

武汉大学博士课程之

现代药学研究新进展

主讲教师：台万一

武汉大学药学院



内容概要

I. 抗体药物及抗体类似物的结构设计与应用

- 抗体基础知识
- 抗体筛选技术
- 抗体药物结构设计
- 抗体表达技术

II. 细胞疗法的研究与应用 (CAR-T)

药物发展与抗体

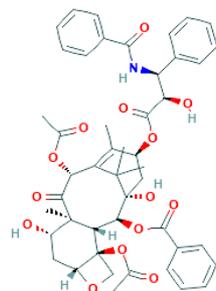
药物种类与研发趋势



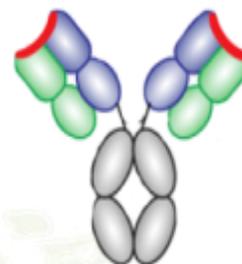
天然植物



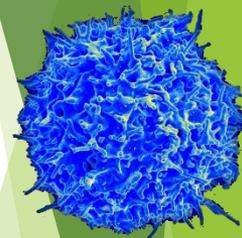
炮制中药



化学分子



抗体分子



CAR-T

抗体药物在制药领域的现状

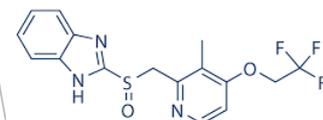
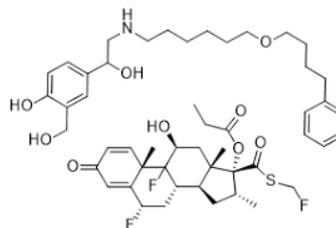
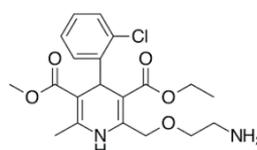
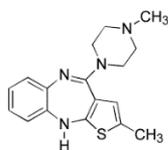
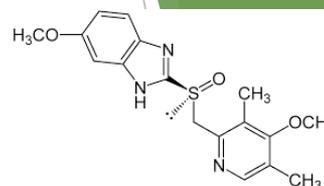
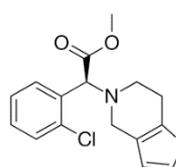
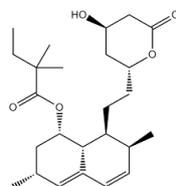
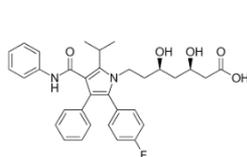
The blockbusters

Top ten brands, global sales, 2004, \$bn

Brand	Global Sales (\$bn)
Lipitor (cholesterol-lowering)	12.0
Zocor (cholesterol-lowering)	5.9
Plavix (anti-clotting)	5.0
Nexium (anti-ulcerant)	4.8
Zyprexa (anti-psychotic)	4.8
Norvasc (anti-hypertensive)	4.8
Seretide/Advair (anti-asthma)	4.7
Erypo (blood-cell booster)	4.0
Prevacid (anti-ulcerant)	3.8
Effexor (anti-depressant)	3.7

Source: IMS Health

5



排名	药品	中文名	公司	2019预测销售额 (亿美元)
1	Humira	修美乐	艾伯维	196.04
2	Revlimid	瑞复美	新基	109.18
3	Keytruda	可瑞达	默沙东	98.01
4	Eliquis	艾乐妥	BMS	76.66
5	Opdivo	欧狄沃	BMS	73.41
6	Avastin	安维汀	罗氏	61.51
7	Stelara	喜达诺	强生	58.74
8	Prevnar 13	沛儿13	辉瑞	58.06
9	Herceptin	赫赛汀	罗氏	55.99
10	Rituxan	美罗华	罗氏	53.58

← Fc融合抗体药

← PD-1抗体药

← 抗体药

← 抗体药

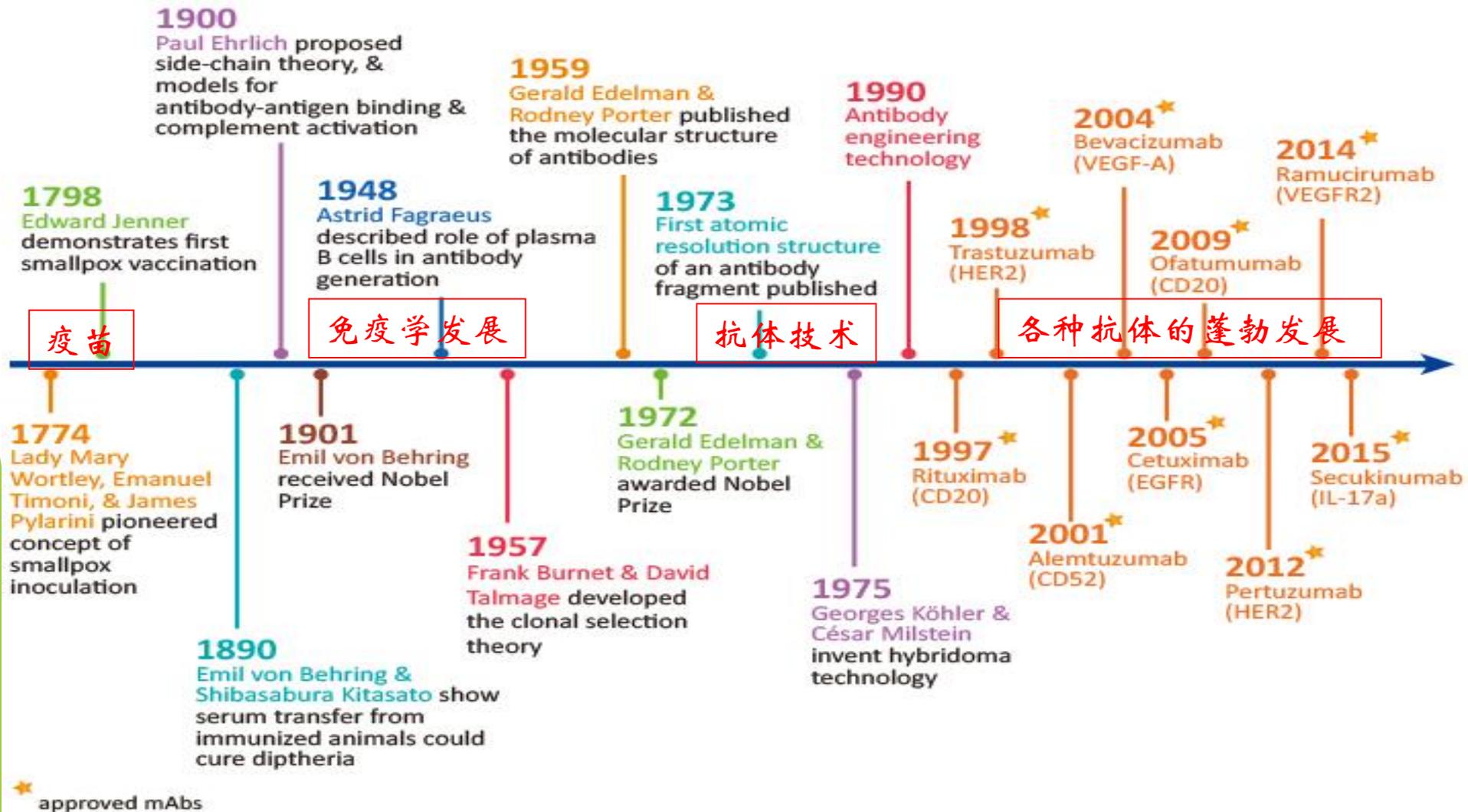
← 抗体药

← 抗体-药物偶联

← 抗体药

← 抗体药

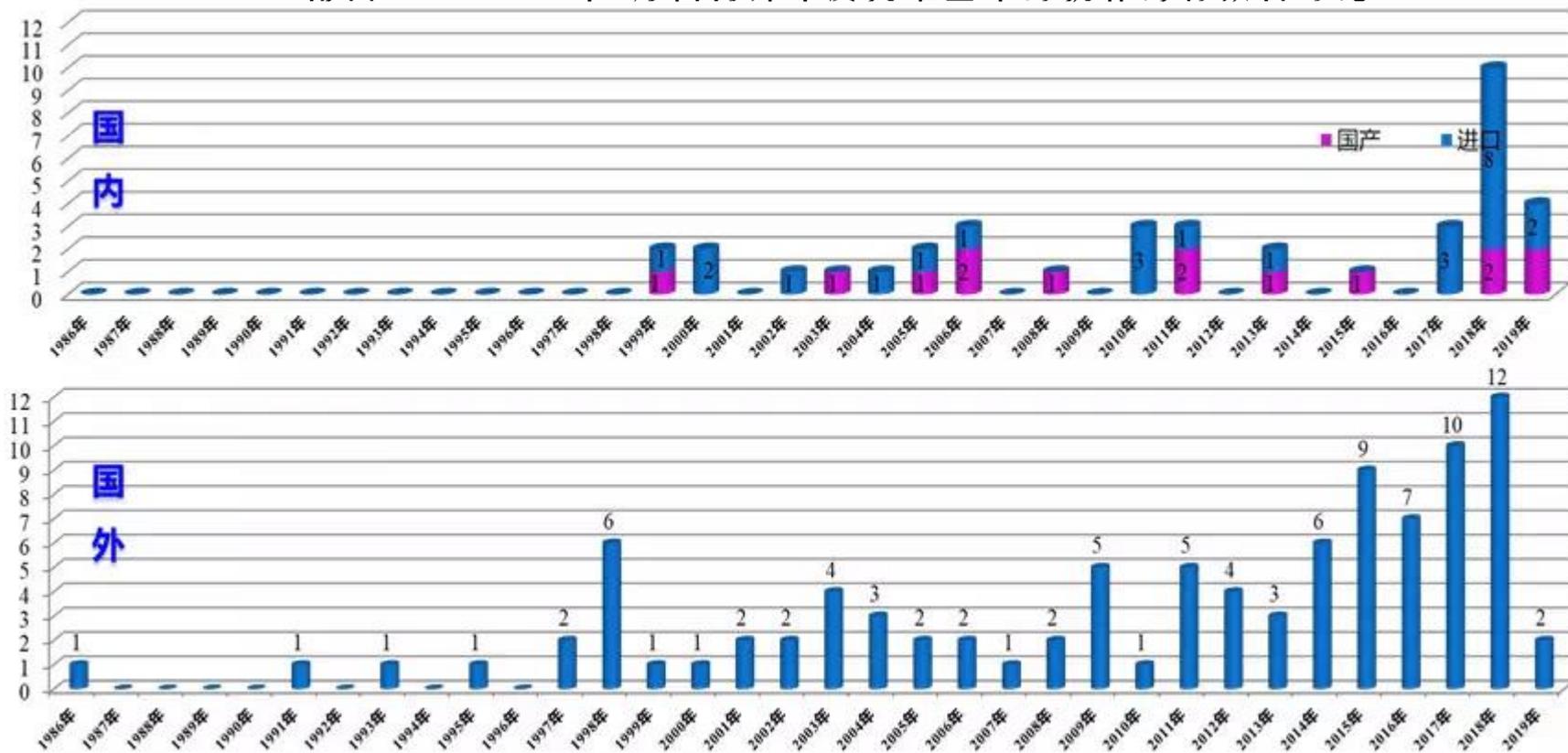
抗体药物现状



抗体药物现状

目前全球已经批准37家公司的98个原研型抗体药物（单抗和Fc融合蛋白），其中10个已经撤市，现上市88个。包括抗体-药物偶连物ADC5个，糖工程改造抗体6个，双特异性抗体3个，片段抗体抗体5个（含新批准的纳米抗体1个）等。

附图.1986-2019年5月国内外年度批准上市的抗体药物数目对比



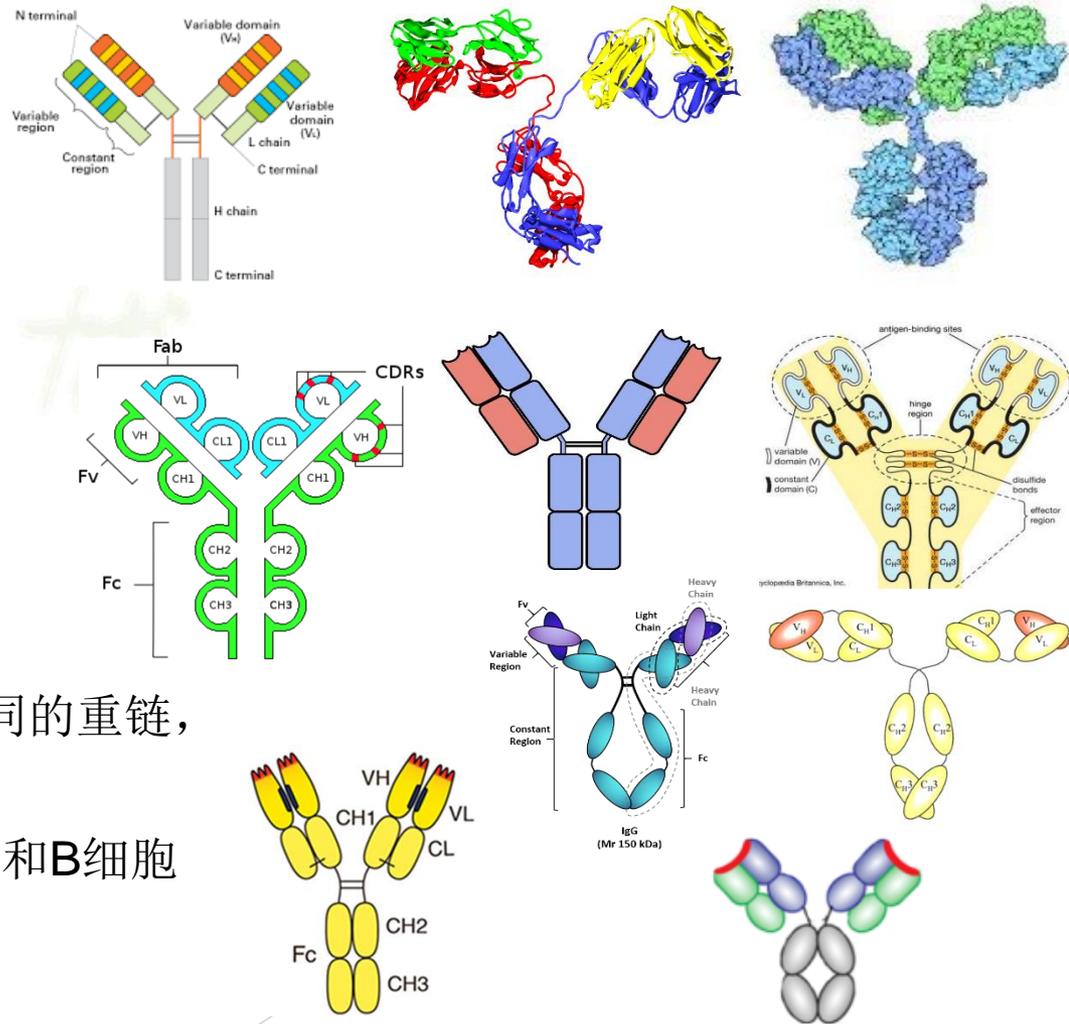
第一节：抗体基础知识

抗体的定义

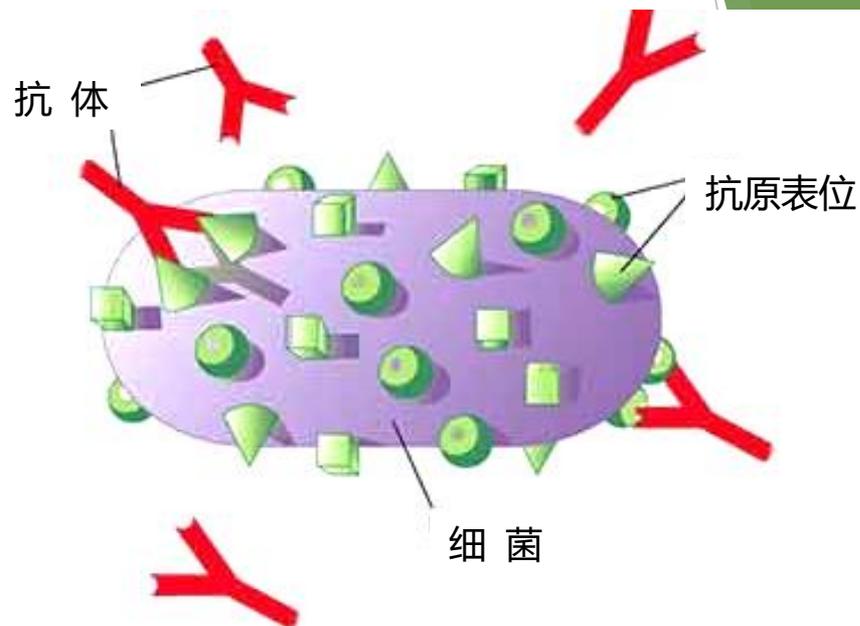
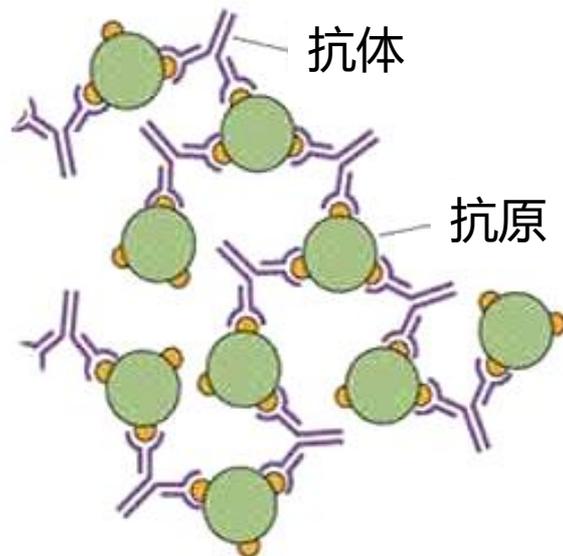
抗体 (antibody), 又称免疫球蛋白 (immunoglobulin, 简称Ig), 是一种主要由浆细胞分泌, 被免疫系统用来鉴别与中和外来物质如细菌、病毒等病原体的大型Y形蛋白质。

抗体的基本属性:

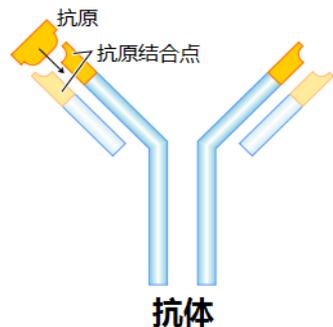
- 球状血液蛋白质
- 150kDa
- 多个种型, 最常见IgG
- 一种糖蛋白, 重链各有一个糖链
- 一个Y形的分子,
- 有4条多肽链组成 (包括两条相同的重链, 以及两条相同的轻链)
- 存在于脊椎动物的血液、体液中和B细胞的细胞膜表面



抗体与抗原

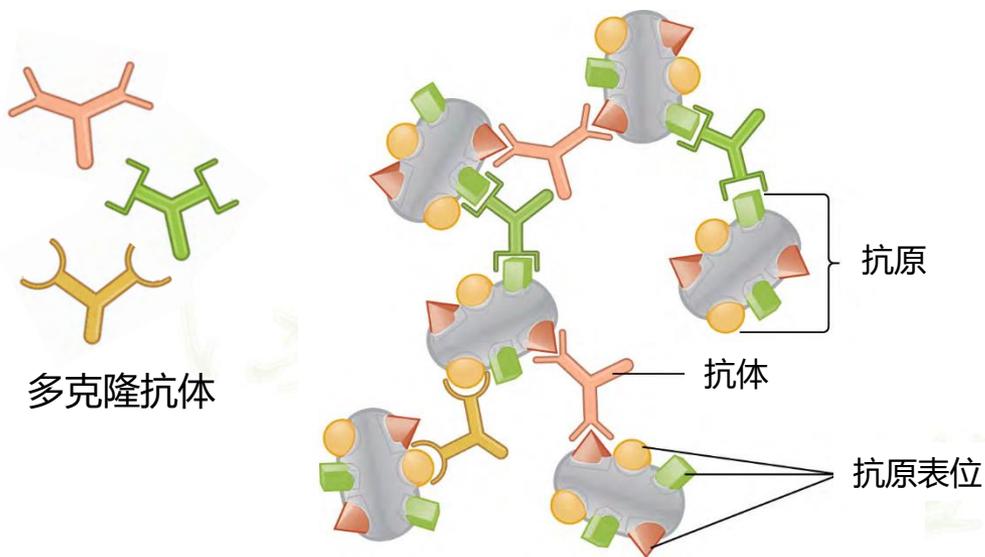


抗体通过其可变区的抗原结合位（即互补位）识别特定外来物的一个独特特征（即抗原表位），来实现对抗原的选择性识别和结合。



- 抗体的两个抗原结合位点是相同的，理论上每个抗原结合位点只可以结合一种抗原表位（否则抗体选择性差）；
- 一个抗原表位可以对应多种不同抗体；
- 一个抗原可以有多个抗原表位；
- 抗原表位可以是氨基酸序列、小分子化合物、核酸序列、高分子、纳米粒等各种物资。

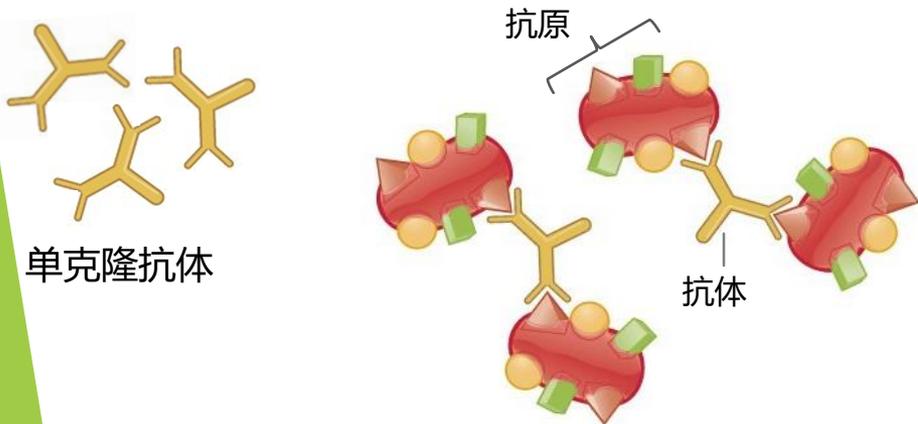
单克隆抗体和多克隆抗体



多克隆抗体是很多单克隆抗体组成的混合物。

多克隆抗体是通过对动物多次注射抗原或者抗原的多肽片段，进行免疫激活，从血液中纯化得到的抗体的混合物，可识别抗原上的多个抗原表位。

优点：多个表位，所以检测灵敏度高



单克隆抗体是单纯的、完全相同的抗体分子组成。

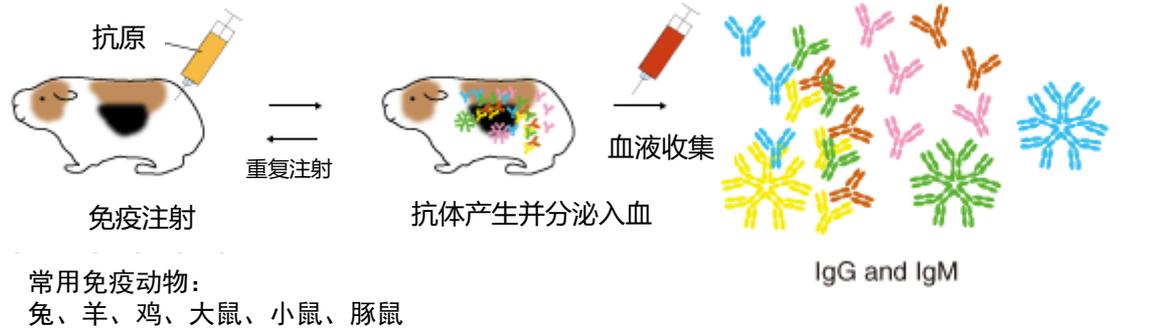
单克隆抗体是有同一个B细胞表达的，所以单克隆抗体的所有个体都是针对抗原上的同一个抗原表位。

优点：纯度高度统一，重复性好，一致性好

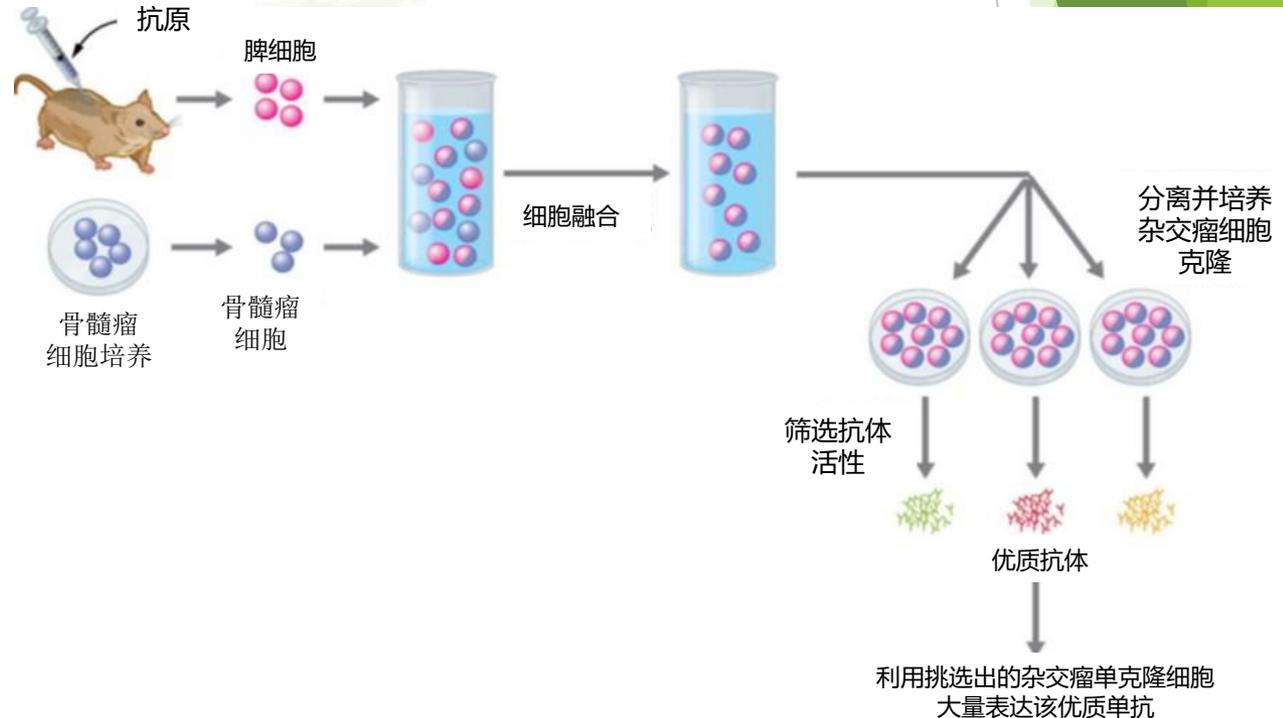
单克隆抗体和多克隆抗体制备

- 快速、简单、便宜
- 可能含有大量其它没活性抗体
- 识别多个抗原表位，结合能力强
- 制备时重复性差、动物个体差异大

● 多克隆抗体制备

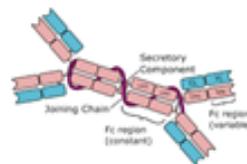


● 单克隆抗体制备（杂交瘤技术）



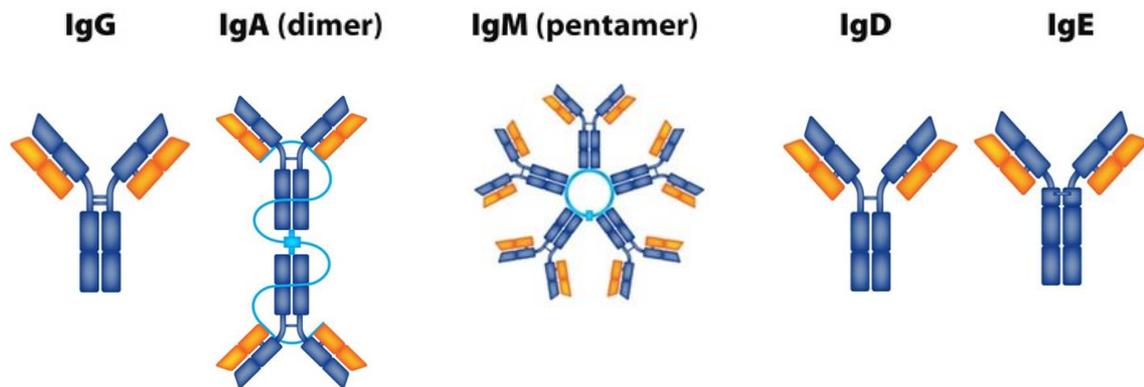
- 周期长，价格贵
- 可同时得到大量单克隆细胞株
- 一旦得到细胞株可持续大量制备单克隆抗体
- 有更多新技术代替杂交瘤技术

哺乳类动物抗体的种型



不同种属的动物抗体类别会不同，胎生哺乳类动物中，存在5种种型，分别是IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM。IgG为最常规抗体。

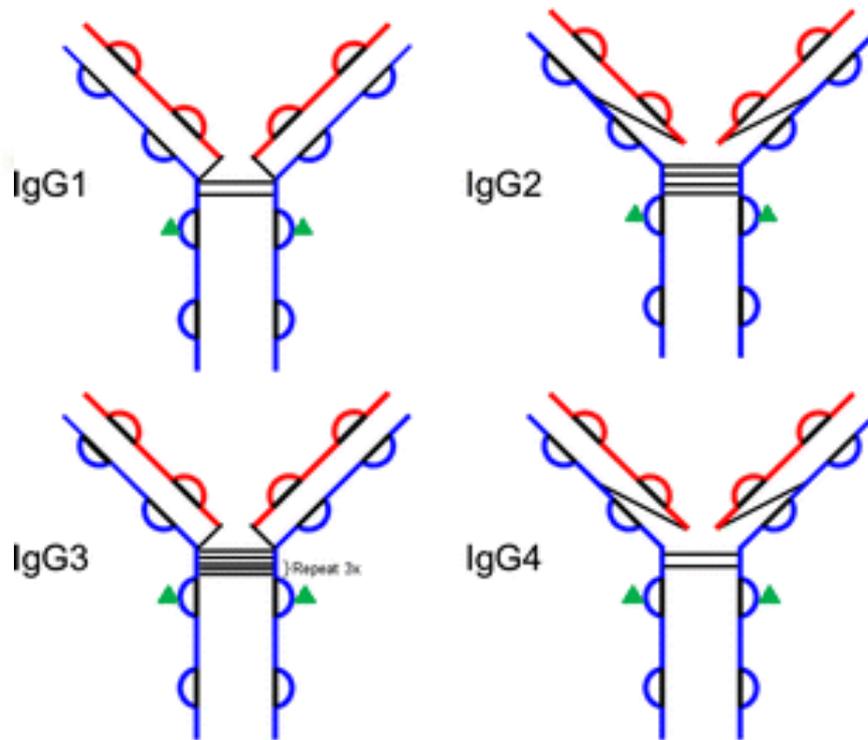
主要是在结构、生物中的属性和发挥功能的位置方面的不同。



种型	IgG	IgA (二聚体)	IgM (五聚体)	IgD	IgE
重链类别	γ (gamma)	α (alpha)	μ (mu)	δ (delta)	ϵ (epsilon)
轻链类别	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ
抗原可结合位点数	2	4	10	2	2
分子量	150 KDa	385 KDa	900 KDa	180 KDa	200 KDa
血清中抗体占比	80%	13%	6%	<1%	<1%
胎盘透过能力	可以	不能	不能	不能	不能
补体效应	有	有	无	无	无
Fc效应细胞	巨噬细胞				肥大细胞和嗜碱细胞
主要功能	抗原中和、凝集作用、补体效应、调理作用、抗体依赖细胞毒 (ADCC)	黏液中的抗原反应	抗原中和、凝集作用、补体效应。单体也可作为B细胞的受体	B细胞的受体	激活肥大细胞和嗜碱细胞对抗抗原或寄生虫

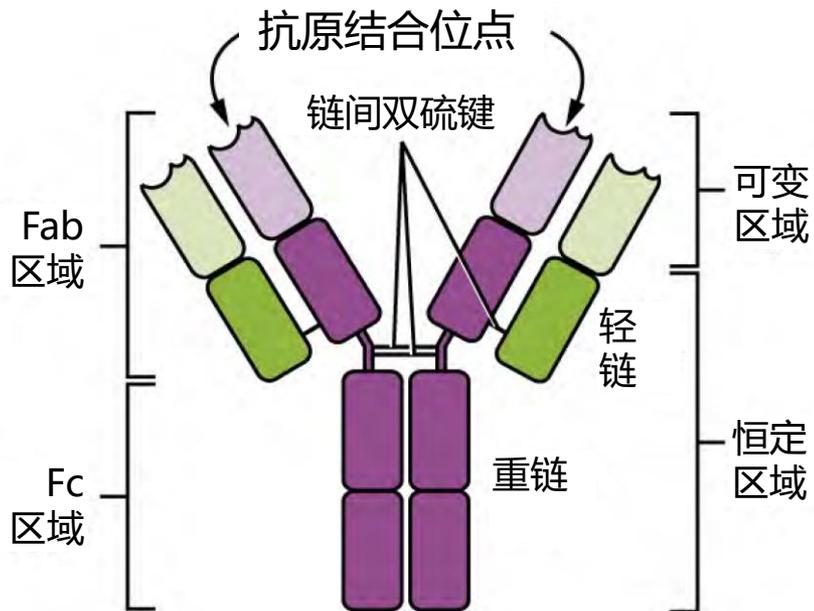
IgG亚型

抗体中，最重要的抗体是IgG亚型，是疾病治疗的主流。IgG可以有四种亚型。

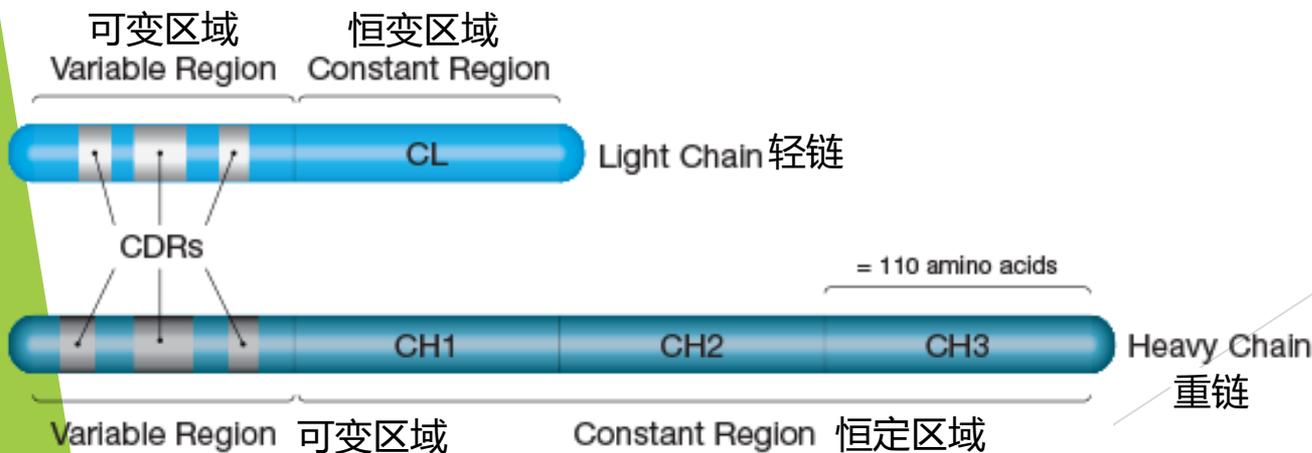


- 铰链区的双硫键对数
- 链间双硫键差别
- IgG1是主要研究对象

抗体的结构 — 基本结构



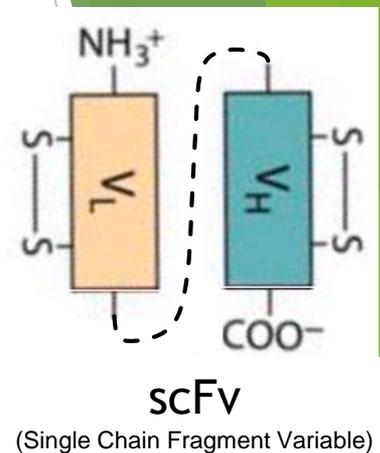
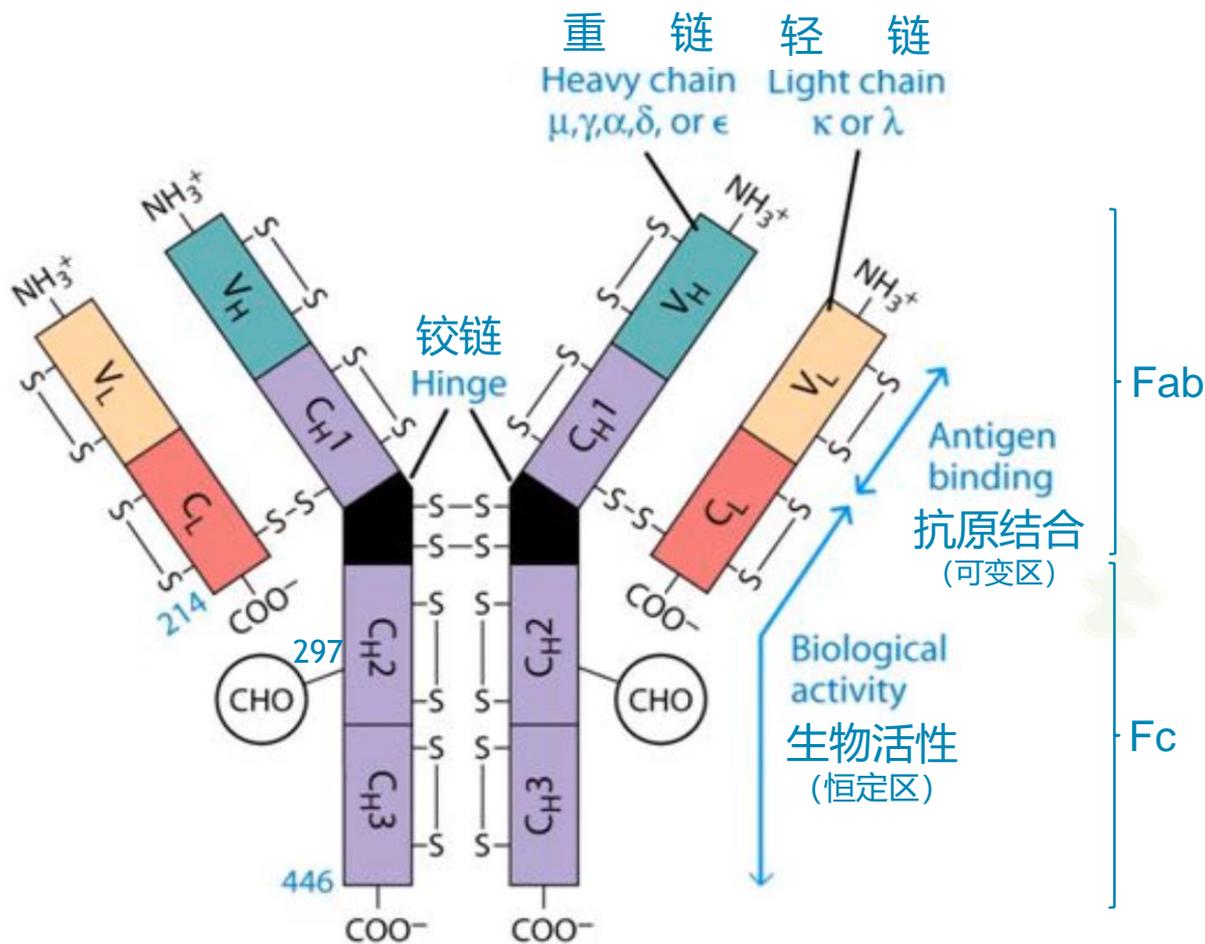
抗体有四条肽链组成，分别是两条相同的重链和两条相同的轻链。组成10个结构域，它们之间通过双硫键和域间作用力结合在一起。重链和轻链都分为可变区和恒定区，可变区和抗原结合，恒定区发挥抗体生理功能。



轻链有 κ -type 和 λ -type两种

重链有 γ 1, γ 2, γ 3, γ 4四种

抗体的结构 — 结构域命名规则

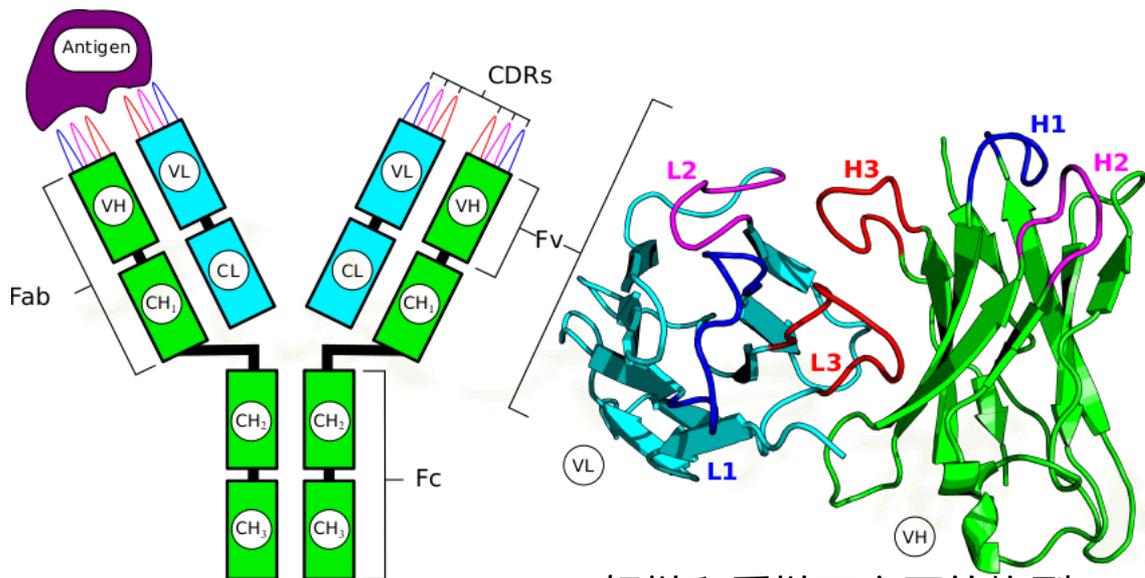


抗体具有复杂的化学结构，包括4条肽链、16个双硫键、2个多糖链和很多活性氨基。这为抗体的表达合成、修饰、稳定储备工艺提出了挑战。

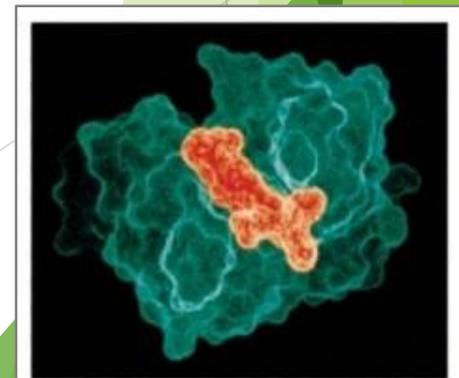
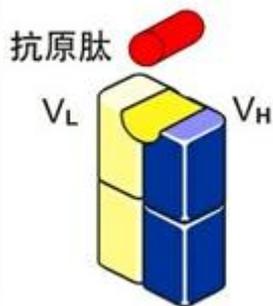
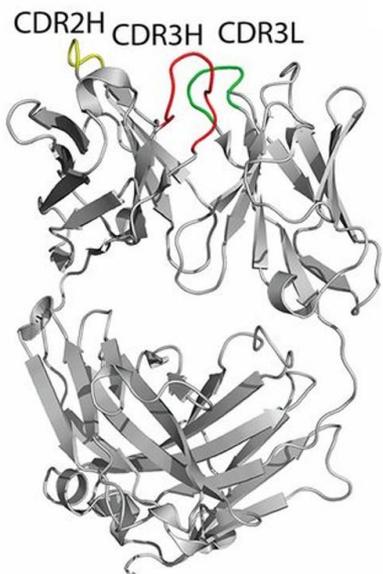
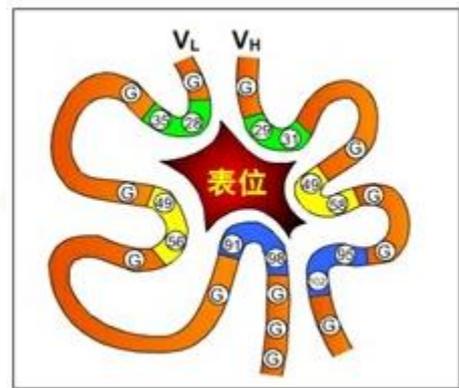
抗体的精细化学结构

双硫键、糖基化、多氨基

抗体的结构 — 可变区

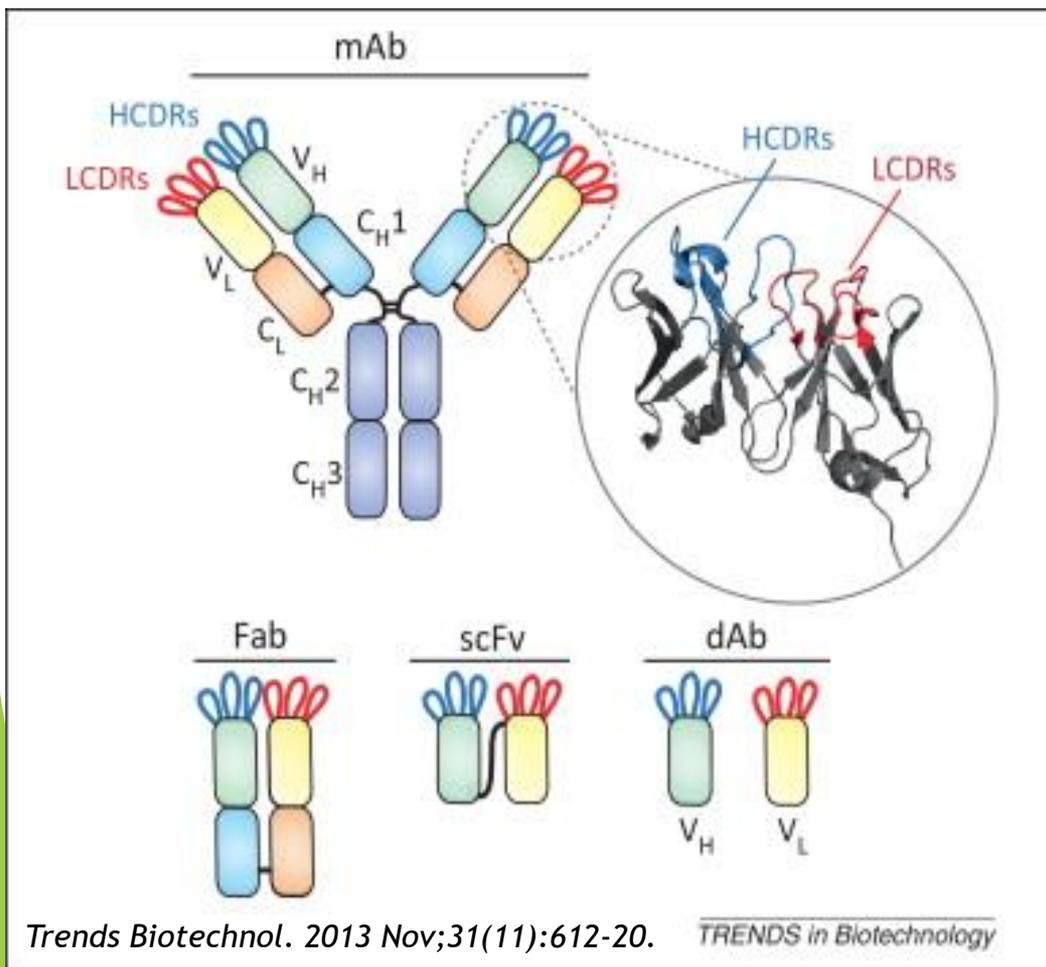


轻链和重链可变区的构型



抗体可变区与抗体片段

抗体与抗体片段需要保持抗原结合能力，必须保持CDR的完整



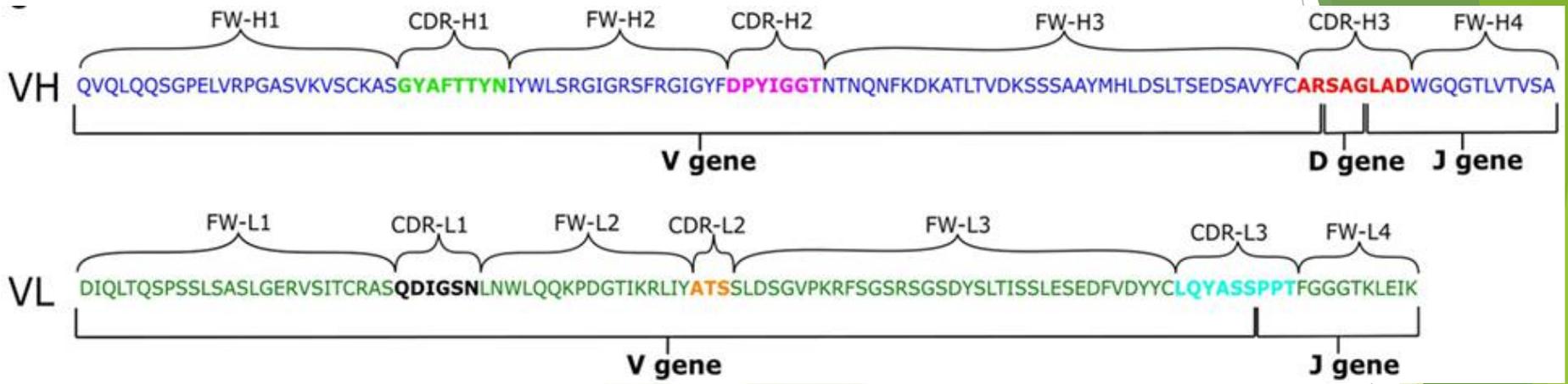
Trends Biotechnol. 2013 Nov;31(11):612-20.

TRENDS in Biotechnology

- CDR是抗体的抗原结合位点，但其它部位的个别氨基酸可能也参与
- 并不一定所有的CDR都参与抗原结合，可能有个别边缘CDR不参与
- CDR的长度不一样，CDR1和CDR2较短，CDR3较长，起关键作用
- HCDRs和LCDRs合在一起亲和力最大，但是单个HCDRs或者LCDRs也是有抗原亲和力的。

抗体的结构 — 可变区

抗体可变区的序列与结构



FW: Framework region, 框架区

每条链各4个FW区域

主要起对CDR的结构支撑作用

CDR: Complementarity determining region, 互补决定区

每条链各3个CDR区域

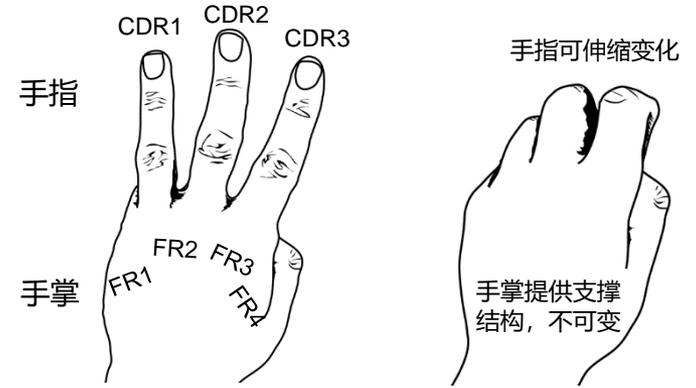
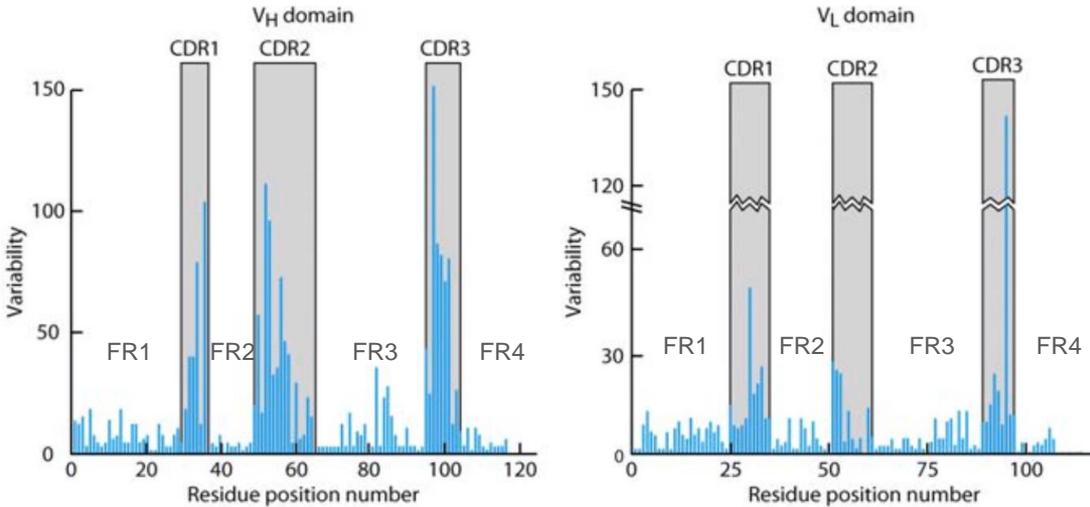
和抗原结合的主要区域

V gene, D gene and J gene: 可变区 (Variable, V) 基因节段、多样性区 (diversity, D) 基因节段、接合区 (Joining, J) 基因节段

- 抗体可变区的氨基酸序列多样性来自于基因节段的重排，通过对节段的随机重排实现多达 10^8 种变化；
- 重链可变区主要来自于三个基因节段 (VDJ)，由重链基因簇的44个V节段，27个D节段和6个J节段重排而来；
- 轻链可变区主要来自于两个基因节段 (V和J)，由轻链基因簇的80个V节段和5个J节段重排而来；
- 因为抗体轻链有 κ 轻链和 λ 轻链两种亚型，所以分别对应有两个轻链基因簇 (κ 和 λ)， κ 链基因簇比较清楚 (80个V和5个J)， λ 链基因簇太复杂，目前基因数目尚不清楚。

抗体的结构 — 可变区

抗体可变区氨基酸变化率分别



CDR序列多变, 并且构型是柔性摇摆的, 就像在空间构像恒定的FR上伸出的三根手指, 伸缩调整抓住抗原。

9种商业化抗体的可变区序列对比

Yk CDR Determination

```

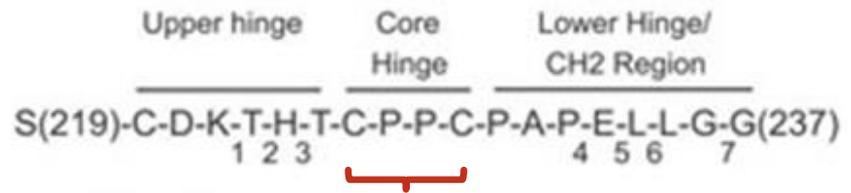
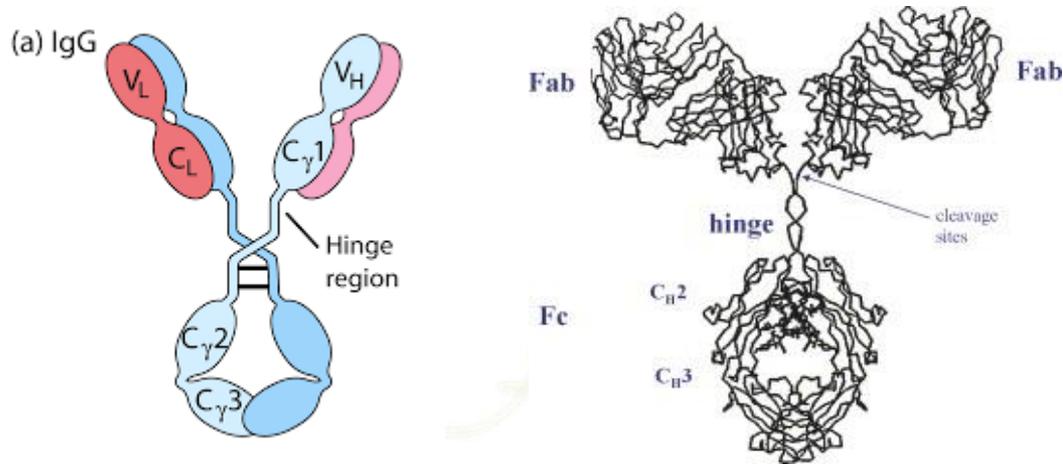
Bevacizumab      DIQMTQSPSSLASVGDRTITCSASQDI-----SNYLHWYQKPKGKAPKVLIIYFTSSLSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPTTFGQGTKVEIK
Trastuzumab      DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQDV-----NTAVAWYQKPKGKAPKLLIYASAFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
Alemtuzumab      DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQNI-----DKYLNWYQKPKGKAPKLLIYNTNNLQGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNHISRPPTFGQGTKVEIK
Omalizumab       DIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQSV-DYDGDSDYMWYQKPKGKAPKLLIYAASYLSEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPTTFGQGTKVEIK
Efalizumab       DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASKTI-----SKYLANXQKPKGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHNIEYPLTFGQGTKVEIK
Ranibizumab      DIQLTQSPSSLASVGDRTITCSASQDI-----SNYLHWYQKPKGKAPKVLIIYFTSSLSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPTTFGQGTKVEIK
Daclizumab       DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASSSI-----SYMHWYQKPKGKAPKLLIYFTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHRSTYPLTFGQGTKVEIK
Certolizumab     DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQNV-----CTNVAWYQKPKGKAPKLLIYASAFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIK
Pexelizumab     DIQMTQSPS-LSASVGDRTITCSASENI-----YGALNWYQKPKGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIK
Opportuzumab    DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRSTKSLHNSGITLYLWYQKPKGKAPKLLIYQMSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLIEPPTFGQGTKVELK
Natalizumab     DIQMTQSPSSLASVGDRTITCKISQDI-----NKYMAWYQKPKGKAPRLLIHYTSALQPGIPSRFSGSGSGRDTFTTISSLQPEDFATYYCQRYD-NLWTFGQGTKVEIK
Pertuzumab      DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQDV-----SIGVAWYQKPKGKAPKLLIYASARYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIYIPYTFGQGTKVEIK
    
```

VH CDR Determination

```

Omalizumab      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNRIRQAPGKGLEWVASI--TYDGSNTYADSVK-GRFTISRDDSKNTFYLQMSNLAEDTAVYYCARGSHYF--GHWHFAVWGQGTLLVTVSS
Trastuzumab     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK-DTYIEHWVRQAPGKGLEWVARI-YPTNGYTRYADSVK-GRFTISADTSKNTAYLQMSNLAEDTAVYYCSRWGG-D--GFYANDYWGQGTLLVTVSS
Efalizumab      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFT-CHMHWVRQAPGKGLEWVQIMIHPSDESTRYKQFKDIRFTISVDKSKNTLYLQMSNLAEDTAVYYCARIGIYFYGTYYFDYIWGQGTLLVTVSS
Certolizumab    EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFT-DYGMHWVRQAPGKGLEWVGWI-NTYIGEPYADSVK-GRFTFSLDTSKSTAYLQMSNLAEDTAVYYCAR--G-Y--RSYANDYWGQGTLLVTVSS
Pertuzumab      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-DYTMHWVRQAPGKGLEWVADV-NPNSGGSIYNQRFK-GRFTLSVDRSKNTLYLQMSNLAEDTAVYYCARNLG-P--SFY-FDYWGQGTLLVTVSS
    
```

抗体的结构 — 铰链区

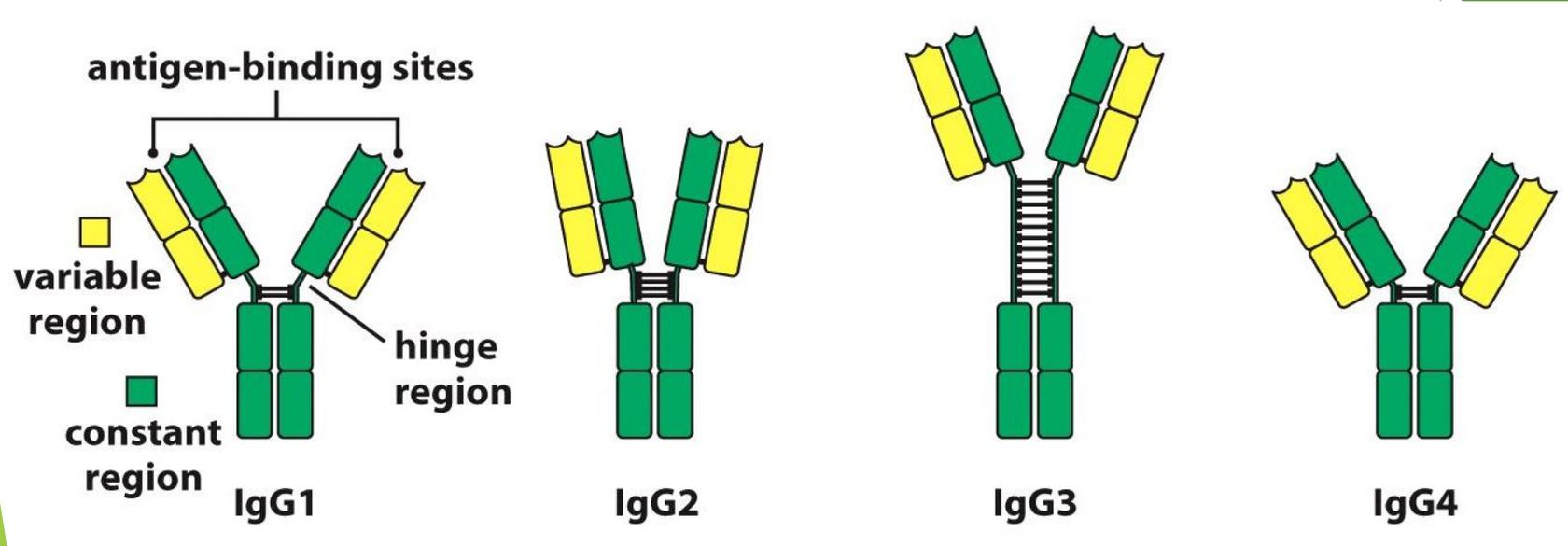


- 1 Plasmin
- 2 Human Neutrophil Elastase (HNE)
- 3 Papain
- 4 MMP-3, MMP-12
- 5 GluV8, Cathepsin G
- 6 Pepsin, MMP-7
- 7 IdeS

铰链区为抗体的脆弱部位，容易酶降解，容易双硫键还原让抗体稳定性变差。

抗体的结构 — 铰链区

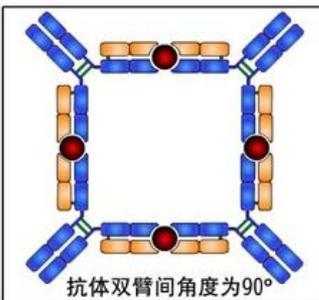
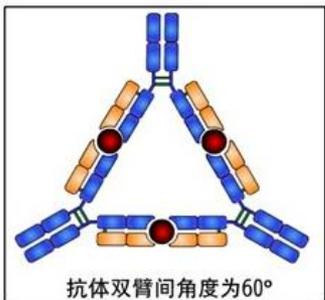
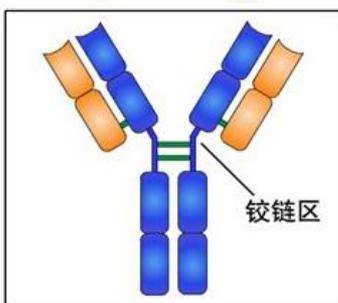
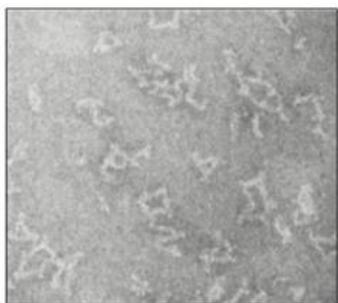
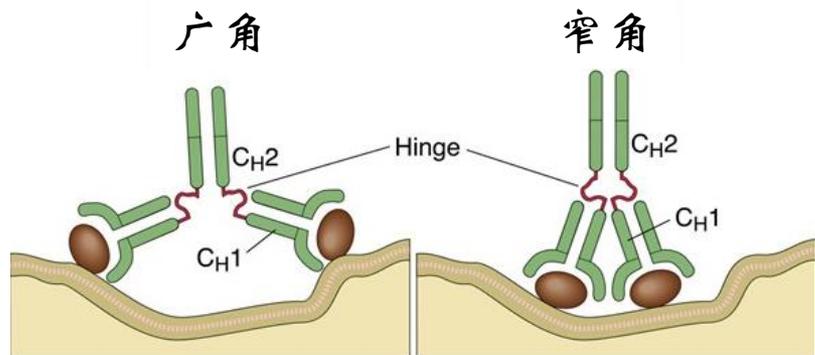
IgG抗体亚型的主要区别就在于它们铰链区的不同



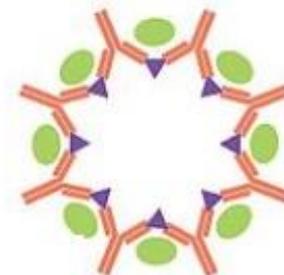
	Upper hinge Papain ↓	Core hinge	Lower hinge Pepsin ↓	Disulfide bonds
HuIgG ₁	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP	2
HuIgG ₂	ERK	CCVECPPCP	APPVA-GP	4
HuIgG ₄	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP	2
EU:	216	226	231 238	

抗体的结构 — 铰链区

铰链区具有角度灵活性。

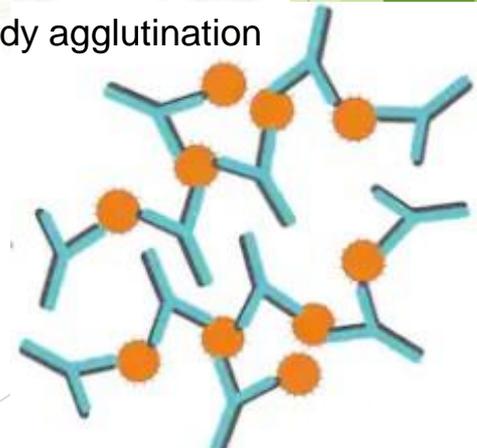


Free-floating immune complex



免疫复合物

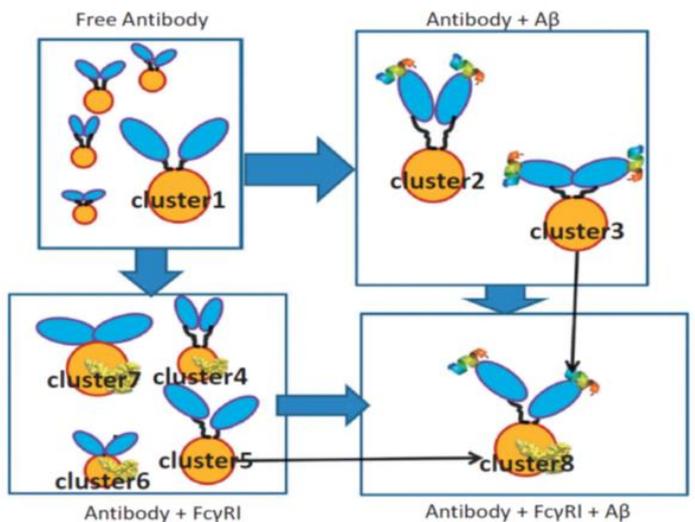
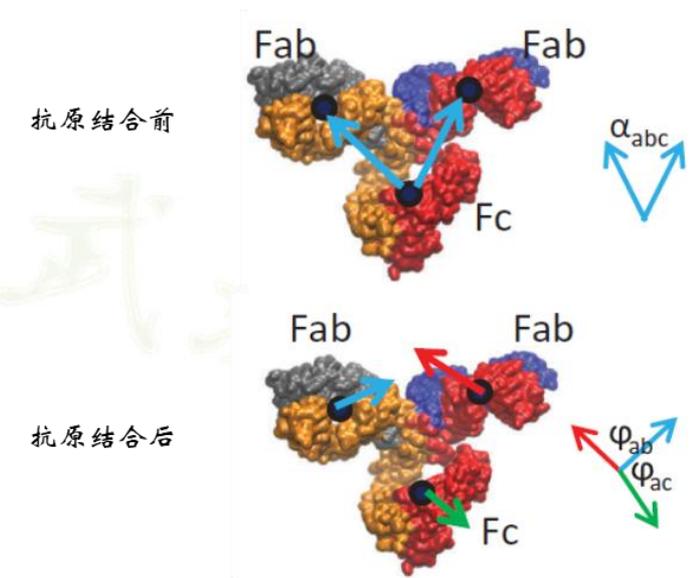
antibody agglutination



抗体的凝集效应

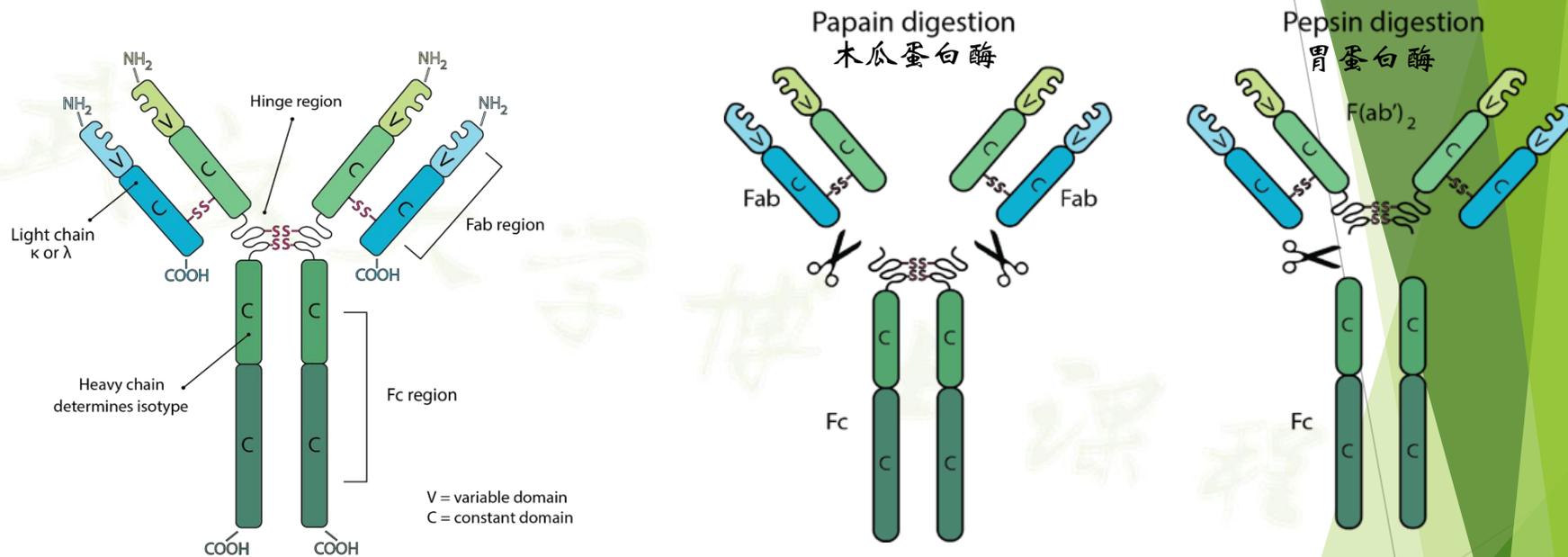
抗体的结构 — 铰链区

抗原结合促使抗体构像改变。



抗体的结构 — 铰链区

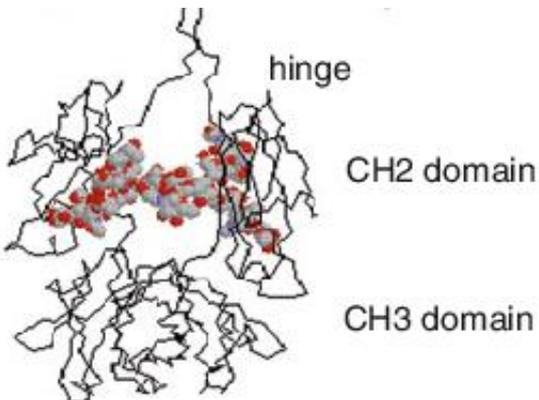
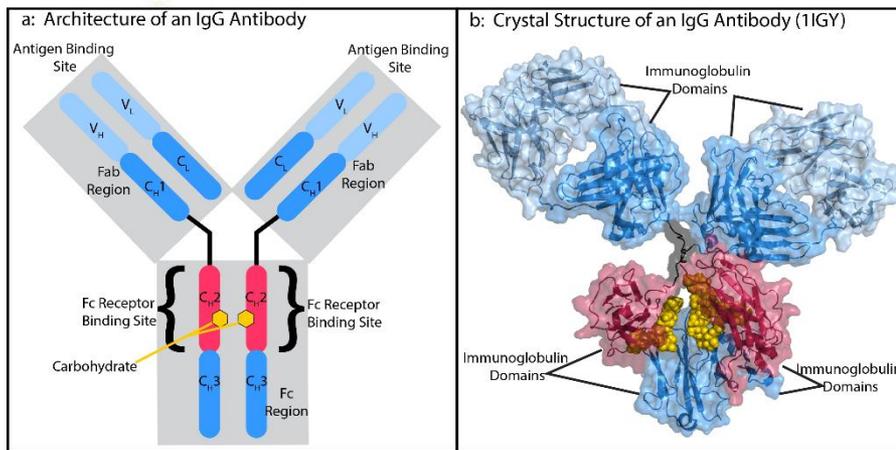
铰链区有Papain和Pepsin的酶切位点。



抗体的结构 — Fc 区

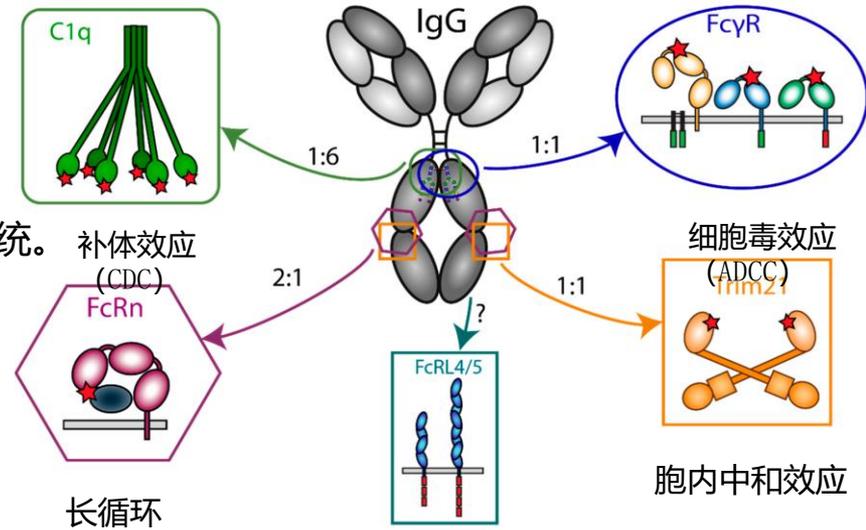
Fc: Fragment crystallizable region

Fc可与Fc-gamma-R受体以及部分补体蛋白结合，激活免疫系统。

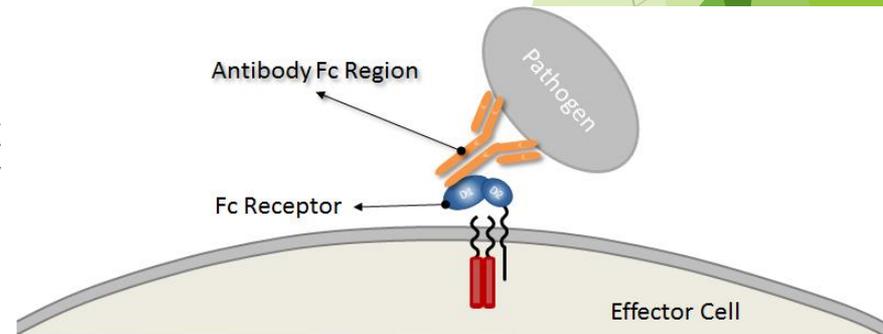


两条重链的CH2域之间的作用力很弱，仅仅只有糖链之间的微弱氢键作用。

抗体Fc区和Fc效应分子的结合位点

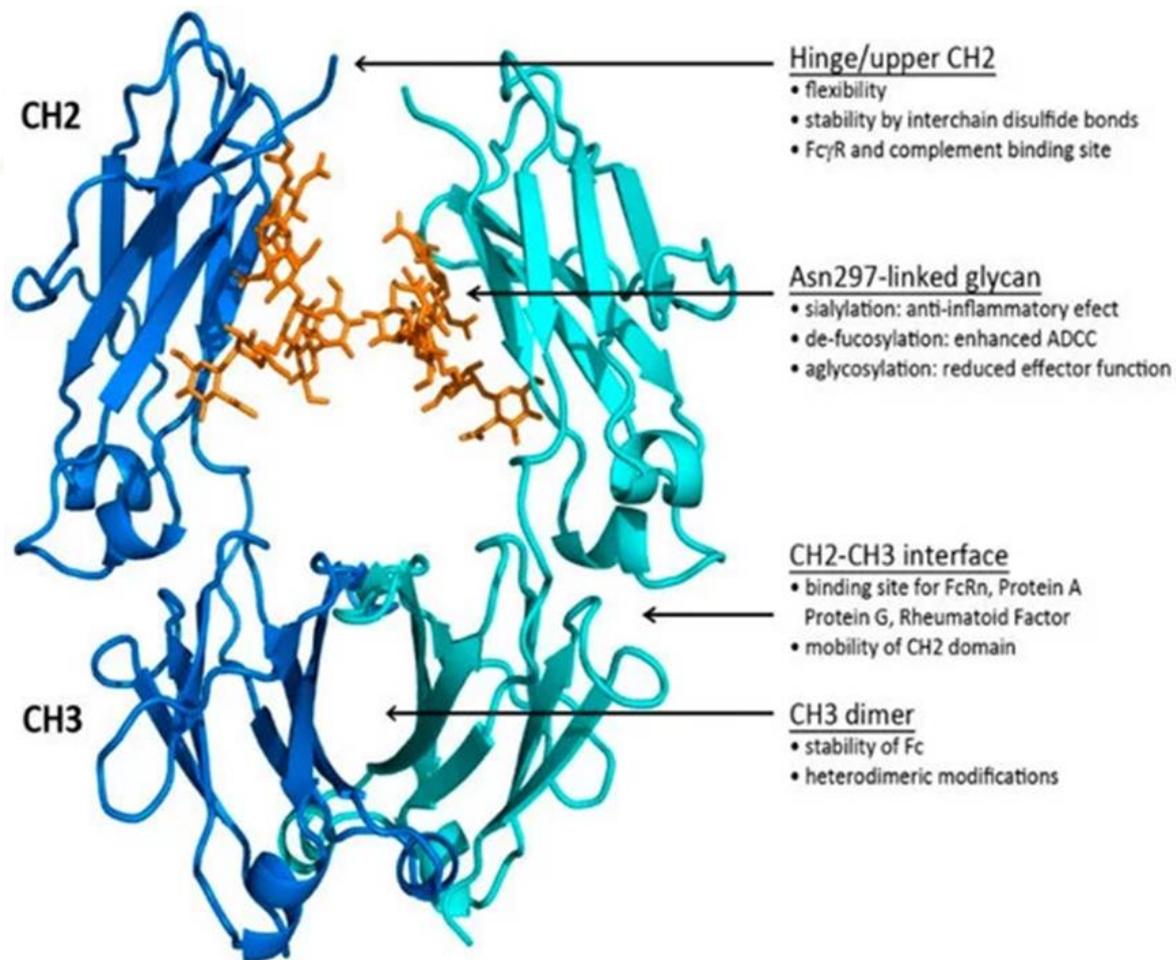


Fc在抗体的生理活性中发挥重要作用



抗体的结构 — Fc 区

CH2与CH3的空间构象



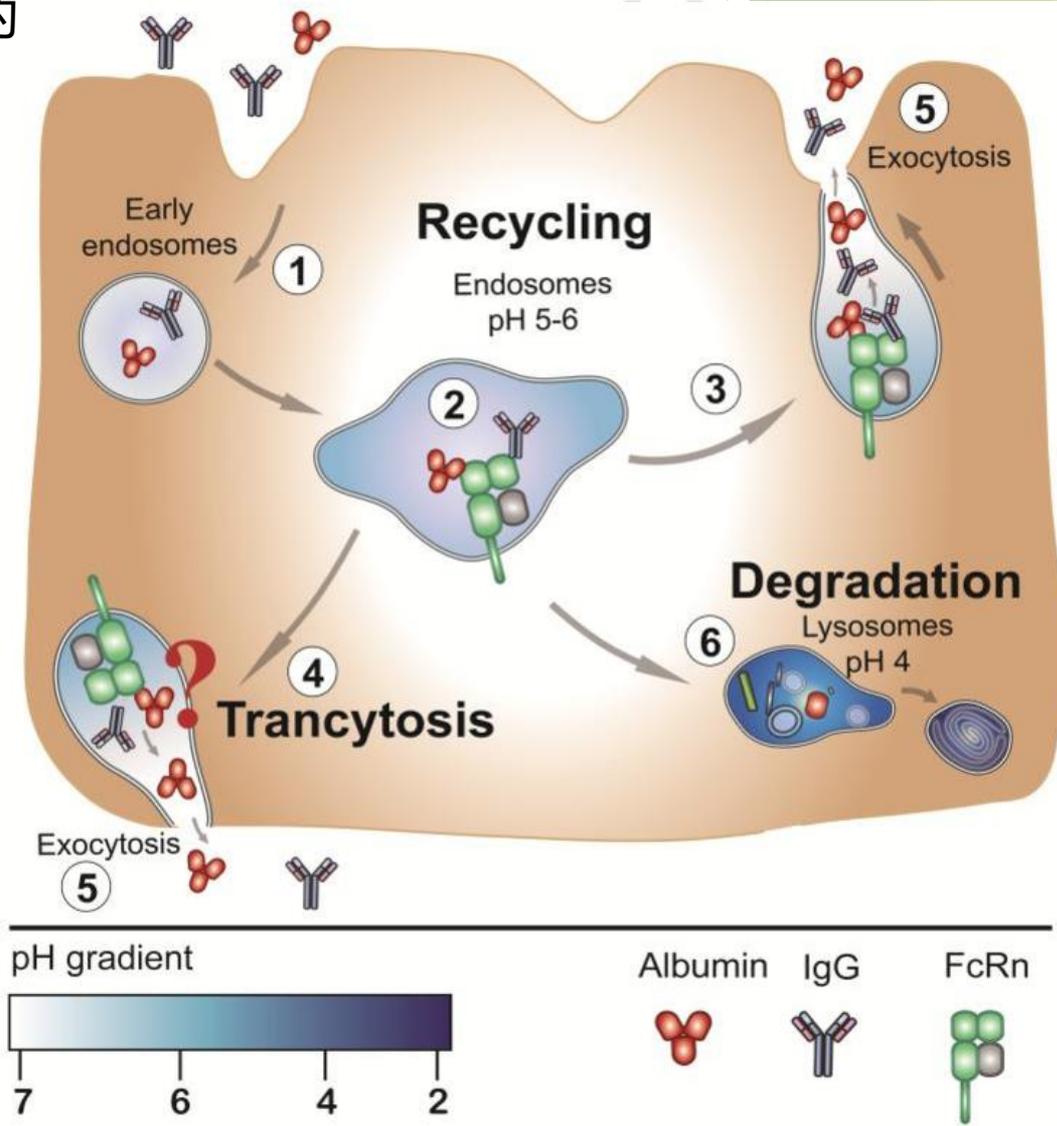
课程

抗体的结构 — Fc 区

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。

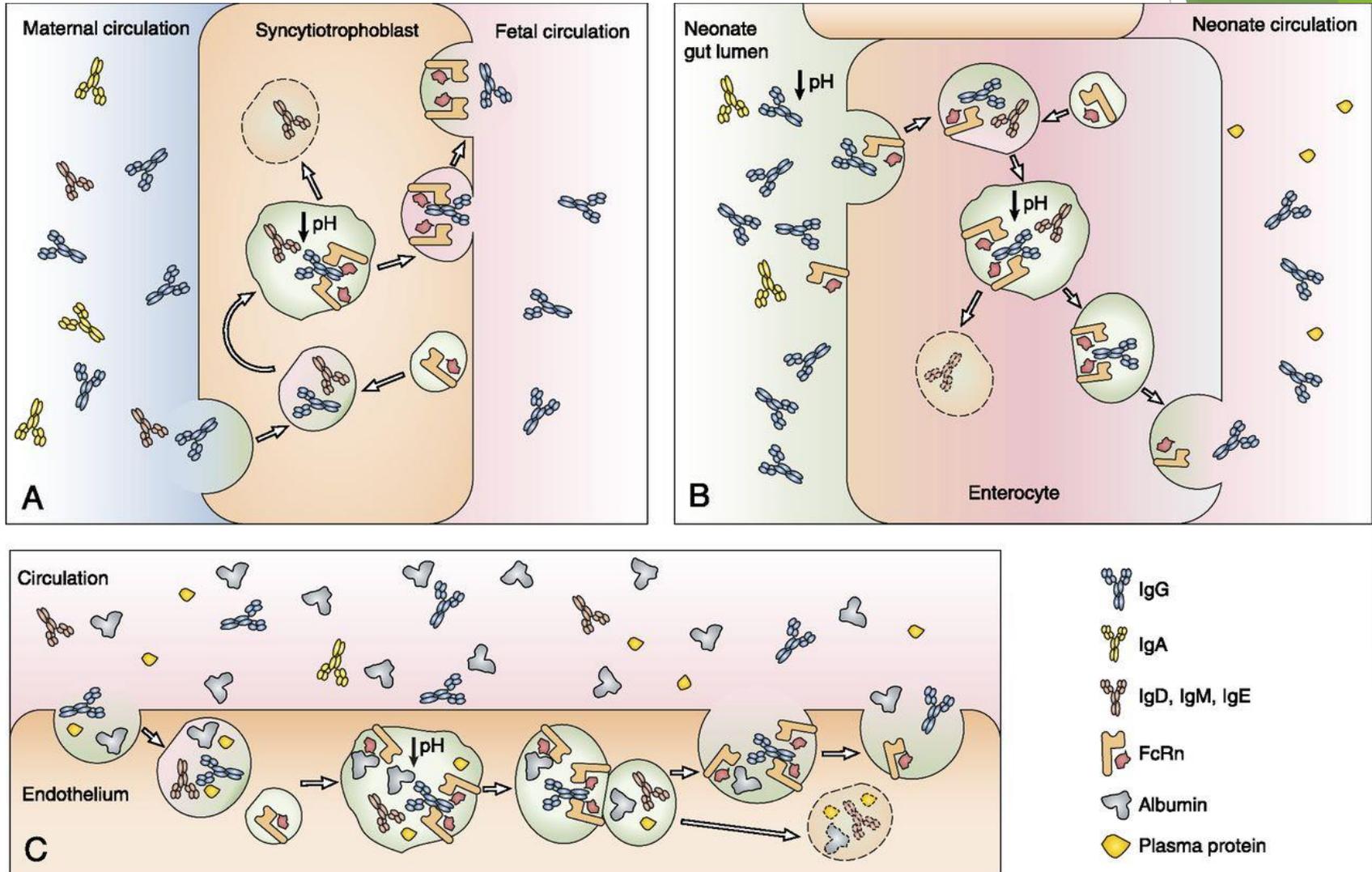
- 抗体和白蛋白都可以和FcRn结合，实现再回收。
- 人抗体 (IgG) 血中半衰期21天
- 小鼠抗体 (IgG1) 血中半衰期6-8天
- 白蛋白血中循环半衰期为20天
- 鼠源抗体在人体半衰期1天
- 普通大分子量蛋白半衰期几个小时

FcRn的抗体回收机制



抗体的结构 — Fc 区

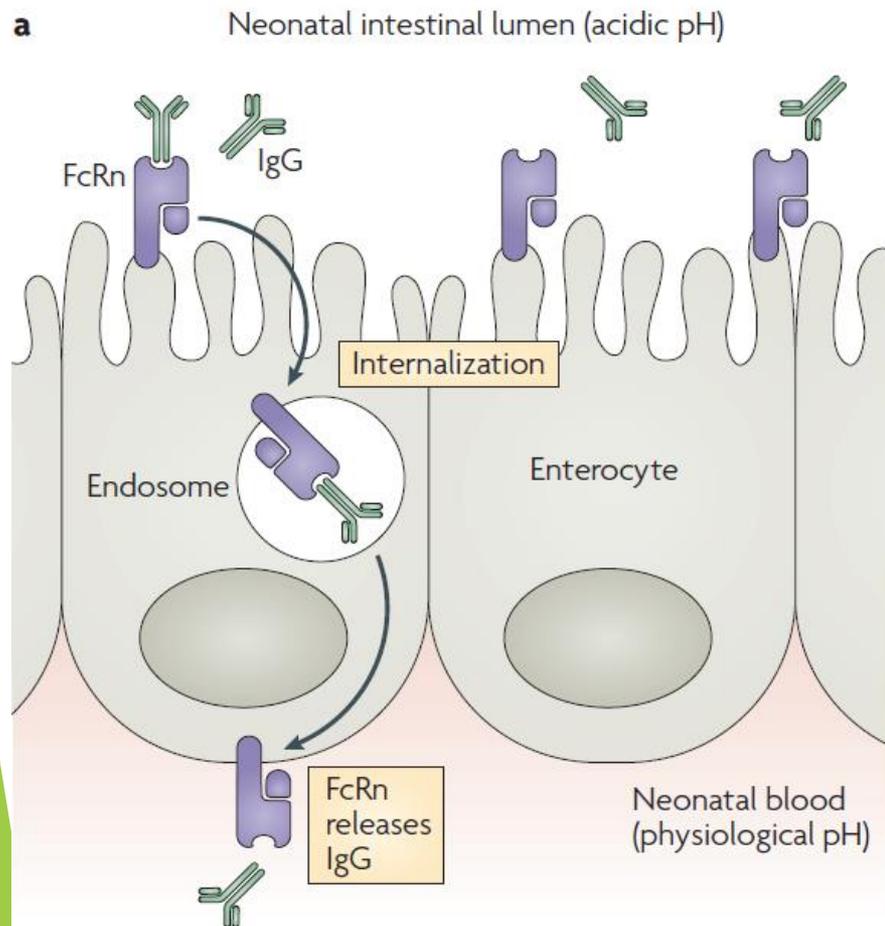
抗体与FcRn受体结合的三个生理作用：穿越胎盘(A)、抗体肠胃吸收(B)与血中长循环功能(C)。



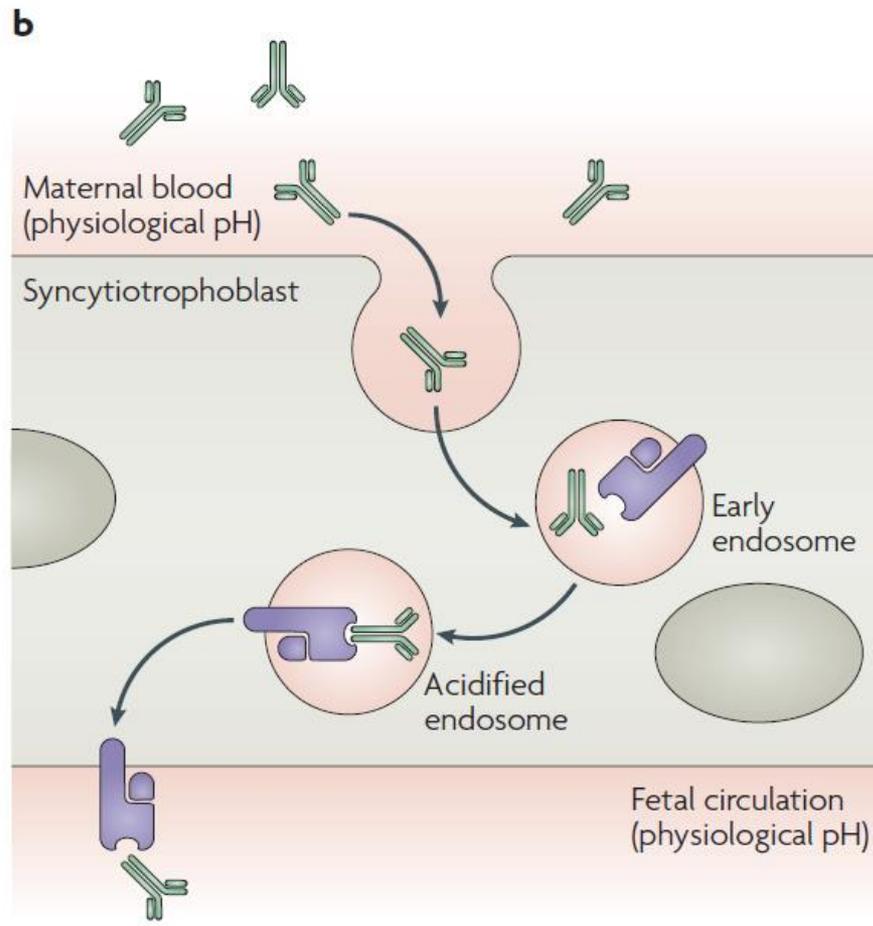
抗体的结构 — Fc 区

The neonatal Fc receptor (FcRn)介导抗体穿越胎盘行为和婴儿肠胃对母亲乳汁分泌抗体的吸收功能。

婴儿肠胃摄取母乳抗体的机制



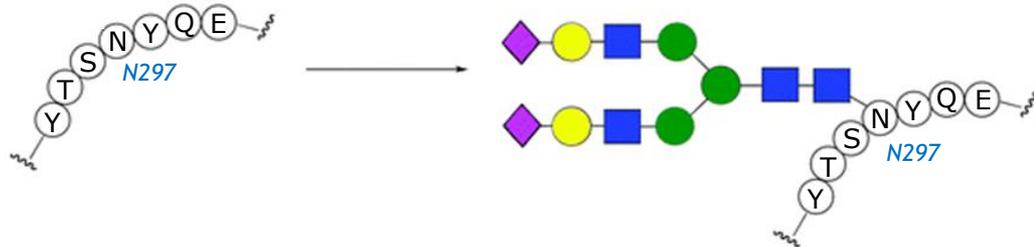
孕妇的抗体透过胎盘保护胎儿的机制



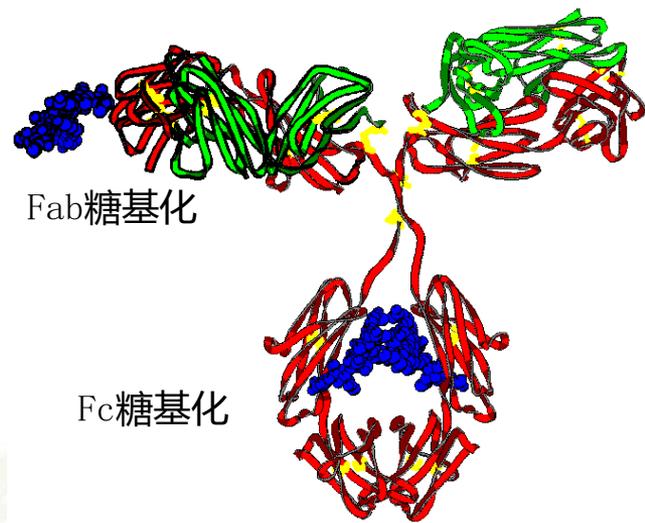
抗体的结构 — 糖基化

位点: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr X不能为Proline
 N297 N297

糖基化反应



■ = GlcNAc ● = Man ● = Gal ◆ = NeuAc ● = heterogeneous sugars



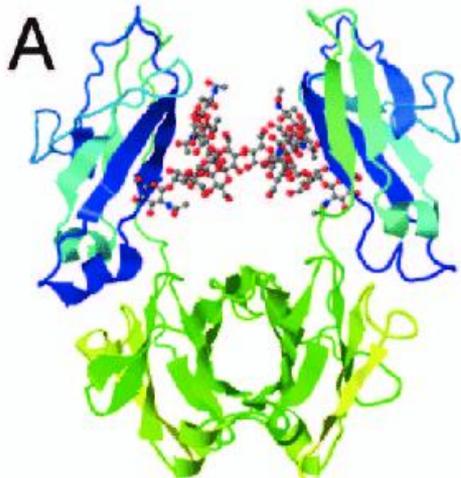
抗体的结构 — Fc区的糖基化

不同种属的细胞产生的糖基化序列是不一样的。

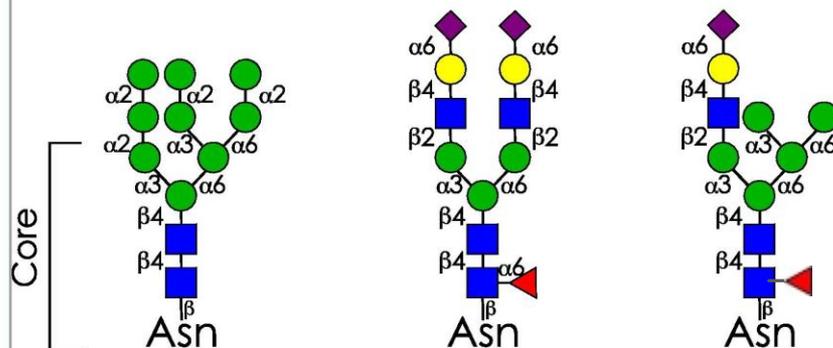
- ▶ 稳定蛋白结构
- ▶ 参与补体效应
- ▶ 对两个CH2域提供一定的相互作用力

抗体的糖基化特点：

- 糖基化片段较小，但结构和糖元高度多样化
- 根据结构大体可分为高甘露糖型、复杂型和杂交型
- 糖基片段一般两个主要分枝，其它分枝较少
- 不同于其它蛋白的糖基化，抗体的糖较少含唾液酸糖元
- 去除核心岩藻糖提高ADCC效应，
- 高甘露糖型抗体血中循环半衰期短一些
- 糖基结构与半衰期、Fc效应和抗体的免疫原性直接相关



N-glycan types



高甘露糖型
High Mannose

复杂型
Complex

杂交型
Hybrid

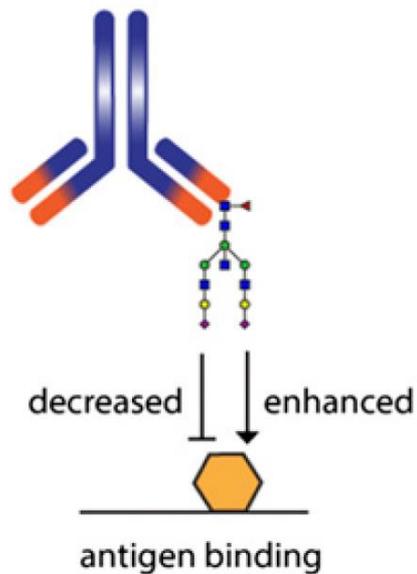
- N-Acetylglucosamine
- Mannose
- Galactose
- ▲ Fucose
- ◆ N-Acetylneuraminic acid

抗体的结构 — 重链可变区的糖基化

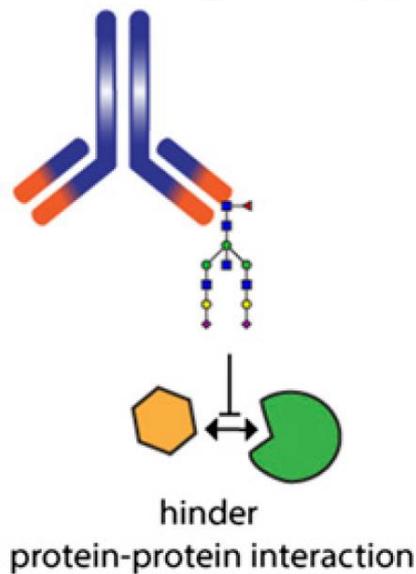
- 占总抗体数的15-20%，随某种生理条件下升高（病变或者怀孕）
- 重链可变区的糖基主要是复杂型二分枝糖基
- 含很多唾液酸糖元

功能：

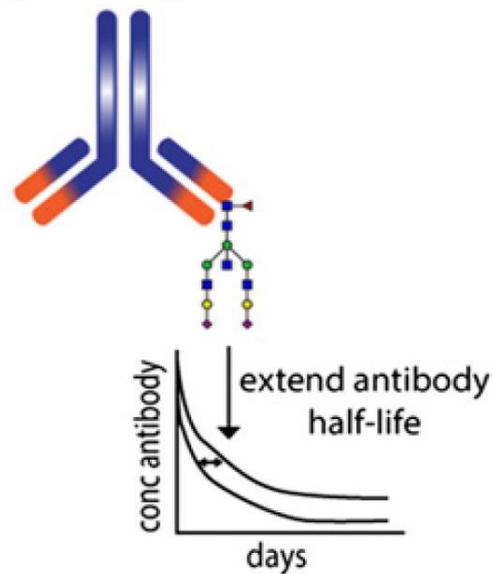
A. 降低或者增强抗原结合能力



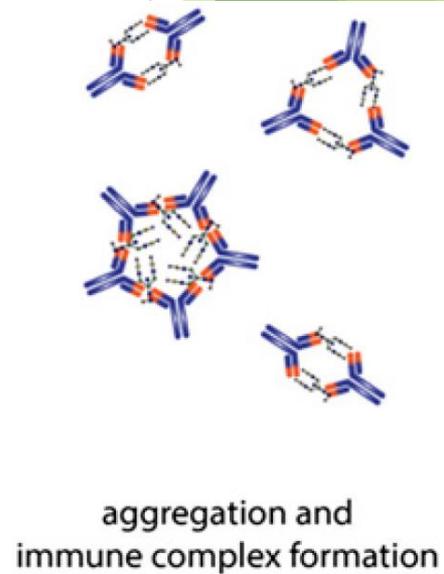
B. 结合一个抗原后阻止该抗原和另一个蛋白的结合能力



C. 延迟抗体血中半衰期



D. 提高稳定性，防止抗原聚集，特别是可变区之间的聚集



抗体的结构 — 双硫键

12对域内双硫键，4对链间双硫键。各个双硫键对还原剂的稳定性是不同的。

- 抗体总有部分巯基裸露，裸露越多抗体越不稳定
- 碱性条件下，双硫键可被 β -elimination可逆改变，
- 链内双硫键比链间双硫键稳定
- 在非变性条件下，只有链间双硫键可以被还原（兔抗体除外）

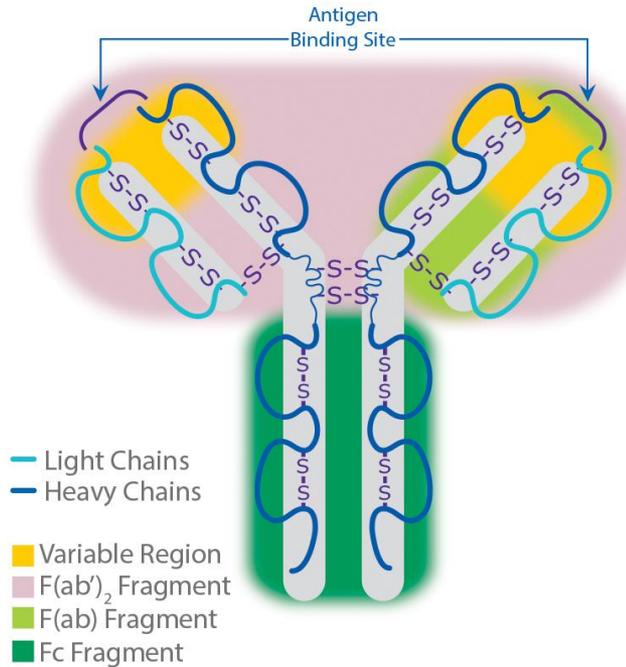
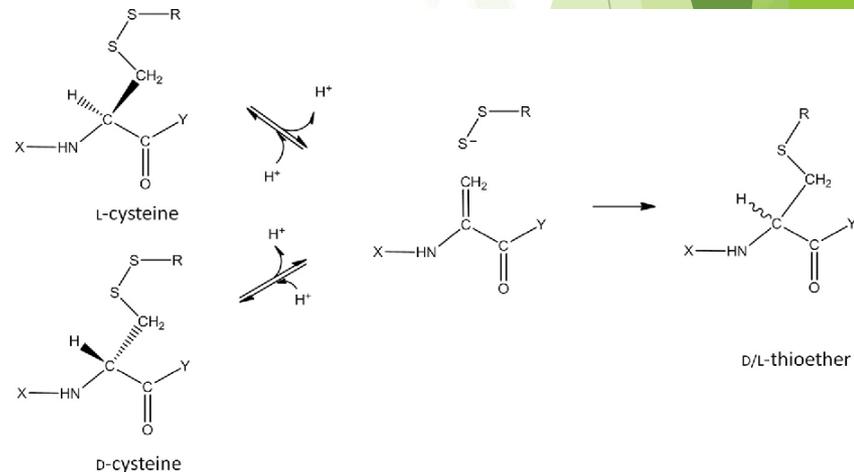


Table 1. Level of free sulfhydryl in IgG

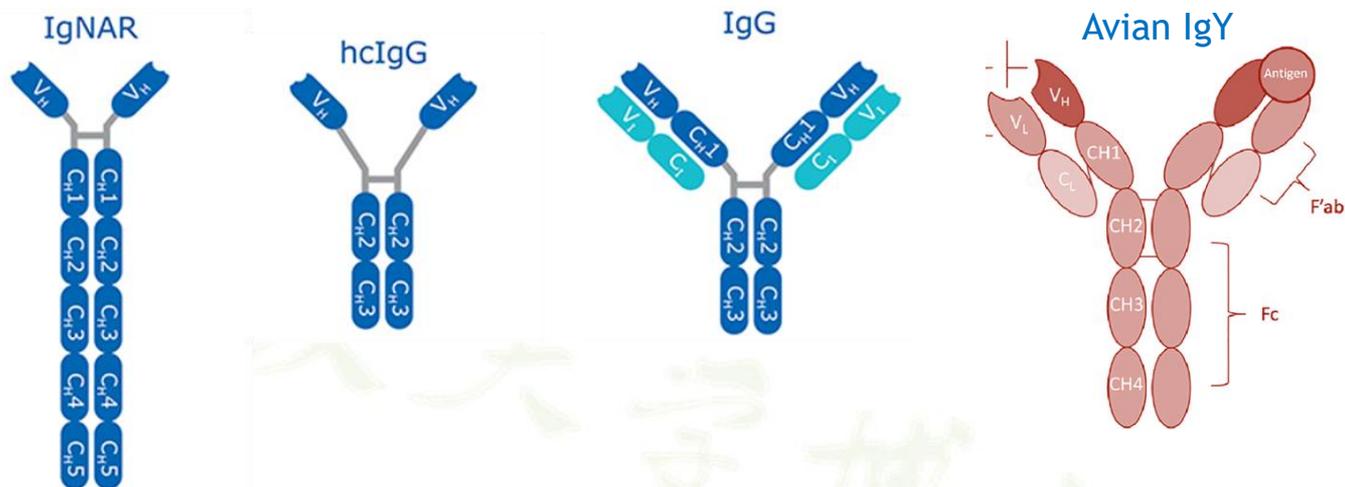
Type of IgG	Mole of free SH/Mole of IgG		Reference
	Native	Denatured	
Human IgG ₂	0.24	ND*	28, 29
Human IgG ₁	0.1–1.1	0.6–4.0	30
Human IgG ₁ , IgG ₄ and recombinant IgG ₄	ND*	0.9–2.2	31
Recombinant IgG ₁ , IgG ₂ and IgG ₄	0.02–0.08	0.08–0.09	32
Recombinant IgG ₁	ND*	0.64	33
Recombinant IgG ₂	0.06	0.59	34
Recombinant IgG ₂	0.158	0.379	35

ND*, not determined.

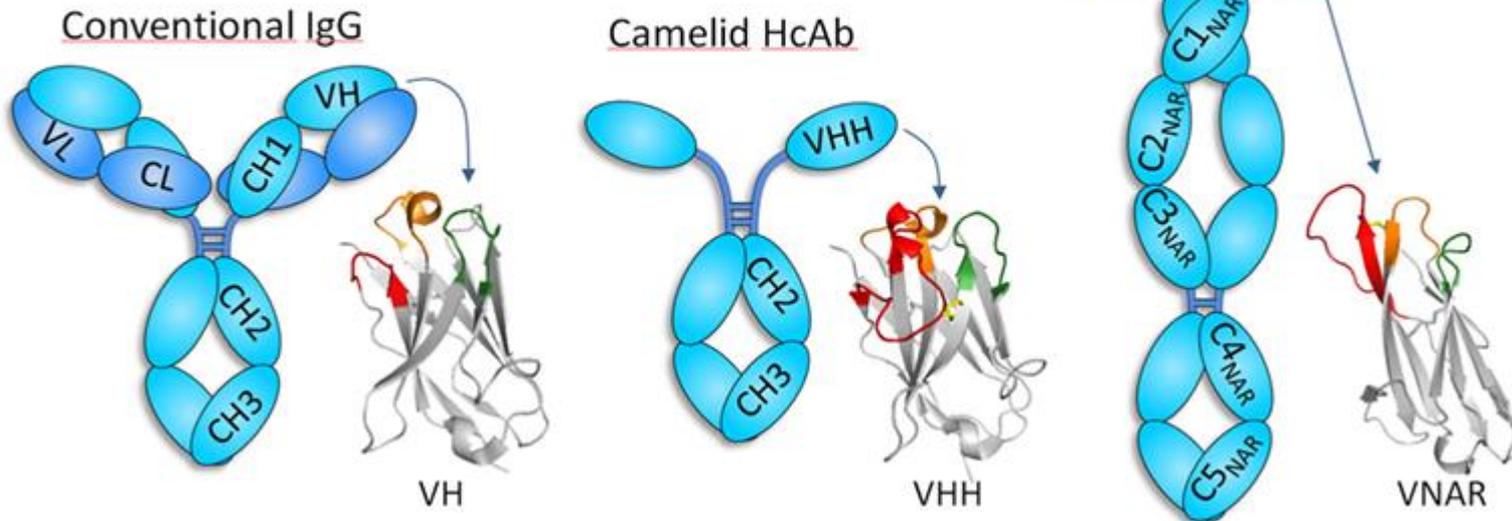
MAbs. 2012 Jan-Feb; 4(1): 17-23



抗体的结构 — 物种区别

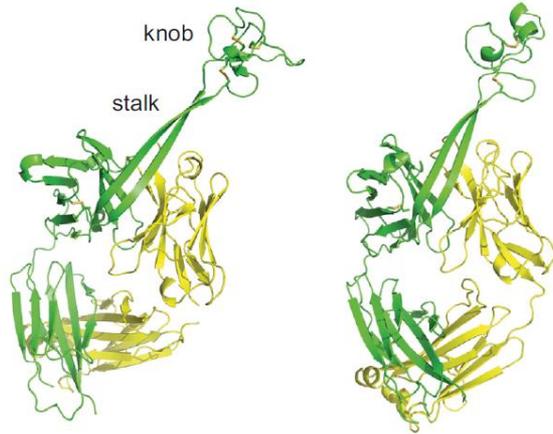


- 尽管不同的物种与氨基酸序列，三种抗体具有相似的三维结构



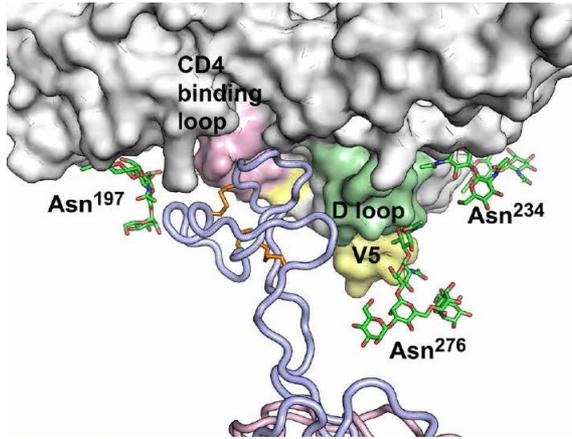
抗体的结构 — 物种区别

独树一帜的牛抗体

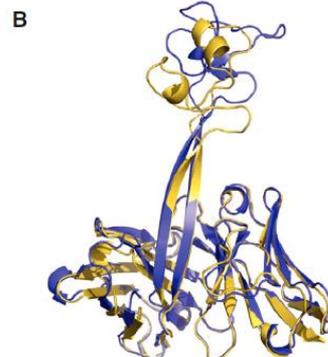
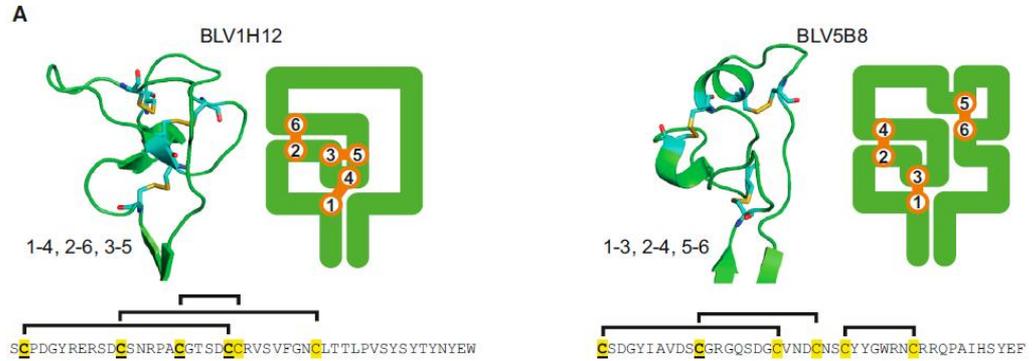
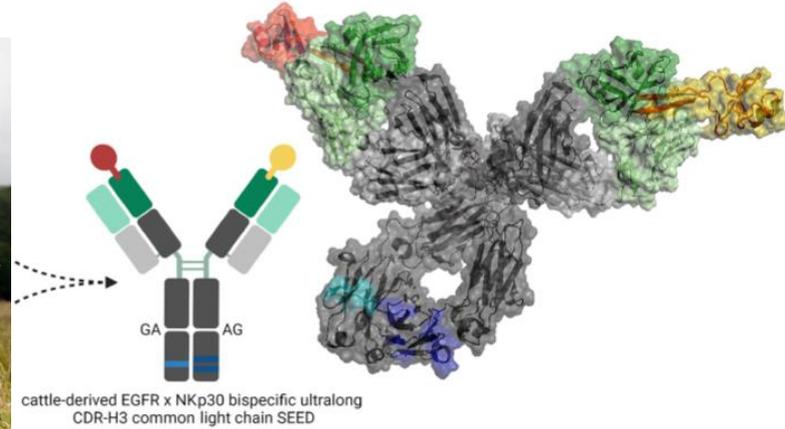


BLV1H12

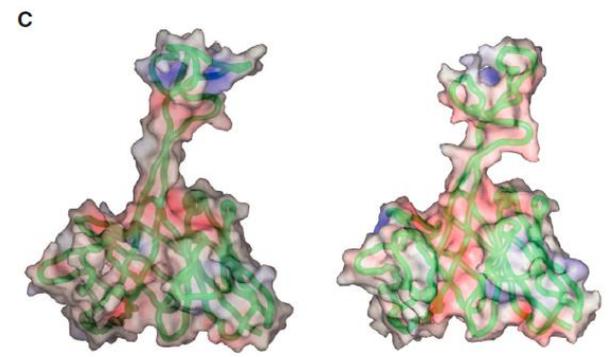
BLV5B8



超长CDR3在抗艾滋病抗体中常见



BLV1H12/BLV5B8



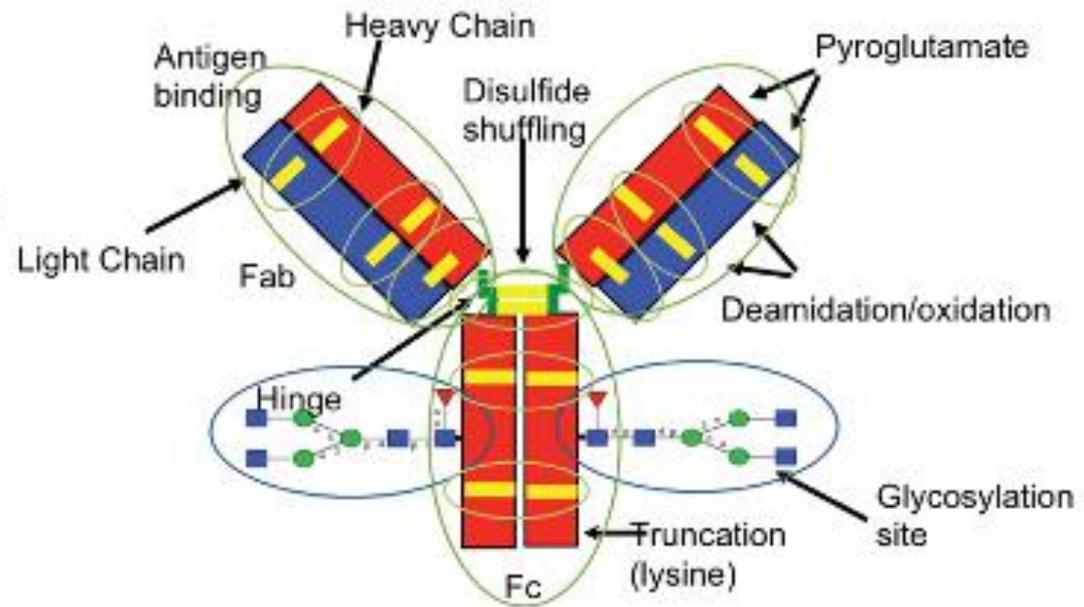
BLV1H12

BLV5B8

抗体复杂结构与潜在变化

A Complex Glycoprotein has Many Sites of Potential Instability

- Aggregation from favorable intermolecular interactions
- Deamidation of Asparagine & Glutamine
- Oxidation of Methionine, Cystine & Tryptophan from oxygen & peroxides
- Truncation of labile C-terminal Lysine
- Cyclization of N-terminal glutamine to form pyroglutamate
- Peptide-bond cleavage due to residual protease impurity



抗体的几个重要概念

isotype, allotype and idiotype

同种型 (isotype) :同一物种内所有个体共同具有的Ig抗原特异性结构。

比如IgG, IgA, IgM等之间的区别就叫同种型。

物种间

同种异型 (allotype) :同一物种内不同个体间的抗体在恒变区氨基酸序列方面的差别。

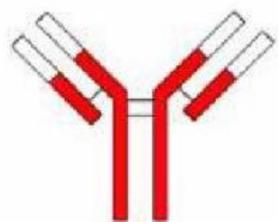
个体间

两个不同的人产生的抗体在氨基酸序列方面可能不同, 体现在恒变区, 就叫同种异型抗体

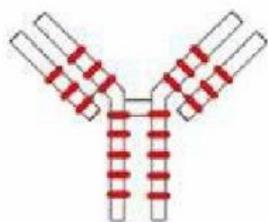
独特型 (idiotype) :同一个体内不同B细胞产生的抗体其可变区各具自备独特的抗原决定簇结构。每个抗体的V区存在5-6个个体特异性的氨基酸结构, 称为独特位(idiotope)。

细胞间

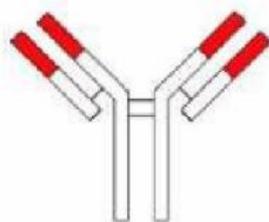
同一个人体内, 不同的B细胞群产生的抗体在可变区氨基酸序列方面可能不同, 这个不同不一定在CDR上面, 可能在CDR上, 可能在CDR附件, 也可能远离CDR



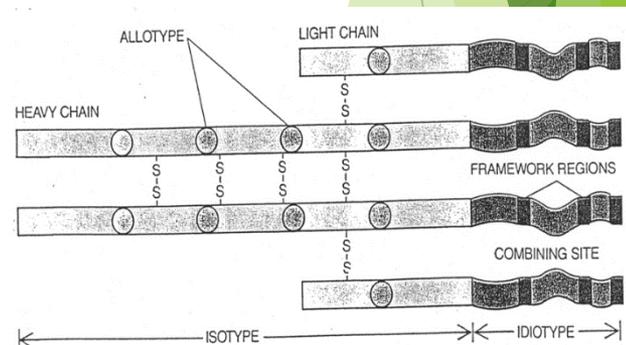
同种型



同种异型



独特型



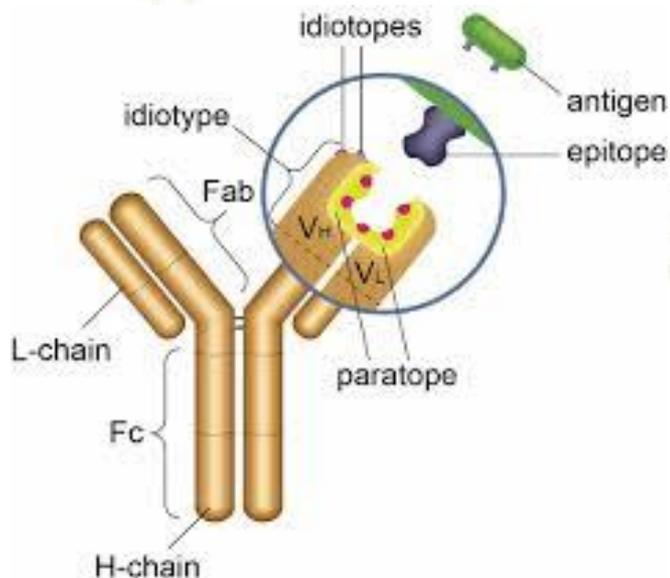
抗体的几个重要概念

epitope, idiotope and paratope

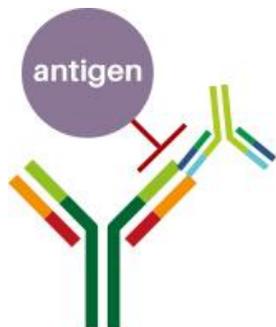
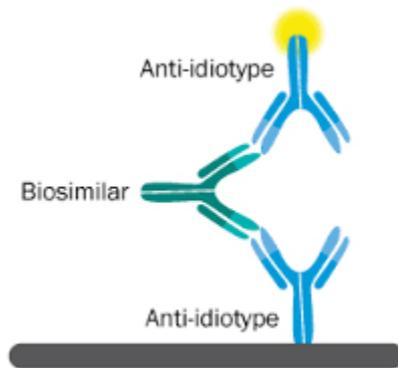
Epitope: 抗原表位, 抗原决定簇

Paratope: 互补位, 抗体决定簇

Idiotope: 独特表位 (位于可变区内, 为抗体独特型的表位)



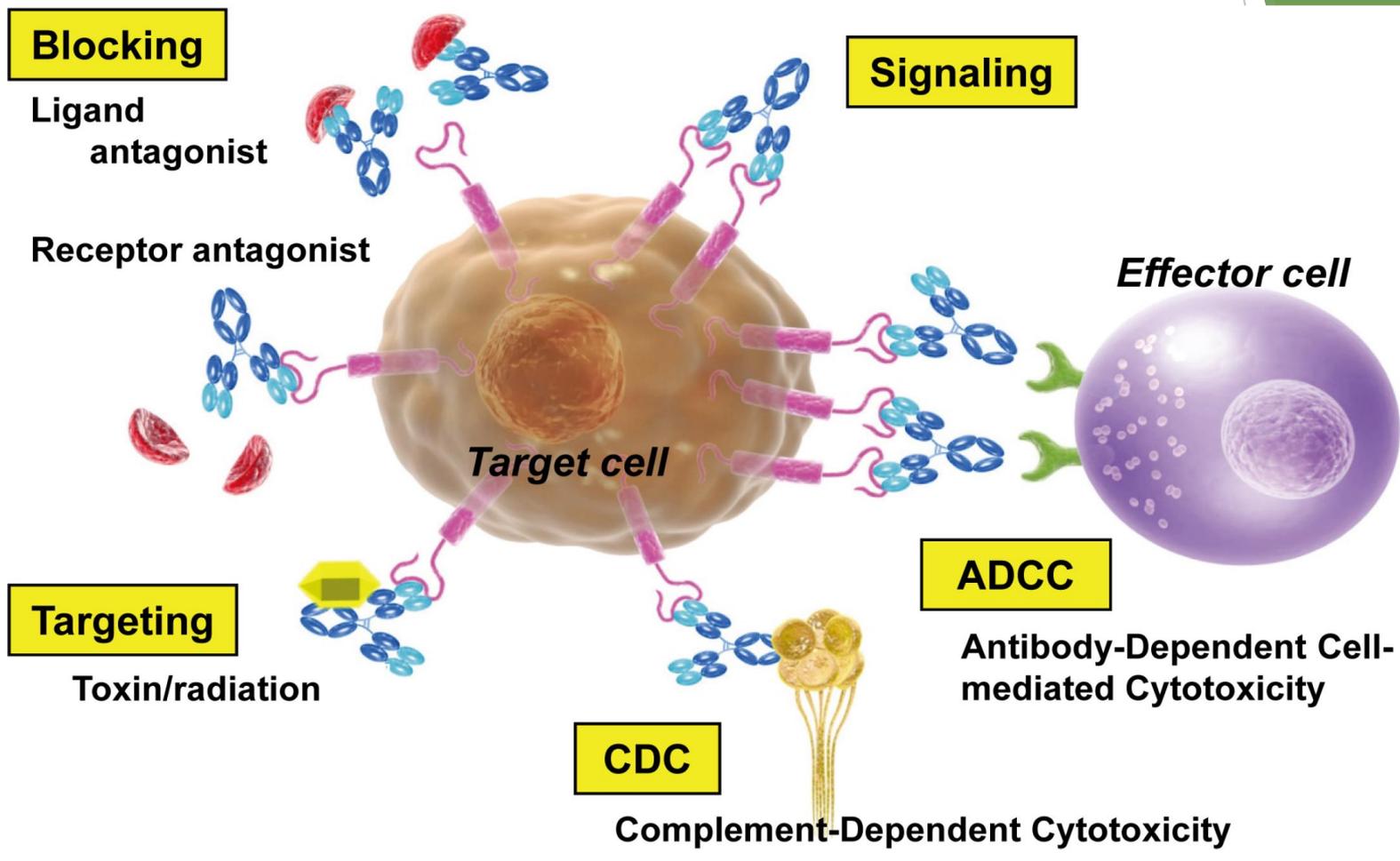
抗独特型抗体
Anti-idiotype antibody



Anti-idiotype Antibody

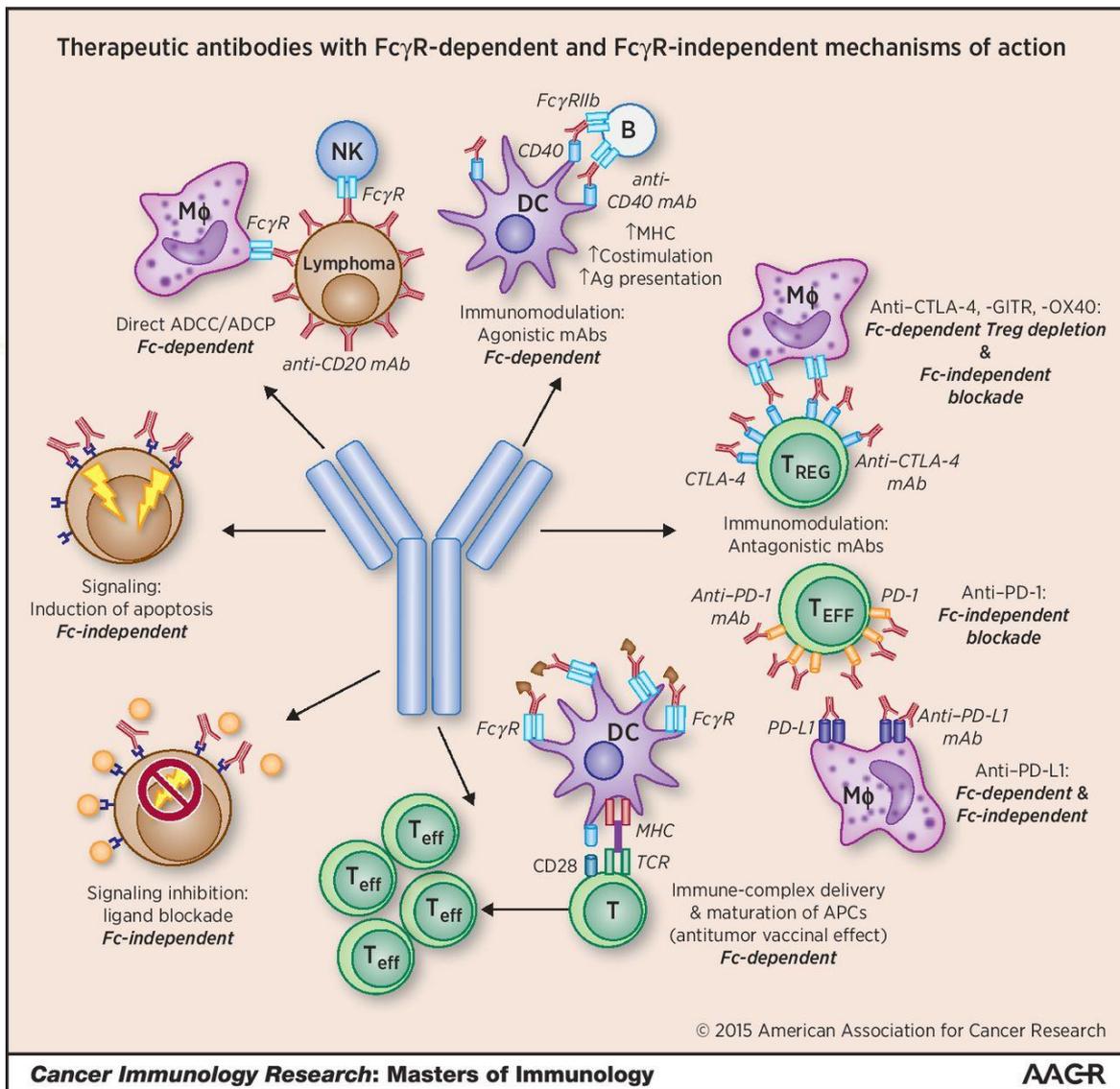


抗体的疾病治疗原理



antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and antibody dependent cell mediated phagocytosis (ADCP).

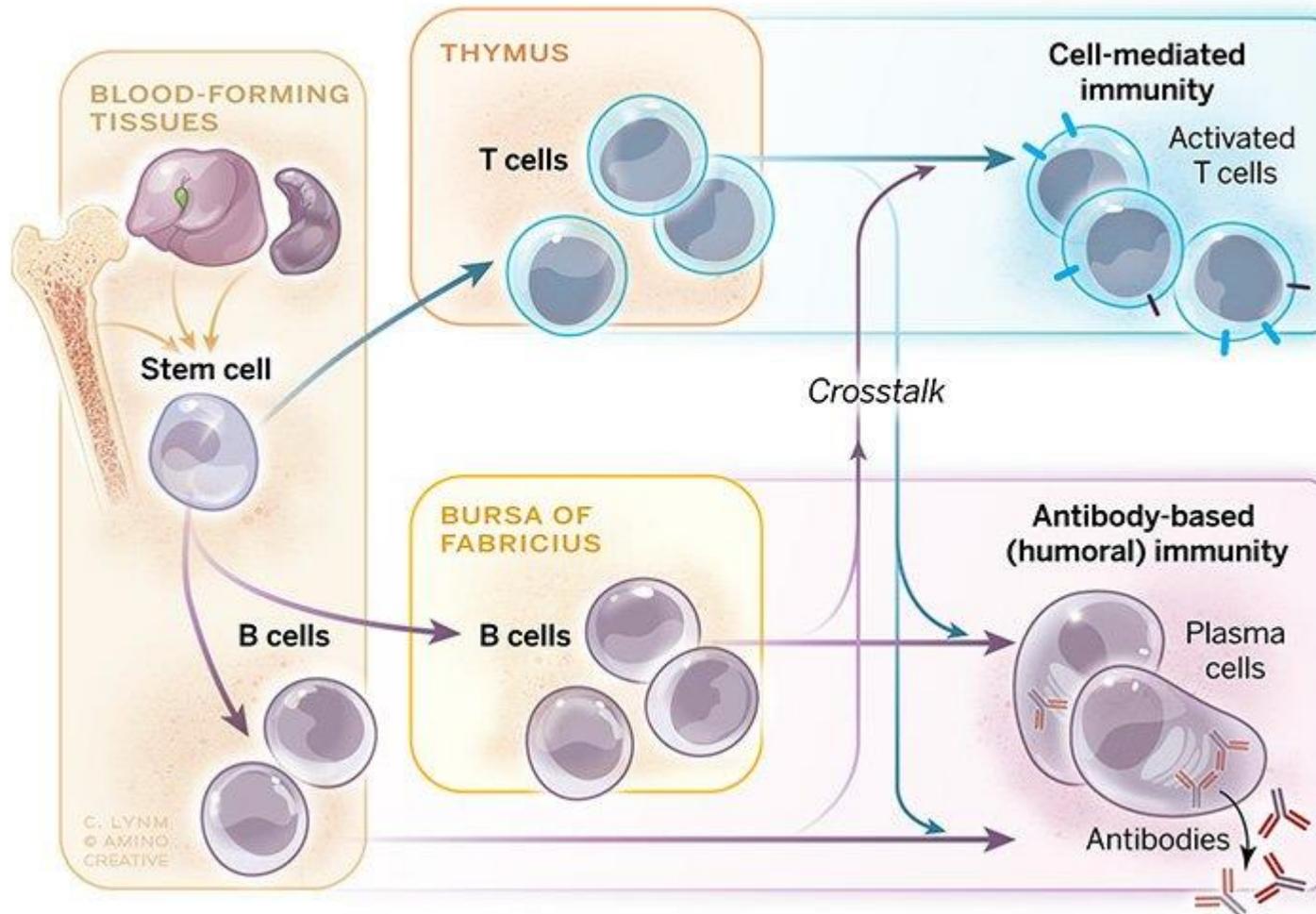
抗体的疾病治疗原理



抗体的疾病治疗原理（免疫系统）

Dual-armed defense system

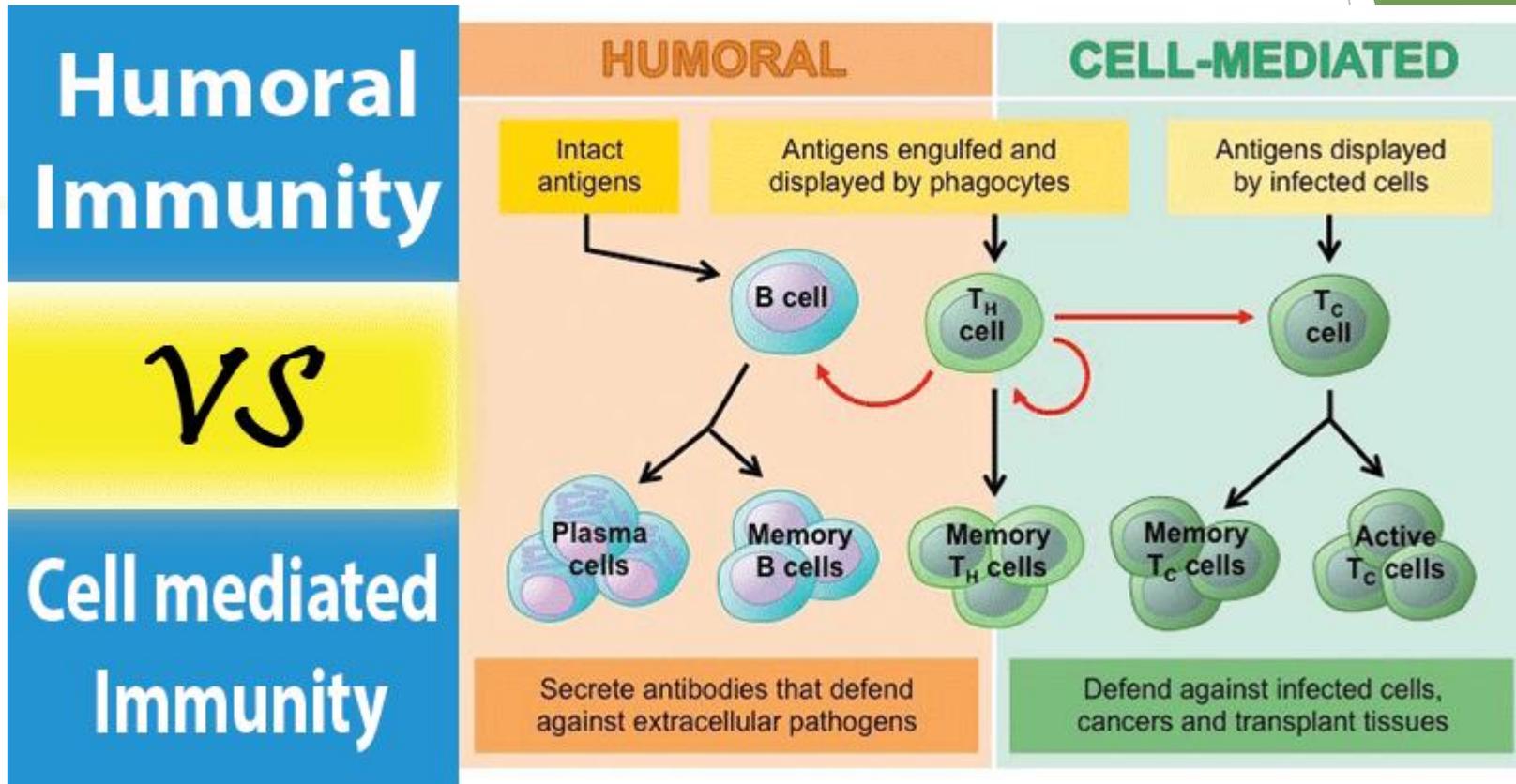
Two-lymphocyte lineage model of adaptive immunity



细胞免疫

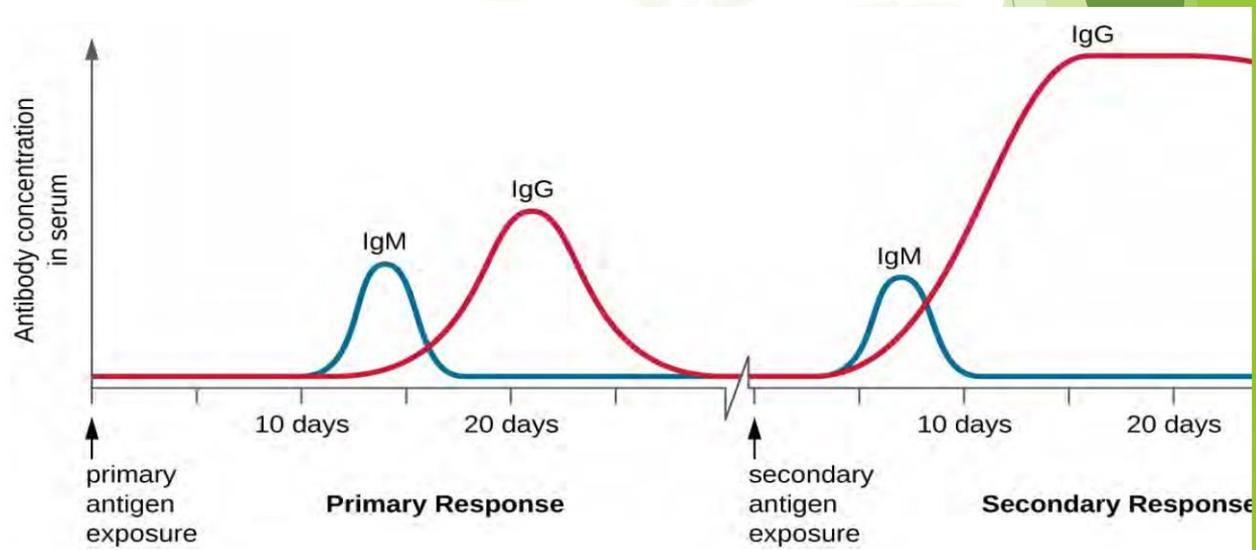
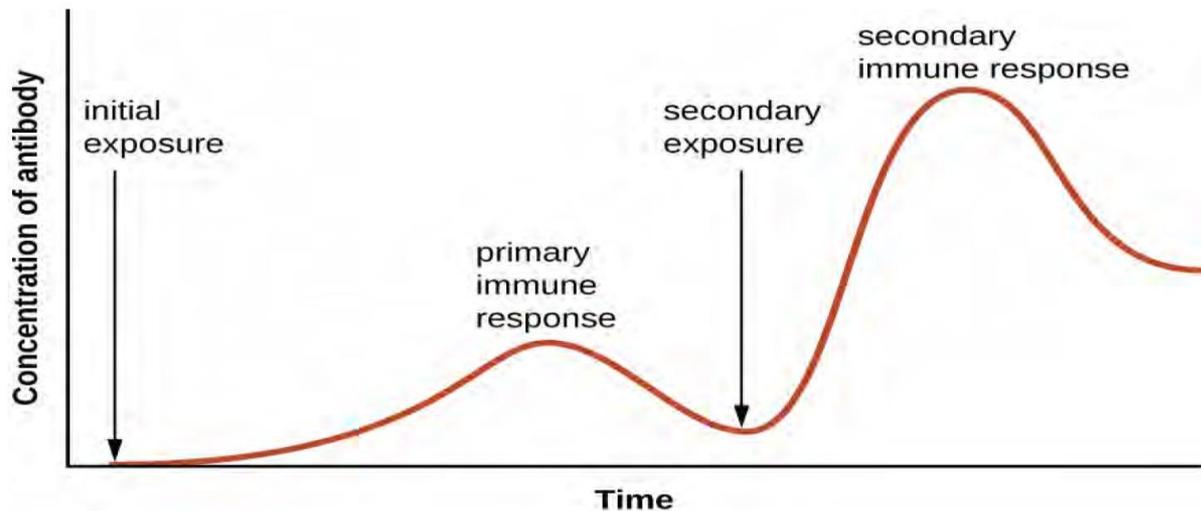
体液免疫

抗体与免疫



抗体与免疫

接触抗原后，机体先产生IgM，再产生IgG。



抗体的疾病治疗原理

https://www.kyowakirin.com/antibody/about_antibody/mechanism.html

