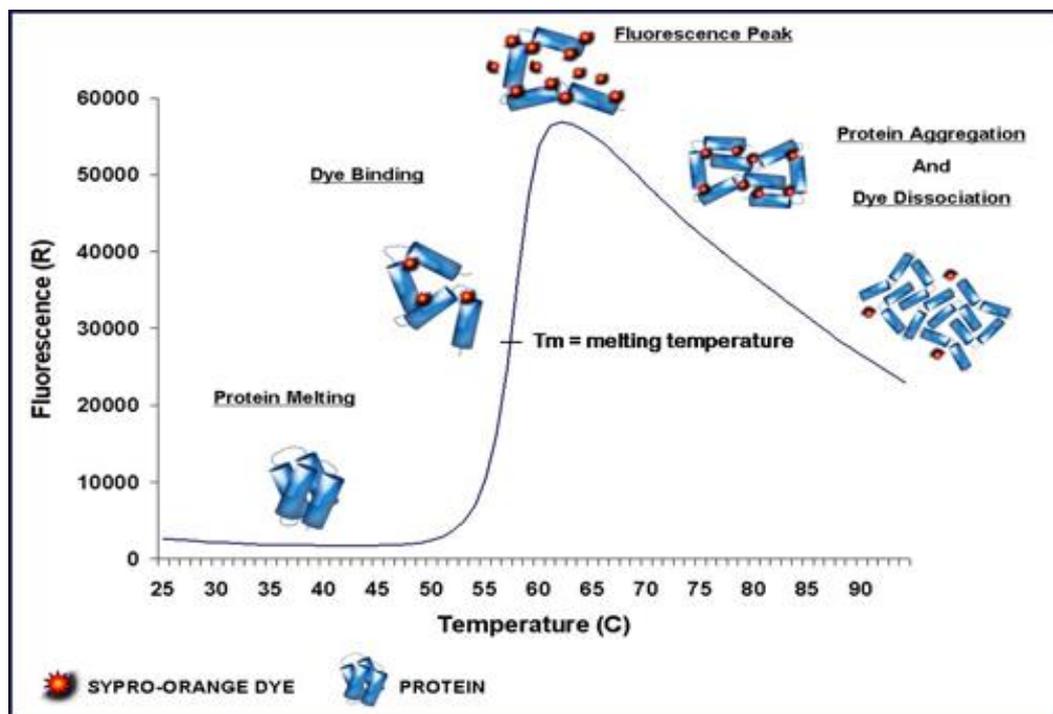


Forte Bio公司的Octet system



抗体研究：热稳定性测定

Differential scanning calorimetry (DSC) 测定抗体的热稳定性



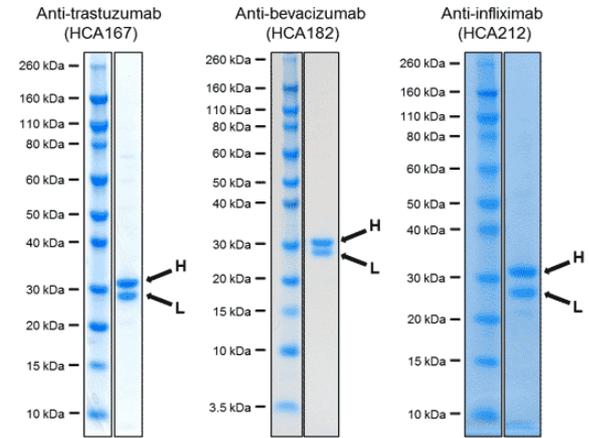
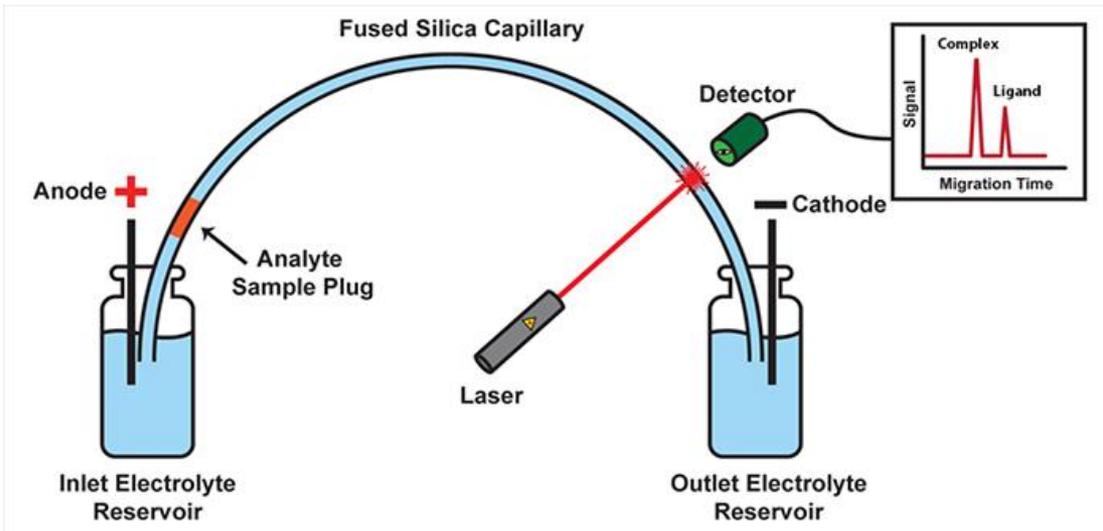
化学修饰后的抗体热稳定性降低

用于预测抗体的稳定性，特别是长期稳定性。



热分析仪

抗体研究：抗体毛细管电泳



毛细管电泳代替SDS-PAGE

