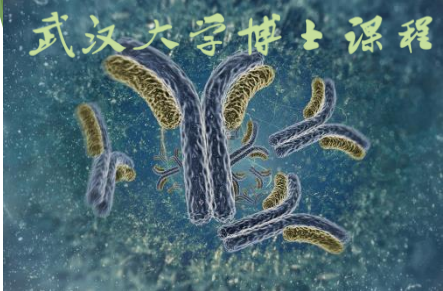


武汉大学博士课程之

现代药学研究新进展

教师：台万一

武汉大学药学院



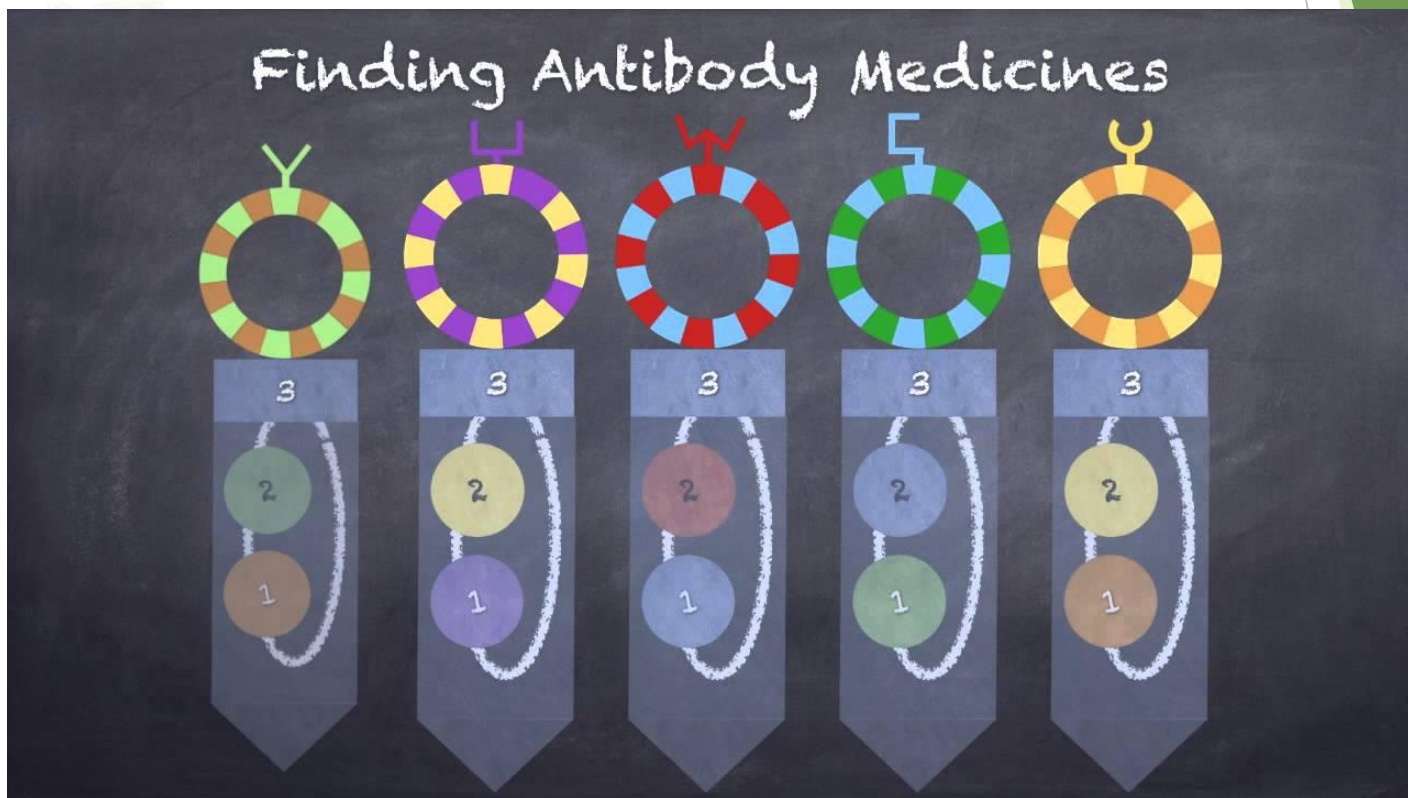
内容概要

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

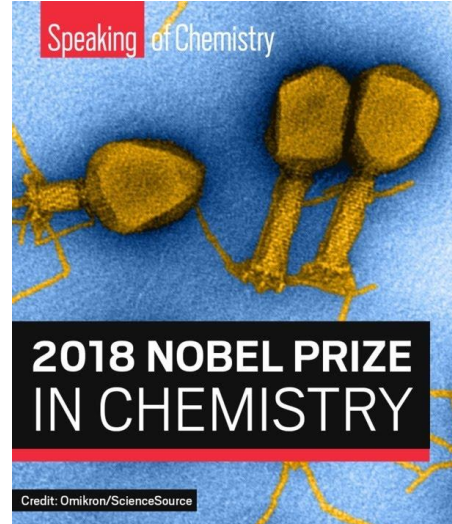
II. 细胞疗法的研究与应用（CAR-T）

第二节 抗体筛选技术：



抗体筛选技术

- 杂交瘤技术
- 展示技术
- B细胞的单细胞PCR分析
- 深度测序



George P. Smith

Table 1. Other typical methods used for studies characterizing the genetics of human (auto-)antibody responses

Method	Production of mAb	Sequencing	Selection bias ¹	Advantages	Disadvantages
Antibody phage display	scFv, Fab (Ig)	Directly from phage display vector	+	Relative ease of screening, sequencing, and production of soluble protein; depth of coverage; ease of adapting isotype-specific applications	Random pairing of VH and VL, tedious Ig production (subcloning required)
■展示技术					
Heterohybridoma	Ig	RT-PCR	+	<i>In vivo</i> VH/VL pairing, production of full-length Ig	EBV/unselected fusions often yield IgM, instability phenomena and inefficient isolation, expensive culturing
■杂交瘤技术					
Single B-cell PCR	(Ig)	RT-PCR	+	<i>In vivo</i> VH/VL pairing	Difficult mAb production (subcloning), difficult for rare clones
■B细胞的单细胞PCR分析					
Deep sequencing	None	From any nucleotide source	–	No selection bias, calculation of frequencies	Necessary trade-off of sequencing length and read number; no pairing of VH and VL for analysis
■深度测序					

Advancements and combinations of the methods detailed above may pave the way for future studies of unparalleled depth and accuracy (see DeKosky *et al.*, 2013, and others).

EBV, Epstein–Barr virus; scFv, single-chain variable fragment; VH, variable heavy; VL, variable light.

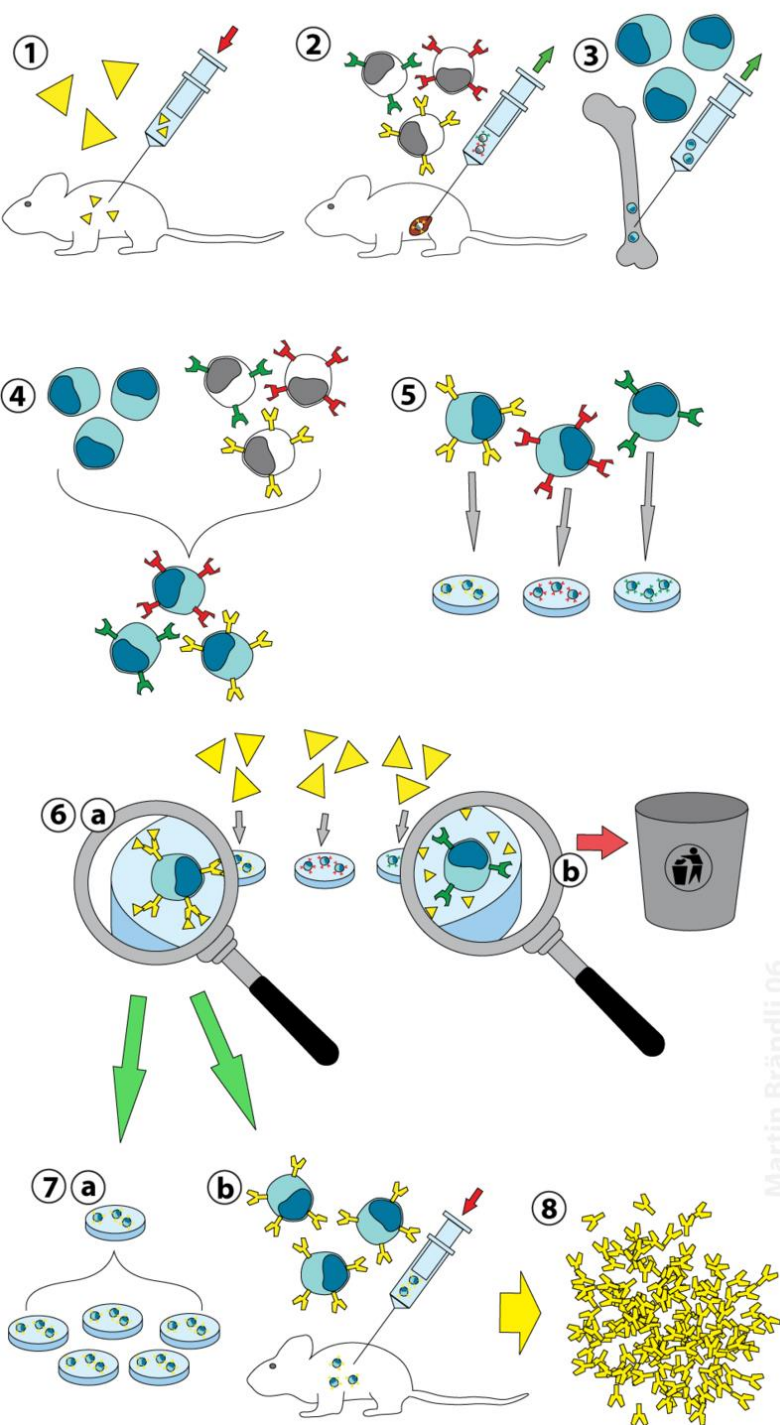
¹Selection bias may result from differences in phage growth rates, instability of cell fusions, or limited numbers of B cells analyzed by single B-cell PCR.

These effects may lead to nonrepresentative (biased) distributions of the parameters analyzed.

Journal of Investigative Dermatology (2013) 134, e17

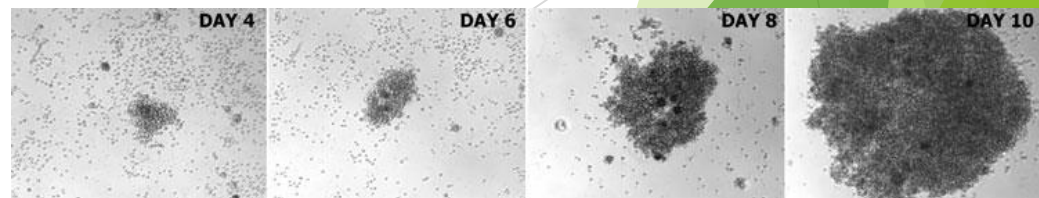
传统抗体筛选技术

杂交瘤技术筛选抗体



- (1) Immunisation of a mouse
- (2) Isolation of B cells from the spleen
- (3) Cultivation of myeloma cells
- (4) Fusion of myeloma and B cells
- (5) Separation of cell lines
- (6) Screening of suitable cell lines
- (7) in vitro (a) or in vivo (b) multiplication
- (8) Harvesting

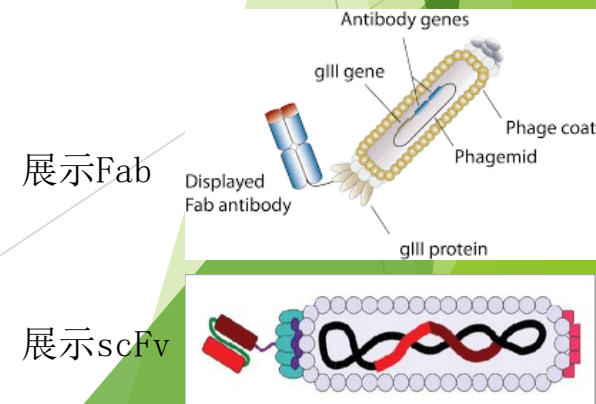
杂交瘤细胞的单克隆生长



噬菌体的生命周期

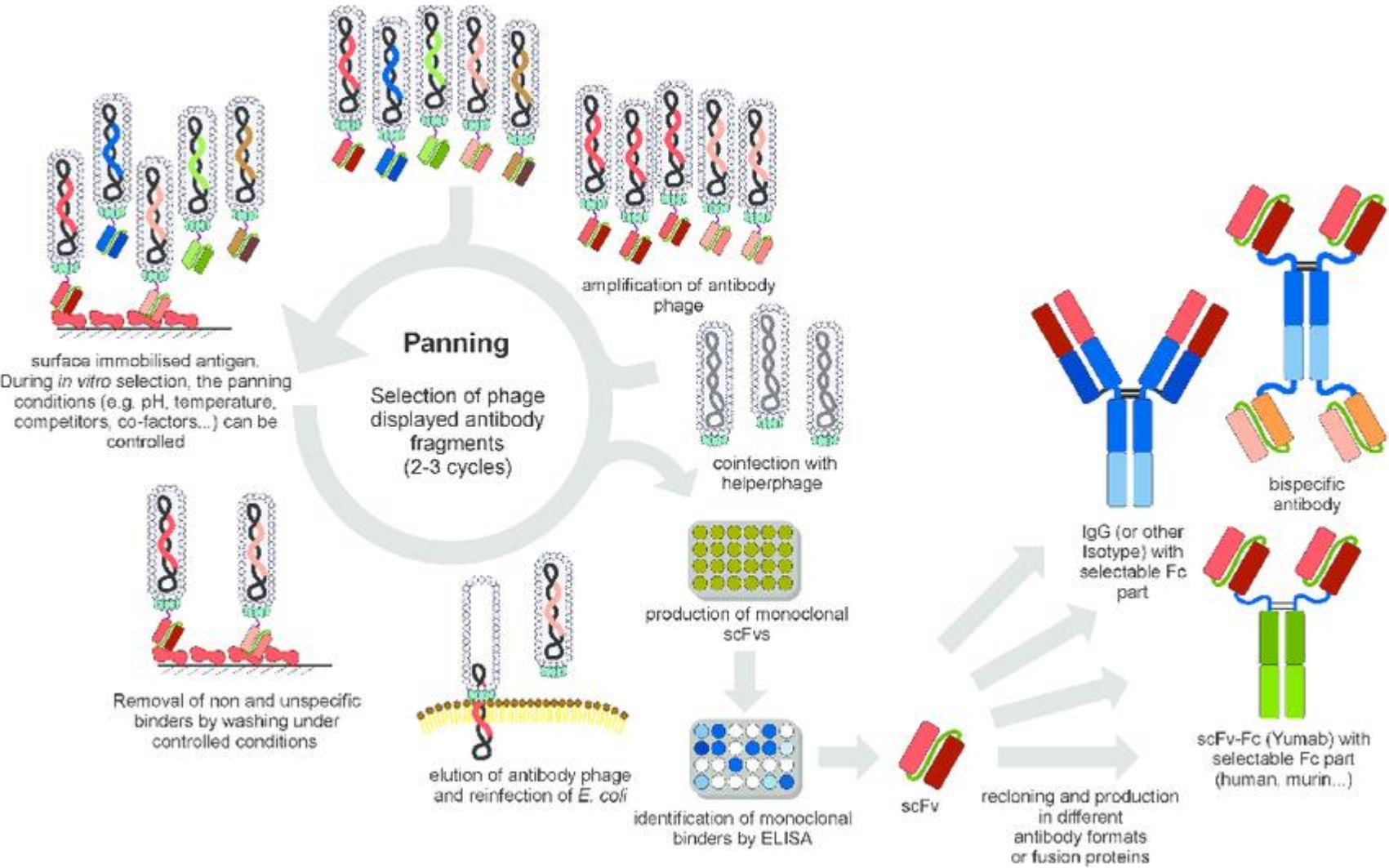


噬菌体通过5个触角接触细菌



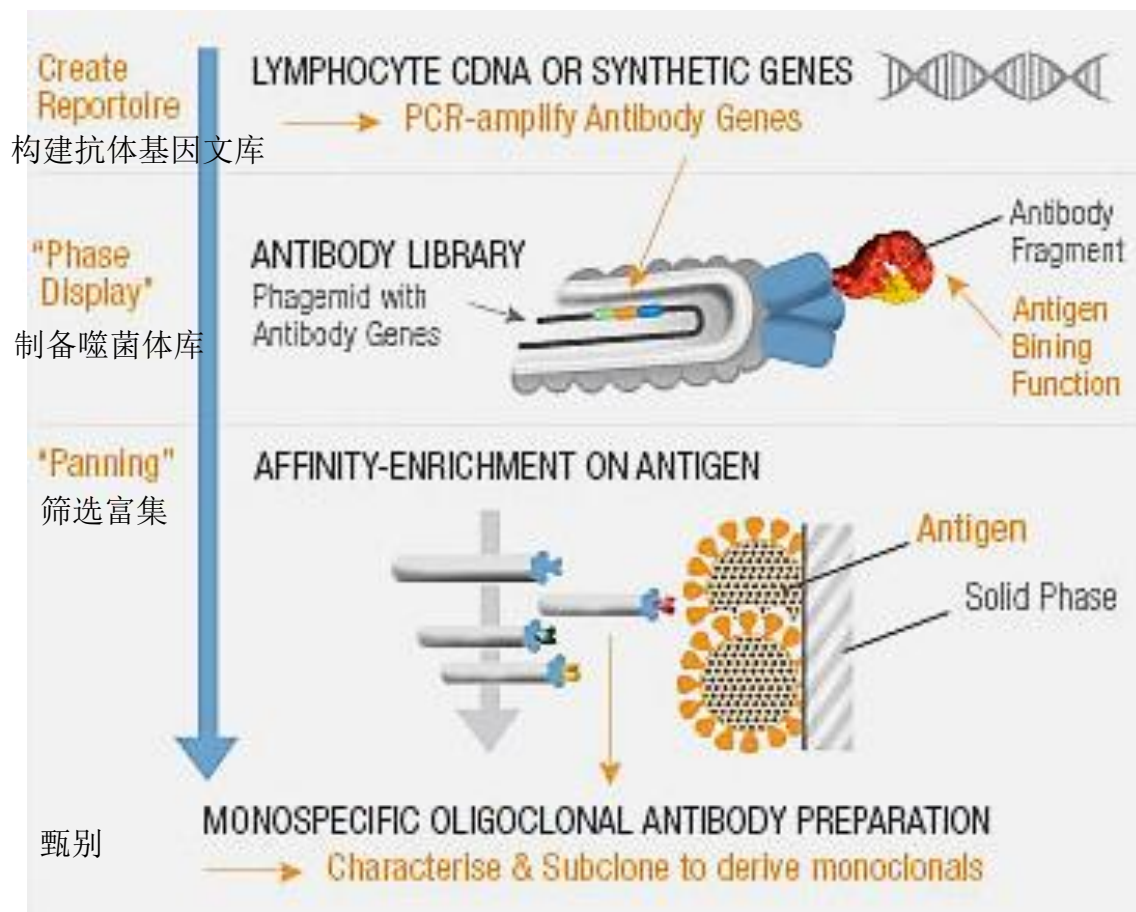
噬菌体展示与抗体重建

噬菌体展示技术是将多肽或蛋白质的编码基因或目的基因片段克隆入噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置，在阅读框正确且不影响其他外壳蛋白正常功能的情况下，使外源多肽或蛋白与外壳蛋白融合表达，融合蛋白随子代噬菌体的重新组装而展示在噬菌体表面。被展示的多肽或蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性，以利于靶分子的识别和结合。肽库与固相上的靶蛋白分子经过一定时间孵育后，洗去未结合的游离噬菌体，然后以竞争受体或酸洗脱下与靶分子结合吸附的噬菌体，洗脱的噬菌体感染宿主细胞后经繁殖扩增，进行下一轮洗脱，经过3轮~5轮的“吸附-洗脱-扩增”后，与靶分子特异结合的噬菌体得到高度富集。





噬菌体展示流程

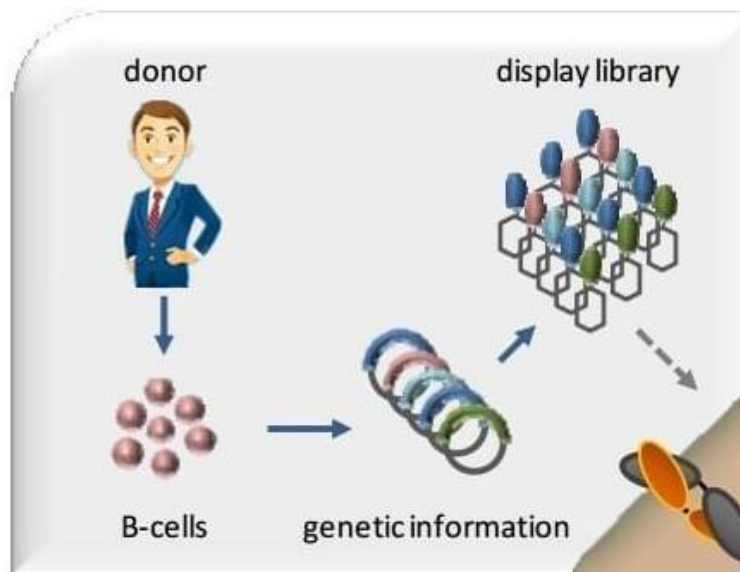


多样性，针对性

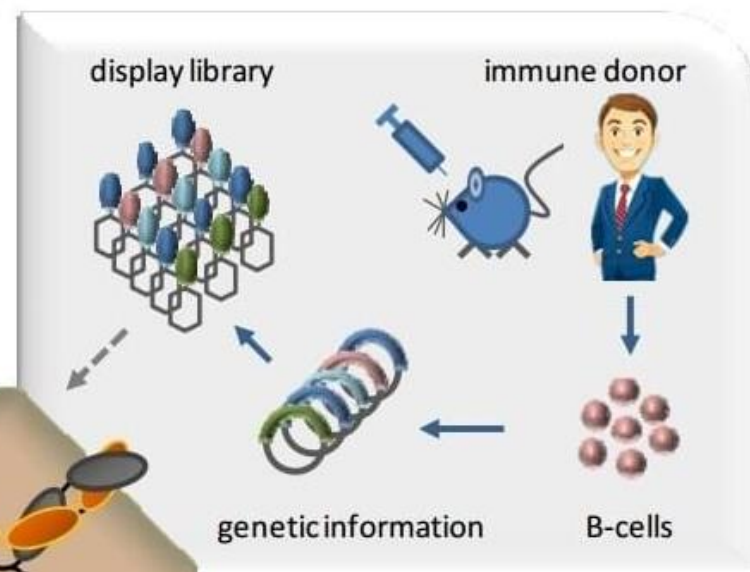
课程

抗体基因文库的来源

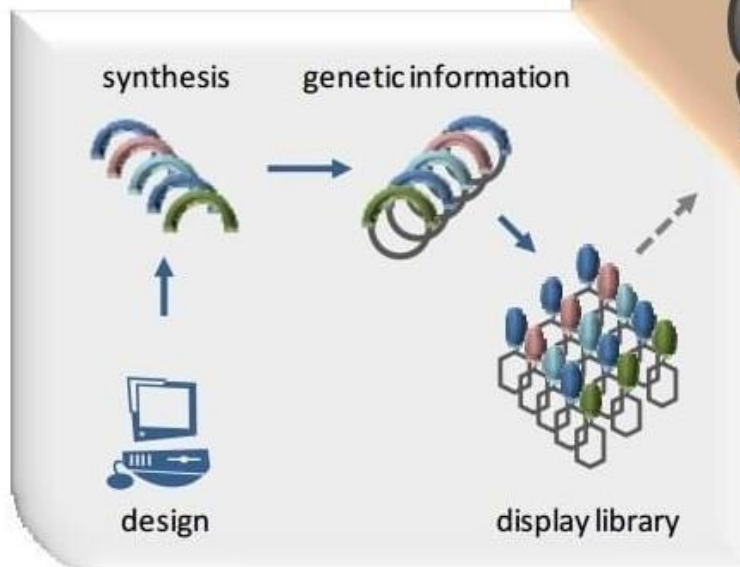
A Naïve Library



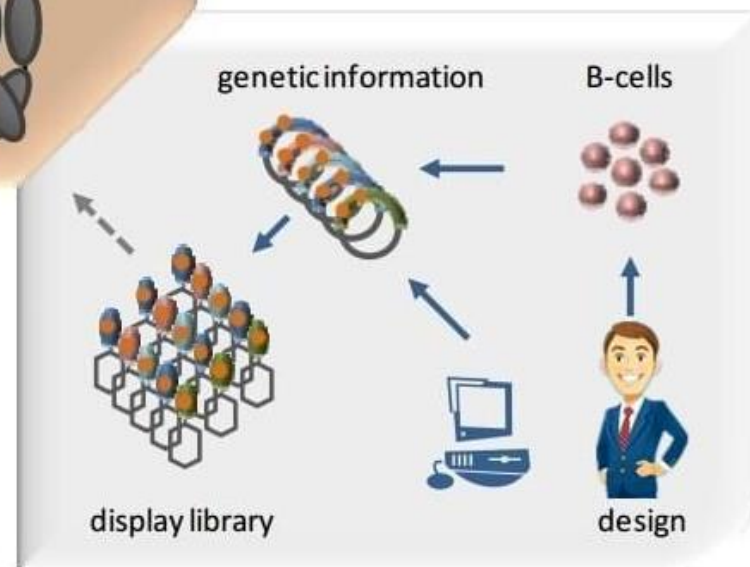
B Immune Library



C Synthetic Library



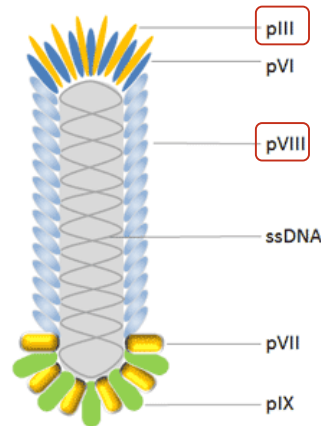
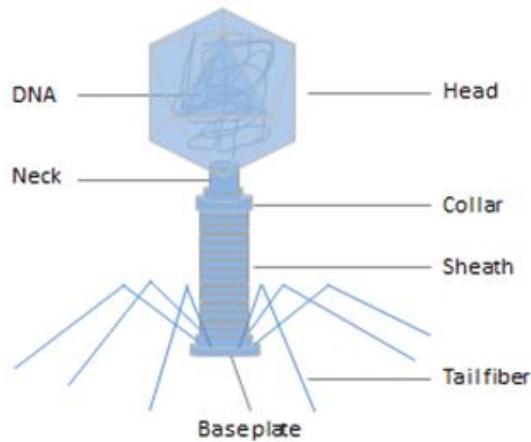
D Semi-Synthetic Library



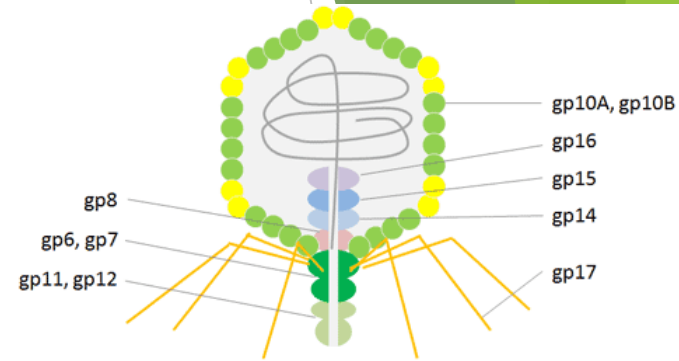
噬菌体库的构建 - 噬菌体种类

库容量：10-100亿个不同个体

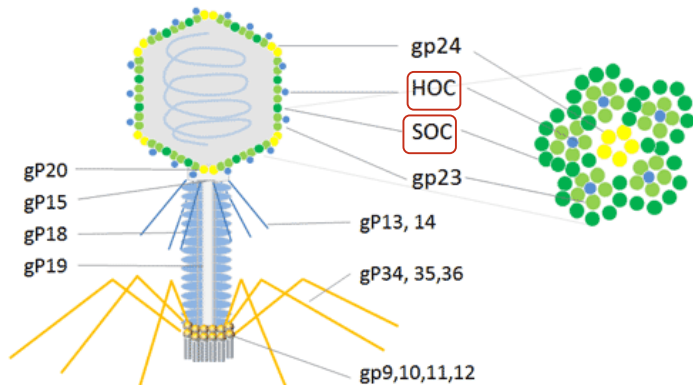
噬菌体及结构



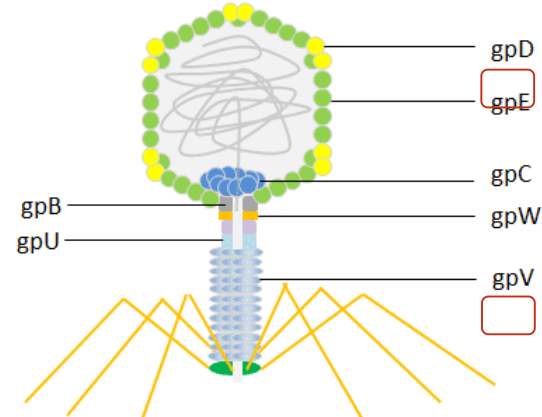
M13 phage
800 nm x 6 nm
ssDNA



T7 phage
80 nm x 50 nm
dsDNA



T4 phage
200 nm x 90 nm
dsDNA



Lambda phage
200 nm x 50 nm
dsDNA

噬菌体库的构建

用于抗体展示用途的各种噬菌体的特点 (Ebrahimizadeh and Rajabibazl 2014)

	M13型噬菌体	T4型噬菌体	T7型噬菌体
Genome Size	6407 bp	168895 bp	39937 bp
Display Protein	All coat proteins, usually pIII and pVIII	SOC and HOC	gp10B
Display Size	>110 kDa on pIII <10 kDa on pVIII	<710 kDa	<132 kDa
Display Density	<5 copies on pIII <2700 copies on pVIII	<810 copies on SOC <155 copies on HOC	<415 copies
Lifecycle	Non-lytic	Lytic	Lytic

筛选方法

1. 皿表面或者珠表面筛选 (biopanning技术)

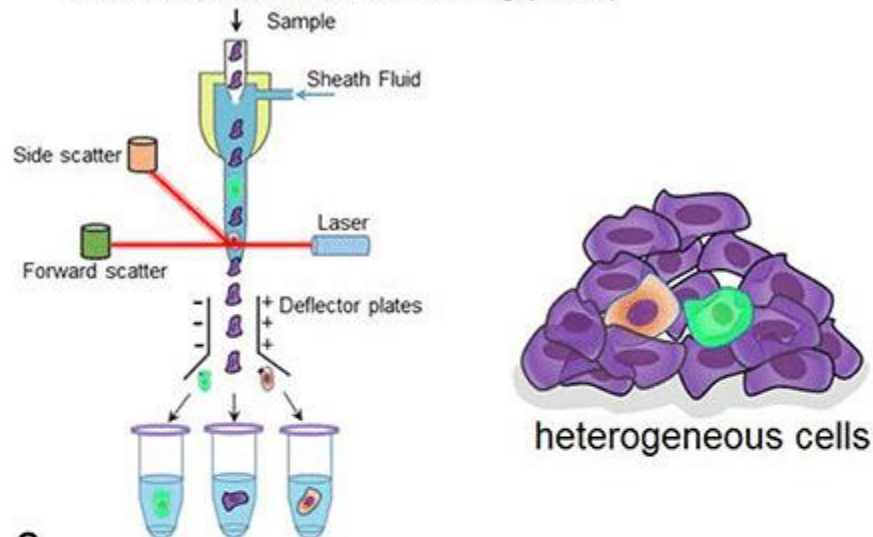
2. 细胞表面筛选 (cell sorting技术)

3. 动物体内筛选

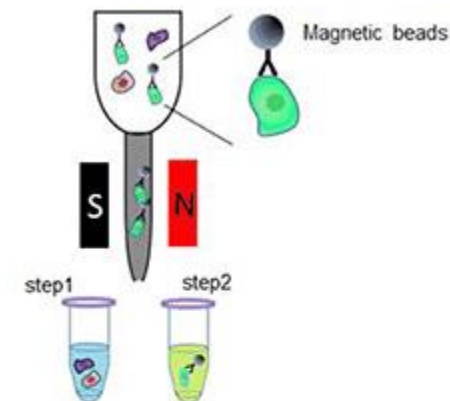
4. 体外体内结合筛选

单克隆挑选方法

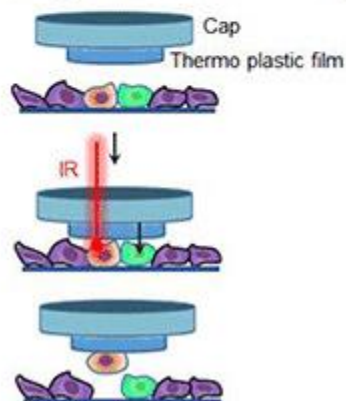
A Fluorescence activated cell sorting (FACS)



B Magnetic activated cell sorting (MACS)



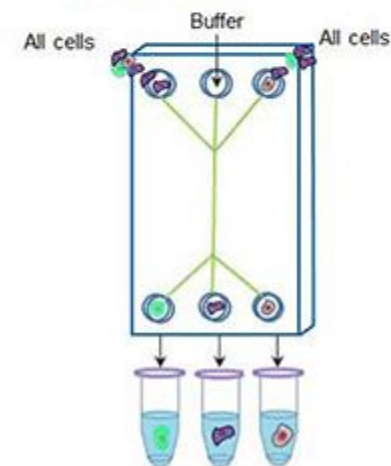
C Laser Capture Microdissection (LCM)



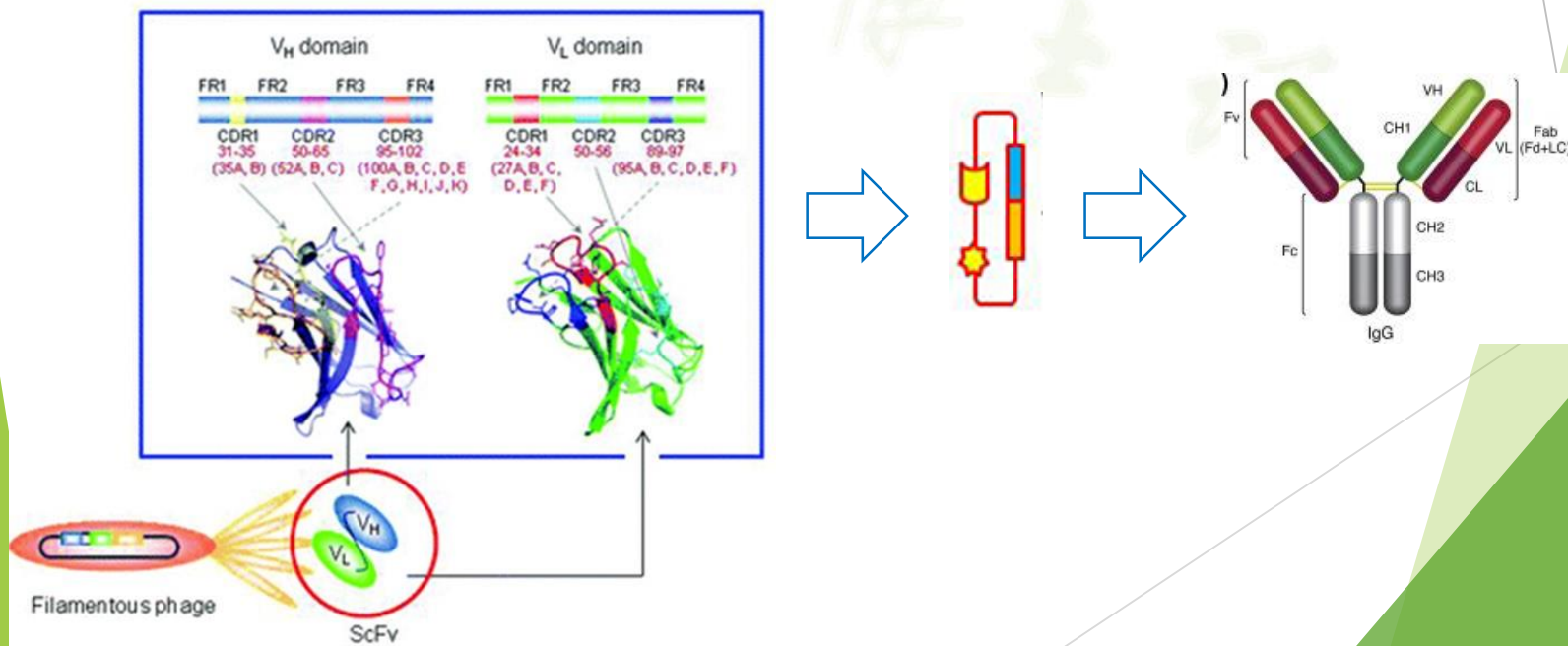
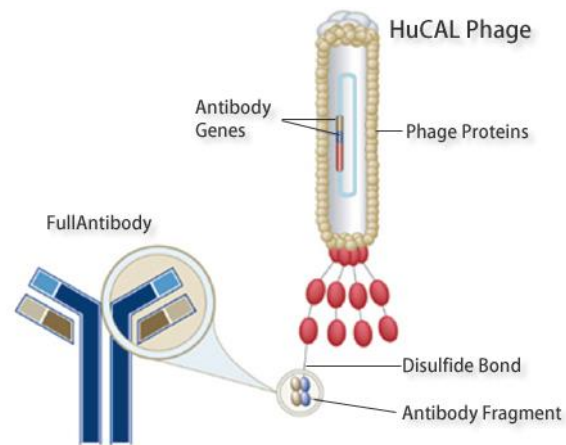
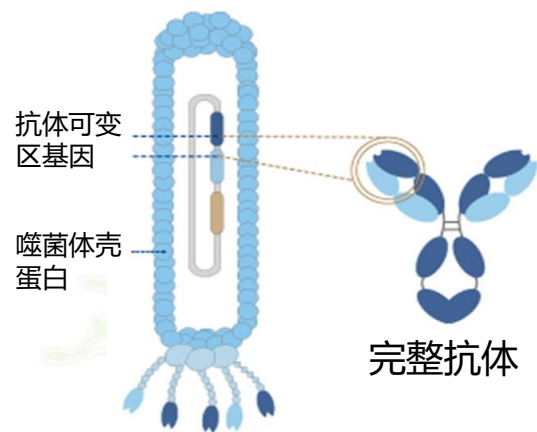
D Manual cell picking



E Microfluidic



抗体结构重建



其他展示方法

- 酵母展示

10^7 - 10^9 for yeast vs 10^{10} to 10^{11} for phage

- 细菌展示

- 细胞展示

- ribosome display

全人源抗体的筛选

全人源抗体是未来趋势

2020年全人源抗体药物开发项目不下93个，约占所有在研单克隆抗体的38%，相比已上市抗体药中约31%的全人源抗体占比，已有明显的提高，体现了抗体全人源化的发展趋势。

全人源抗体筛选技术分类

1. 转基因动物

即在转基因动物上筛选全人源抗体。转基因动物一般是将小鼠或者大鼠的免疫系统基因，部分的或者全部的转换为人的免疫体系，从而让小鼠免疫后产生的抗体是人源化序列。比如Kymouse是将人抗体的可变区基因转入小鼠基因组，而保留小鼠抗体的恒定区基因。

转基因动物的制备技术具有较高的技术壁垒，因此时至今日，成熟的技术平台依然屈指可数。45个相关的抗体分子，几乎均出自Xenomouse、Velocimmune、HuMab mouse、KM Mouse和Kymouse这5个转基因小鼠。

技术难点：如何在保证免疫系统发育和功能不受明显影响的前提下更好地模拟人的BCR库的产生

2. 体外抗体库筛选技术

相对于转基因动物，抗体库技术的门槛相对较低。但是传统的抗体库由于轻重链错配等现象的存在，加之初步筛选仅以亲和力为衡量标准，并且很多筛选是体外进行，筛选到的抗体分子的质量很难保证，因此基于这类平台的抗体研发一度成功率很低。

目前已上市的抗体药物中，源于体外抗体库筛选技术的抗体占比仅10%左右。而对于抗体库的优化（前面部分已讲到），有助于提高成功率。

技术难点：如何在保证足够库容量的前提下不断优化抗体分子的成药性

全人源抗体筛选技术分类

3. B细胞分选技术

B细胞分选技术的核心是从人体的免疫系统中挑选出针对特定抗原的B细胞，并将其BCR开发为重组单克隆抗体。

筛选策略分为两种：一种是从患者或经过疫苗免疫的志愿者体内抽取外周血，再借助流式分选技术挑选出与抗原具有结合能力的BCR进一步开发，比如Aridis公司的MabIgX技术平台；

另一种是通过分析对特定疾病具有抵抗能力的人进行免疫系统的深度分析，寻找具有富集现象的BCR序列，再做进一步检测，典型代表是Neurimmune公司的RTM技术平台。

难点：发展初级阶段，对硬件设备、生物信息学分析能力和免疫学综合分析能力要求高