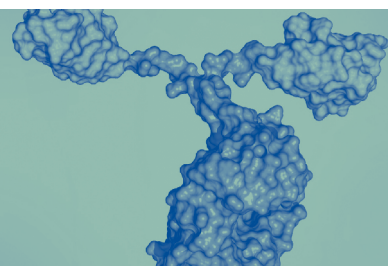




单域抗体 发现手册

SINGLE
DOMAIN
ANTIBODY
DISCOVERY

HANDBOOK





CONTENTS

目录

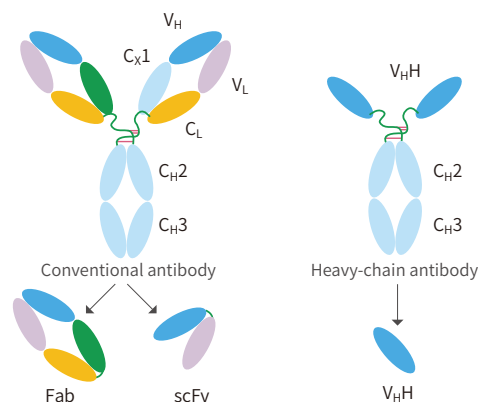
单域抗体	2
金斯瑞蓬勃生物项目经验	2
金斯瑞蓬勃生物提供从靶点到临床前分子 一站式单域抗体发现解决方案	2
2 种文库技术路线	3
淘选和筛选策略	4
单域抗体人源化	7
单域抗体亲和力成熟	10
金斯瑞蓬勃生物单域抗体发现服务特色总结	14

单域抗体

单域抗体 (Single Domain Antibody, sdAb), 是指缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体, 因其分子量小, 也被称为纳米抗体 (Nanobody)。单域抗体虽然结构简单, 但仍然可以达到与传统抗体相当甚至更高的与特异抗原结合的亲和力。相比于传统抗体, 单域抗体具有分子量小、稳定性强、易于重组表达等优点, 作为富有前景的下一代治疗性抗体技术, 可用于癌症免疫治疗和其他应用。

单域抗体具有如下优势:

- 疗效和安全性已在临床研究中得到验证
- 易于改造以适应不同的应用
- 相对较短的研发周期
- 被国内外主流制药公司认可
- 制造成本低, 效益高



金斯瑞蓬勃生物项目经验

40+ 单域抗体发现项目

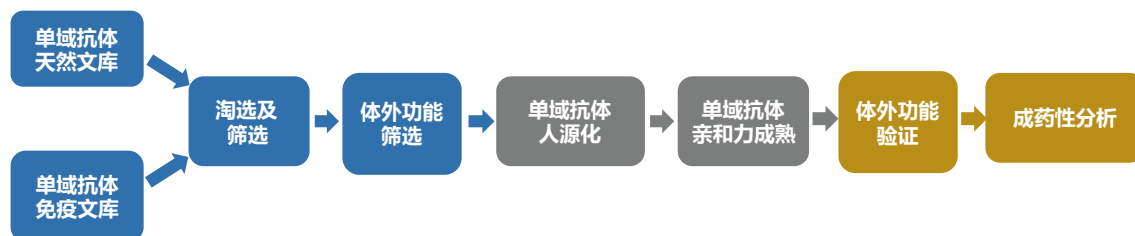
50+ 人源化单域抗体交付, 100% 交付成功率

6 个单域抗体全球许可

70+ 细胞治疗以及双特异性抗体领域客户

* 数据统计截至 2021 年 10 月

金斯瑞蓬勃生物提供从靶点到临床前分子一站式单域抗体发现解决方案

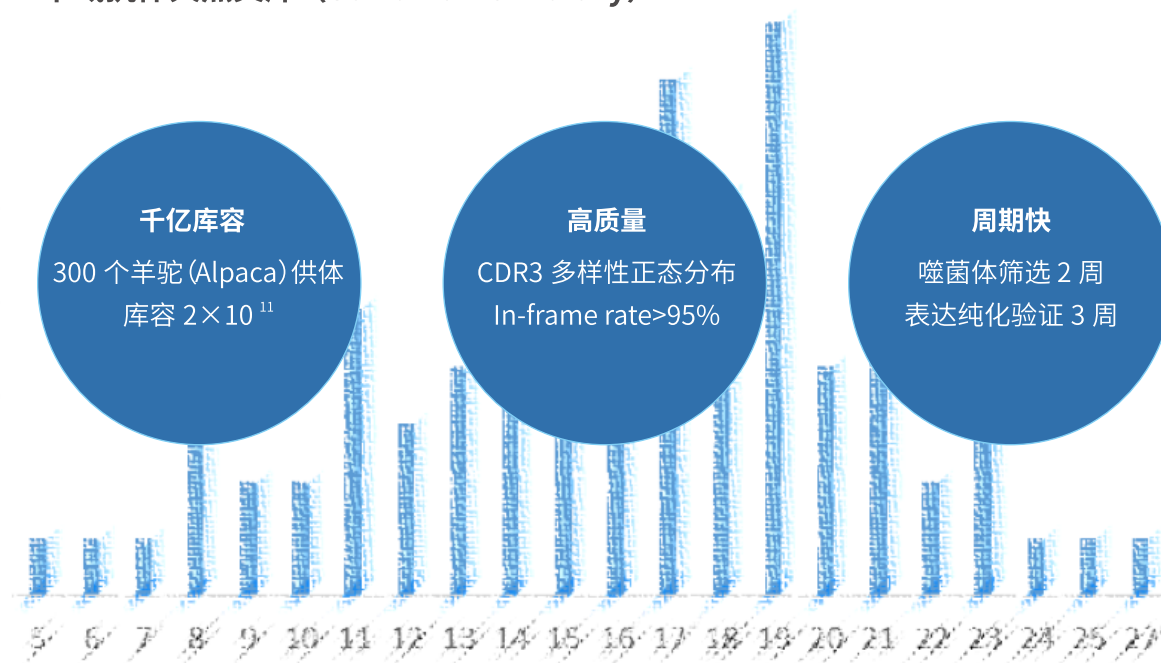


2-3 周即可获得初步淘选结果

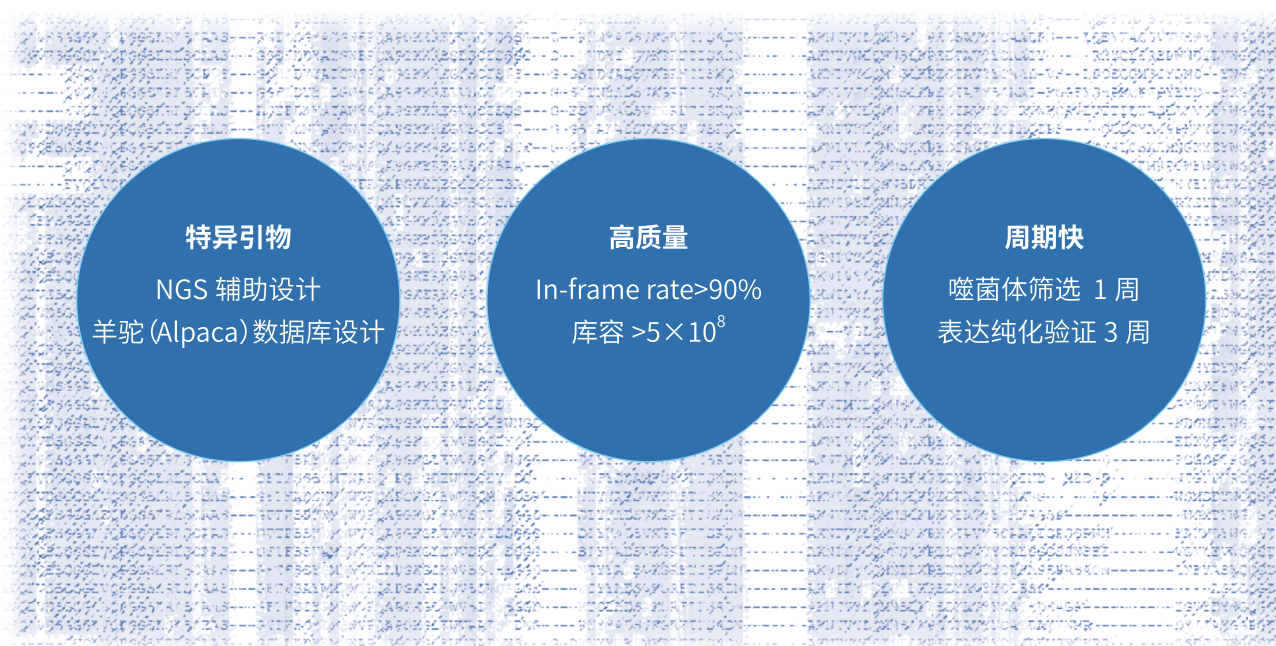
最快 7 周获得人源化单域抗体分子

2 种文库技术路线

单域抗体天然文库 (SdAb Naïve Library)

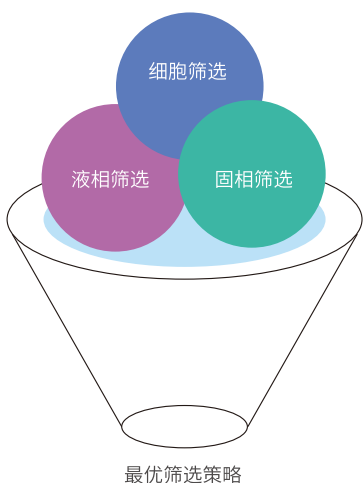


单域抗体免疫文库 (SdAb Immunized Library)



淘选和筛选策略

金斯瑞蓬勃生物提供多样化的筛选策略，确保分子多样性和亲和力。不同种属抗原交叉阳性率达 80% 以上。



筛选策略	优势
液相筛选	更好的表位展示，能够得到更多以及多样性更好的结合分子
固相筛选	操作简单，应用广泛
细胞筛选	能够基于靶点天然构象进行筛选，适用于多跨膜靶点的筛选

案例一

金斯瑞蓬勃生物交付的 40+ 单域抗体发现项目中，平均每个项目可获得 40+ 独特抗体序列。

在如下案例中，客户使用单域抗体免疫文库和天然文库同时对某一靶点进行了筛选，最终获得了 65 个候选分子，其中 25 个来自天然文库，40 个来自免疫文库。通过进化树作图分析，可见其丰富的多样性。

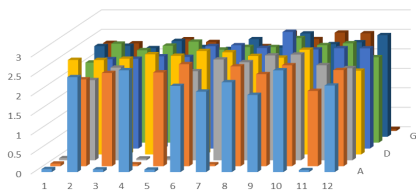


图 1: 人源抗原 ELISA 筛选结果

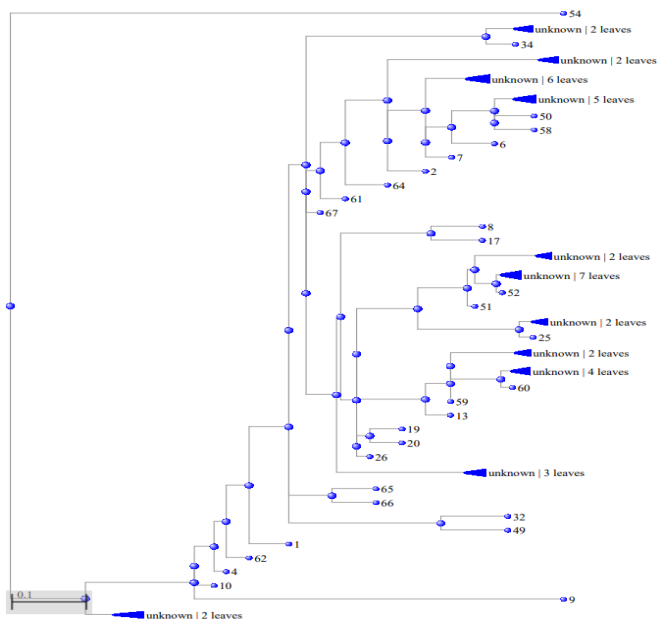


图 2: 单项目单克隆序列对比进化树

服务及交付

单域抗体天然文库服务

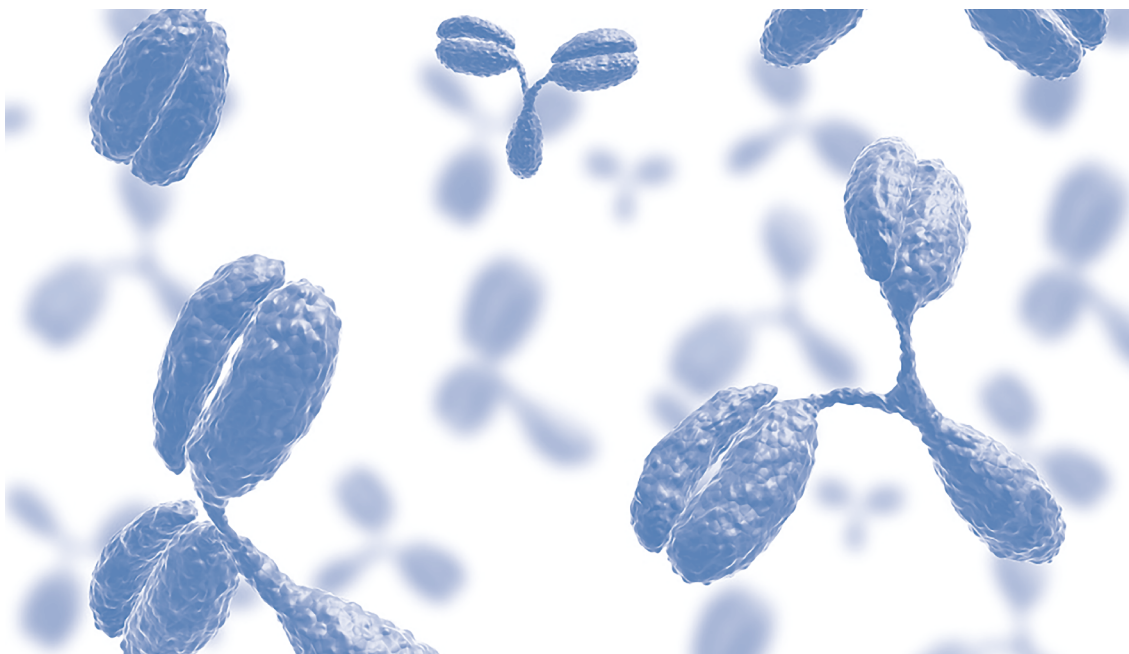
步骤	内容	交付物	周期
1	噬菌体展示淘选	- 至多交付 10 条序列 - 纯化抗体 0.5 mg/Ab (可选)	2-3 周 (不包含可选项)
2	ELISA 或 FACS 筛选		
3	抗体表达和纯化 (可选)		
4	额外序列 (可选)		

单域抗体免疫文库服务

步骤	内容	交付物	周期
1	羊驼 (Alpaca) 免疫	- 交付所有抗体序列 - 纯化抗体 0.5 mg/Ab (可选)	10-14 周 (不包含可选项)
2	单域抗体噬菌体文库构建 (size of $> 5 \times 10^8$)		
3	噬菌体展示淘选		
4	ELISA 或 FACS 筛选		
5	FASEBA 高通量筛选 (可选)		
6	抗体表达和纯化 (可选)		

案例二

通过金斯瑞蓬勃生物单域抗体免疫文库，可筛选到高亲和力纳米抗体。在下图案例中，顺利交付的单域抗体亲和力高达 10^{-11} 。



Capture Solution	Analyte Solution	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Clone 1	Antigen	2.10E+06	4.13E-03	1.97E-09
Clone 2	Antigen	1.36E+06	7.20E-03	5.31E-09
Clone 3	Antigen	1.67E+06	4.28E-03	2.56E-09
Clone 4	Antigen	1.09E+06	2.43E-03	2.23E-09
Clone 5	Antigen	1.39E+06	4.25E-04	3.06E-10
Clone 6	Antigen	4.14E+06	2.70E-04	6.51E-11
Clone 7	Antigen	2.66E+06	1.84E-02	6.92E-09
Clone 8	Antigen	6.89E+05	2.99E-04	4.34E-10
Clone 9	Antigen	5.88E+05	3.34E-04	5.68E-10
Clone 10	Antigen	5.03E+05	2.62E-04	5.21E-10
Clone 11	Antigen	1.13E+06	3.99E-03	3.52E-09
Clone 12	Antigen	1.52E+06	1.32E-03	8.68E-10
Clone 13	Antigen	1.80E+06	4.97E-03	2.76E-09
Clone 14	Antigen	7.52E+05	8.94E-05	1.19E-10
Clone 15	Antigen	3.18E+06	1.93E-02	6.06E-09
Clone 16	Antigen	1.97E+05	5.01E-05	2.54E-10
Clone 17	Antigen	1.80E+06	3.58E-03	1.99E-09
Clone 18	Antigen	6.62E+05	3.66E-04	5.54E-10
Clone 19	Antigen	1.10E+06	1.08E-03	9.81E-10
Clone 20	Antigen	5.38E+05	1.87E-03	3.48E-09
Clone 21	Antigen	9.66E+05	3.37E-03	3.49E-09
Clone 22	Antigen	2.46E+06	6.33E-03	2.57E-09
Clone 23	Antigen	4.50E+05	3.02E-04	6.72E-10
Clone 24	Antigen	2.72E+06	1.61E-02	5.92E-09
Clone 25	Antigen	6.73E+05	4.65E-03	6.90E-09

表 1: 25 个克隆 SPR 检测数据

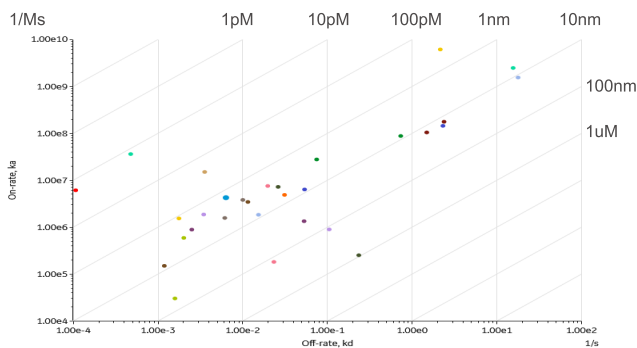


图 3: 25 个克隆结合解离数值分布图

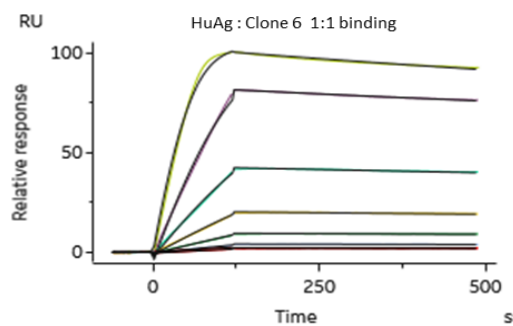


图 4: Clone 6 SPR 检测图

单域抗体人源化

50+

人源化抗体交付

100%

人源化抗体交付

>95%

人源化程度

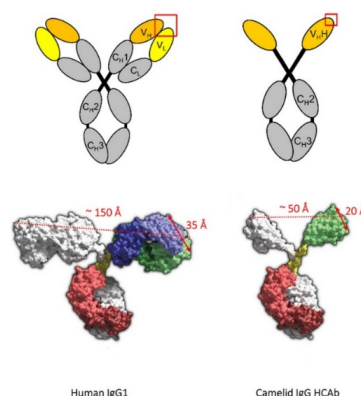
单域抗体人源化策略

思路与单抗人源化策略一致，包括：

- **CDR 移植**：用人源的骨架区替换羊驼骨架区
- **回复突变**：通过对骨架区进行回复突变来维持亲和力

不同之处在于：

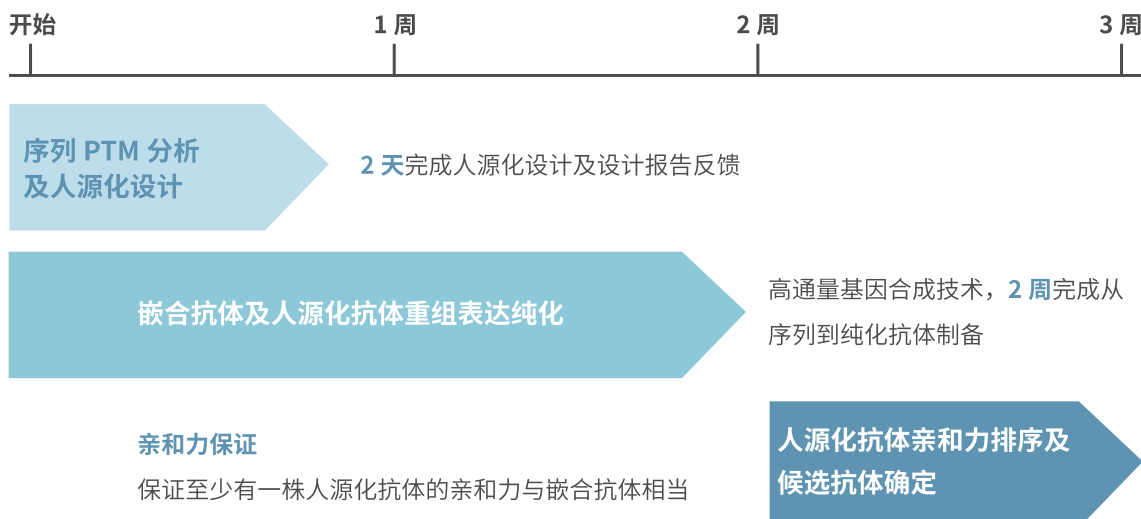
- 单域抗体特有的结构以及只有重链的特点，对于人源化要求更高
- 位于 FR2 区的残基 F37, E44, R45 和 G47 形成的疏水区对于单域抗体的溶解性有重要影响



引用文献：

Rossotti M A , Kasandra Bélanger, Henry K A , et al. Immunogenicity and humanization of single - domain antibodies[J]. The FEBS Journal, 2021.

最快 3 周即可交付人源化的单域抗体



案例三

在下面案例中，金斯瑞蓬勃生物人源化的单域抗体亲和力和嵌合抗体相当。

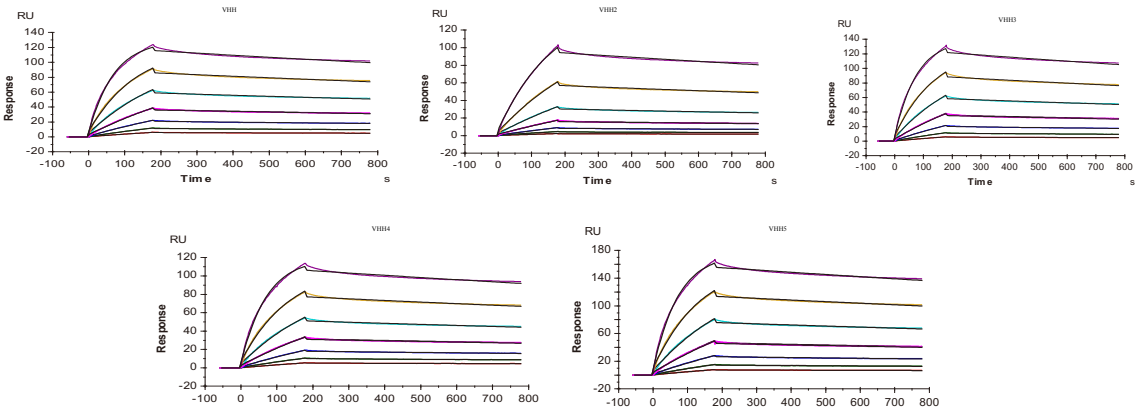


图 5：单域嵌合抗体及其人源化抗体 SPR 亲和力检测结果

服务及交付

人源化快速服务

步骤	内容	交付物	周期
1	嵌合抗体制备、抗原抗体结合确认及 PTM 分析	● 性质较好的的 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 ● 报告	3-4 周
2	人源化设计、抗体表达及亲和力排序		
3	抗体纯化和亲和力测定		

人源化深度服务

步骤	内容	交付物	周期
1	嵌合抗体制备、抗原抗体结合确认及 PTM 分析	● 性质较好的的 3 株纯化的人源化抗体及其序列 ● 保证亲和力不丢失 ● 报告	8-10 周
2	结构建模、人源化抗体回复突变文库设计和构建		
3	噬菌体展示及 FASEEBA 高通量筛选（亲和力、表达量、热稳定性筛选）		
4	抗体纯化和亲和力测定		

单域抗体亲和力成熟

亲和力是抗体药物的一个关键参数，通常会影响抗体的功能和药效。一般而言，天然文库构建过程中由于动物未经过免疫富集，筛选出的抗体亲和力大多介于 10^{-8} 到 10^{-9} 之间，因此需要进一步进行亲和力成熟。通过免疫文库产生的抗体虽然相较天然文库而言亲和力相对更高，但仍有可能不足以满足治疗性抗体的需要。金斯瑞蓬勃生物提供基于 PML 文库和噬菌体展示文库 2 种技术的亲和力成熟服务，充分满足您对亲和力提升的所有需求。

30+

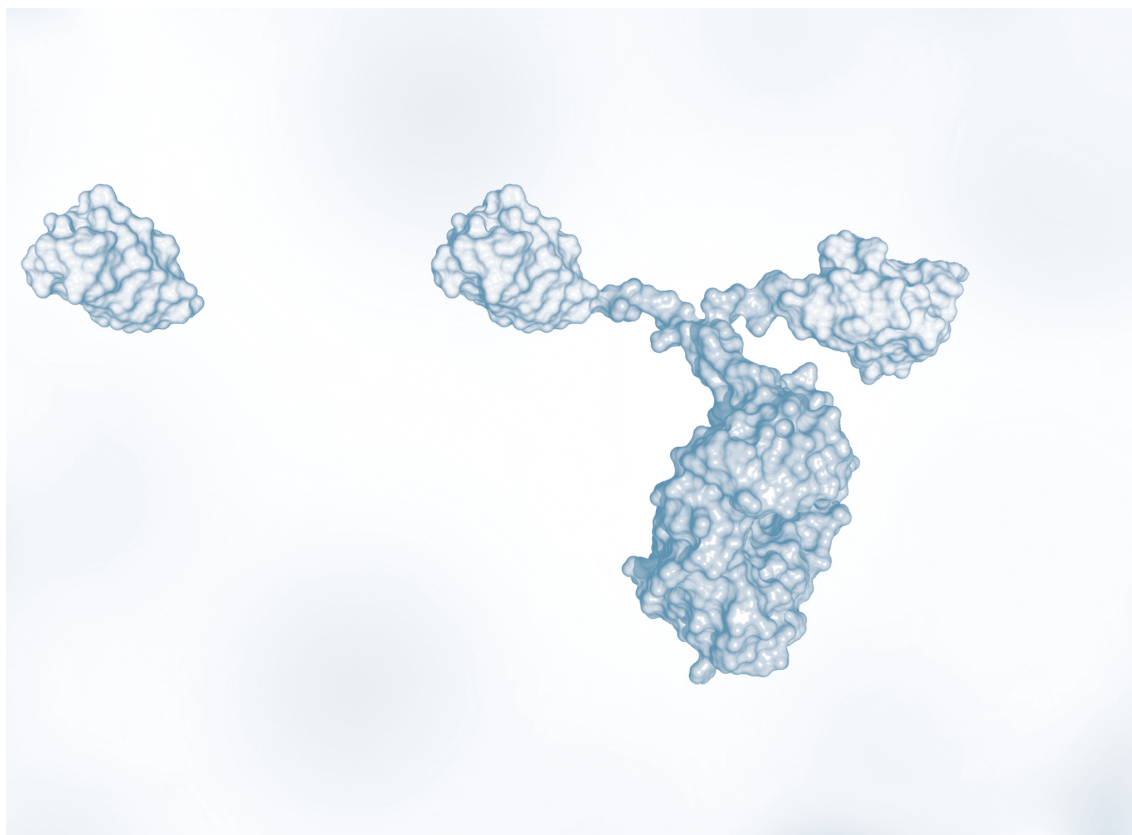
亲和力成熟抗体交付

8

8 周交付项目

5-100

保证至少 5 倍亲和力提升

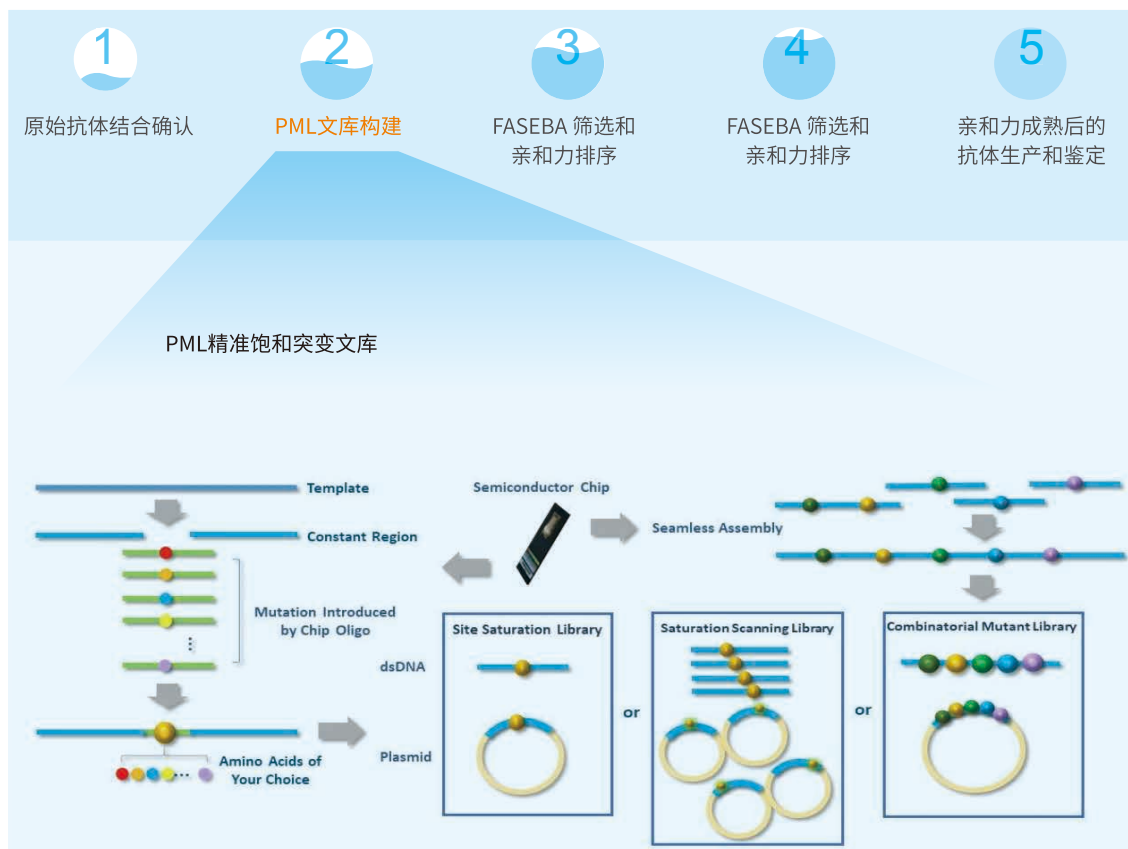


PML 文库

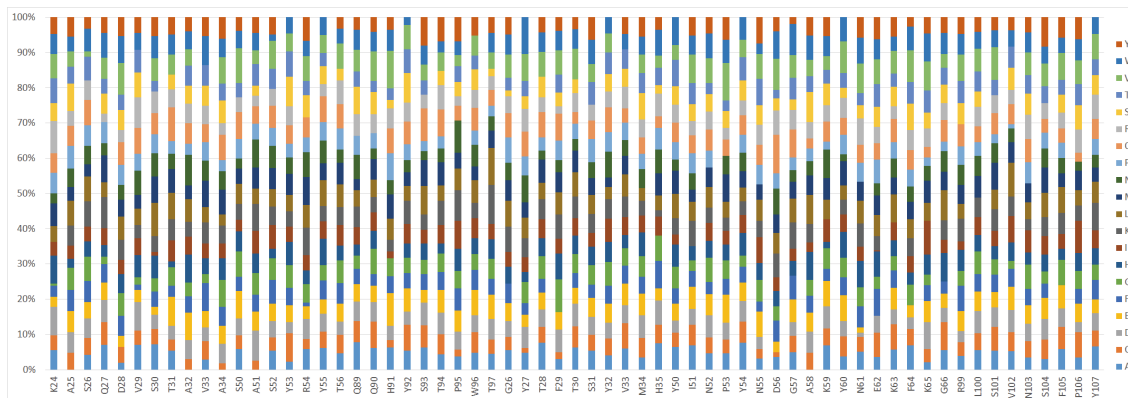
PML 文库（Precise Mutagenesis Library）是一种饱和突变文库。在轻链和重链的 6 个 CDR 区域的所有约 65 个氨基酸上进行饱和突变，每一个氨基酸都会被突变成其他 19 个氨基酸，且概率分布相同。

金斯瑞蓬勃生物通过对 PML 库的筛选，识别出 3-5 个突变热点并根据这些热点构建一个组合突变库，以此找到 3-5 个具有最佳亲和力的组合。

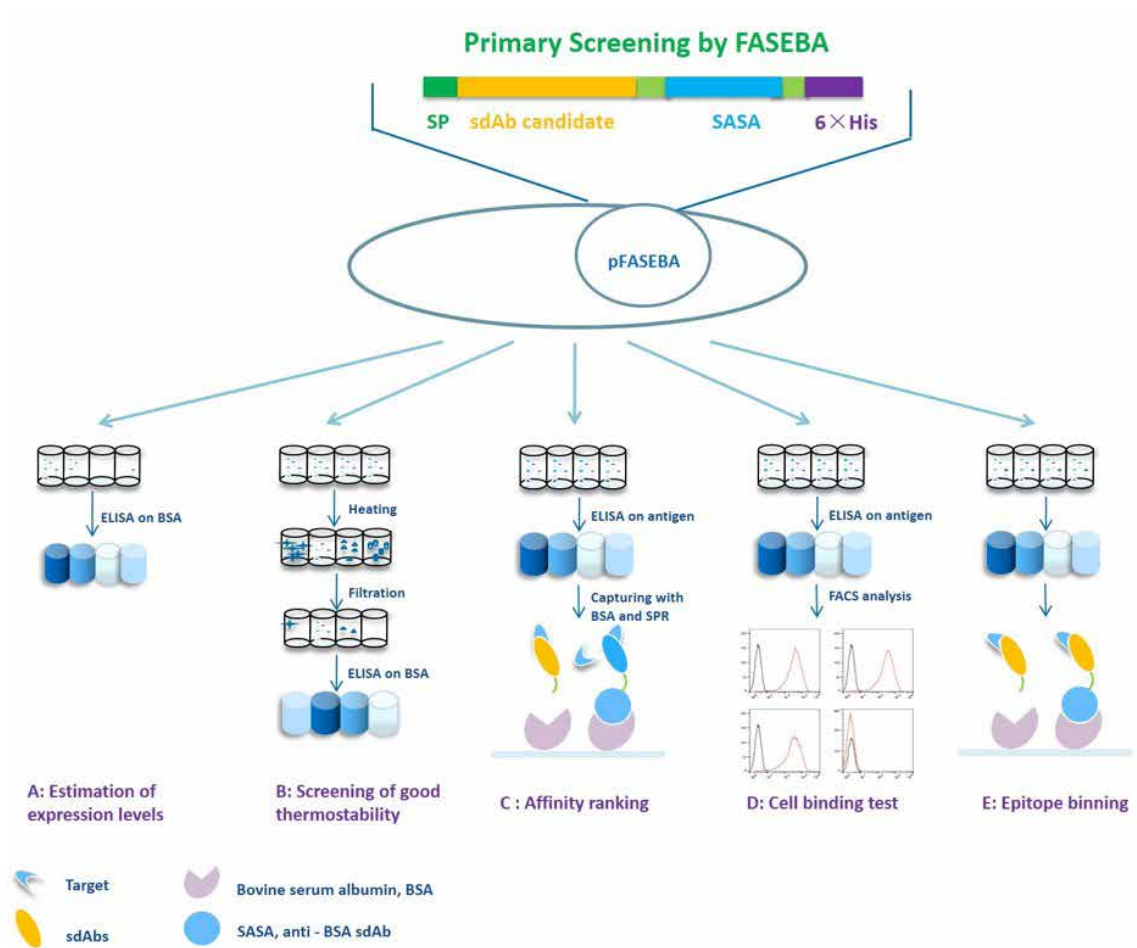
这种方法可以提高筛选效率，增加获得高亲和力序列的概率。



NGS测序确保19种突变氨基酸均匀分布



FASEBA 高通量筛选平台



FA	Fast
S	Screening of
E	Expression
B	Biophysical-properties and
A	Affinity

FASEBA 高通量筛选技术可以快速从大量候选蛋白中筛选出亲和力最高、表达量最高、生物物理性质最好的分子

案例四

在下面案例中，金斯瑞蓬勃生物帮助提升亲和力从 10^{-10} 至 10^{-11} ，成功提升了 17 倍。

Ligand	Analyte	Chi ² (RU ²)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
Target A	WT	1.61E-02	5.61E+06	1.07E-03	1.91E-10	9.7
Target A	variant 1	9.92E-03	1.16E+05	4.57E-04	3.95E-09	9.8
Target A	variant 2	3.69E-02	6.42E+06	2.13E-04	3.32E-11	15.2
Target A	variant 3	8.53E-03	2.24E+06	4.89E-04	2.18E-10	9.9
Target A	variant 4	2.54E-02	4.38E+06	1.74E-04	3.97E-11	12

表 2：亲和力成熟抗体亲和力检测数据

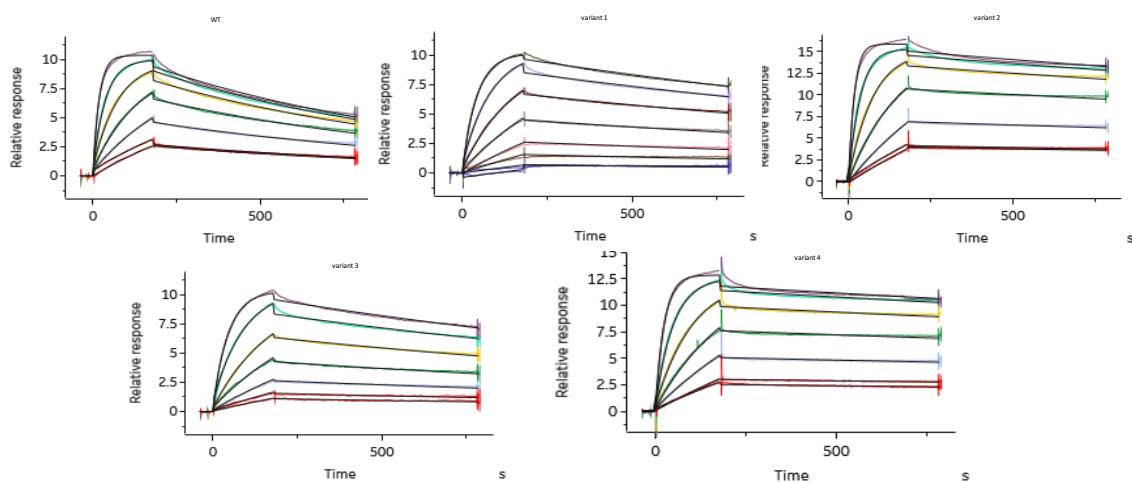


图 6：野生型抗体及其亲和力成熟抗体 SPR 亲和力检测图

服务及交付

基于 PML 文库的亲和力成熟

步骤	内容	交付物	周期
1	PML 库构建和 FASEBA 高通量筛选	- 所有优化后的抗体序列 - 最优的 3 个纯化抗体, 0.5mg/Ab - 至少有一条序列达到 5-10 倍亲和力提升	8-13 周
2	构建组合突变库和 FASEBA 高通量筛选		
3	抗体生产和验证		

基于噬菌体展示库的亲和力成熟

步骤	内容	交付物	周期
1	抗体结合确认	- 所有优化后的抗体序列 - 最优的 3 个纯化抗体, 0.5mg/Ab	8-12 周
2	噬菌体展示文库构建, 筛选		
3	亲和力成熟后抗体生产		
4	SPR 进行亲和力测定		

金斯瑞蓬勃生物单域抗体发现服务特色总结

丰富的项目交付经验：

- 40+ 单域抗体先导分子发现项目
- 50+ 单域抗体人源化项目经验，100% 交付成功率
- 6 个单域抗体全球许可

* 数据统计截至 2021 年 10 月

2 种单域抗体发现平台

- 单域抗体天然文库：300 个 供体， 2×10^{11} 库容
- 单域抗体免疫文库：每个项目均使用未经免疫的羊驼

超快周期：最快 7 周获得人源化的单域抗体

独特的人源化突变策略确保人源化单域抗体的高表达，保证亲和力不丢失

精准突变文库保证亲和力提升至少 5 倍以上

12 种体外功能实验类型，30+ 已开发的适用各种靶点的体外评价方法

(详见《体外药效评价手册》)



金斯瑞生物



蓬勃生物

联系我们

网址: www.genscriptprobio.cn

邮箱: cdmo.cn@genscript.com
antibody@genscript.com.cn

电话: 400-025-8686-3172

地址: 江苏省南京市江宁科学园雍熙路 28 号