

# 兔 Single B 单克隆抗体开发平台

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司

AtaGenix Laboratories

2023年3月





## 蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

## 抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

## 重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

## 抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

**普健生物（武汉）科技有限公司**

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地  
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年



# 目录

CONTENTS

01

普健生物抗体开发平台概况

02

单B细胞抗体开发背景

03

单B细胞抗体开发流程

04

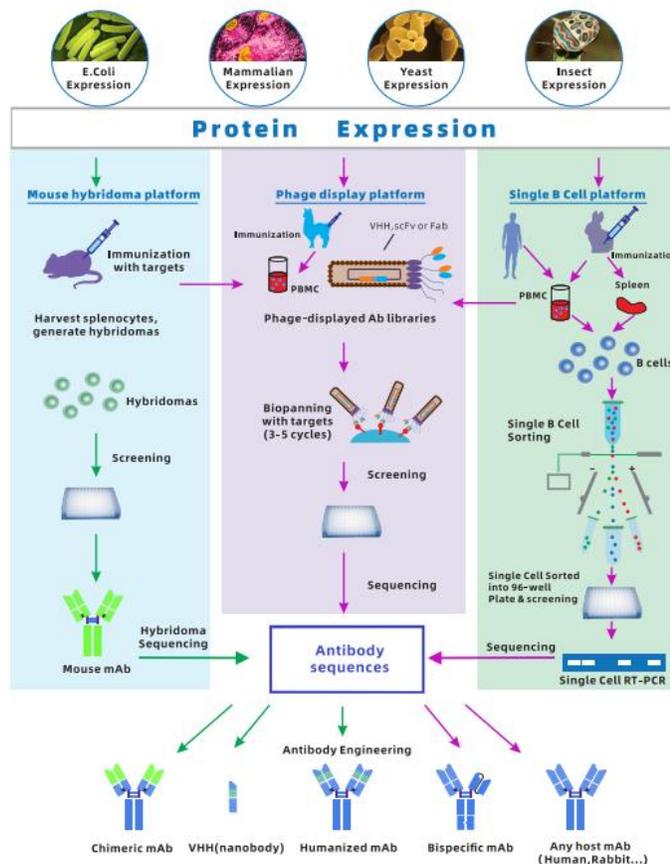
兔单B细胞抗体开发案例

05

抗体开发一站式服务



## 抗体发现与筛选平台



## 核心技术

### 蛋白开发平台

- 大肠杆菌可溶性蛋白表达体系
- Xten™系列高效哺乳动物细胞表达体系
- MHC多肽复合物表达体系
- 多聚体定向表达体系
- 大蛋白/跨膜蛋白表达体系

### 抗体发现平台

- Xten™ Mab Single B cell 筛选技术
- 千亿级纳米抗体库
- 噬菌体建库&多种筛选方案
- 杂交瘤电融合技术
- IF/IHC/FC/Func/化学发光等筛选平台

### 重组抗体表达平台

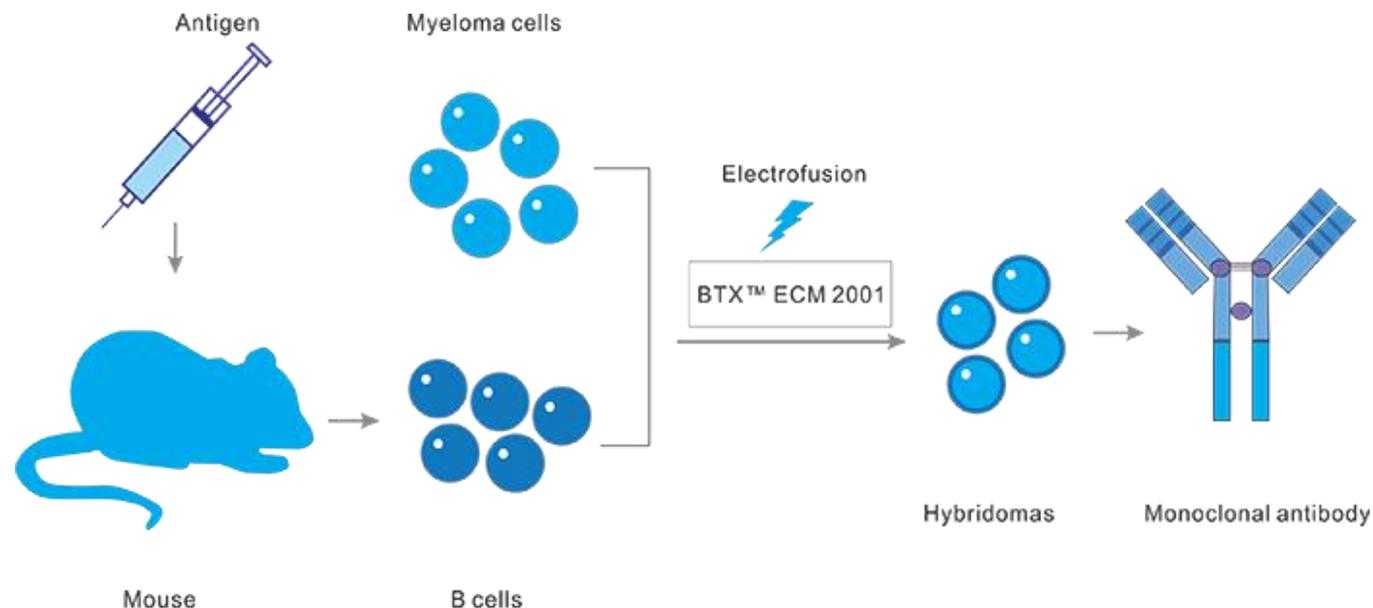
- 自主改造专用pATX系列表达载体
- 自主改造XtenCHO™细胞
- 高密度转染技术

### 抗体工程平台

- 抗体工程分子建模及抗体人源化设计
- 双特异性抗体设计
- 稳转平台：独有pATX-GS系列表达载体及GS敲除细胞系



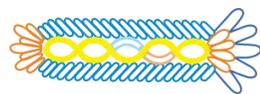
# 普健生物抗体开发平台-杂交瘤鼠单抗开发平台



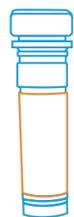
- ✓ 能够为客户提供用于科研检测，诊断试剂开发，药物研究等各种要求的鼠单抗；
- ✓ 配套杂交瘤细胞株测序技术及悬浮培养技术，能灵活进行鼠单抗的生产。



# 普健生物抗体开发平台-噬菌体展示抗体开发平台



几百亿个抗体的文库



**抗原生产服务**  
> 五大表达系统  
> 多肽设计, 合成  
【增加4-6周】

**淘选可选方法**  
> 磁珠淘选  
> 细胞淘选  
> 竞争性淘选  
【增加1-2周】

**订购测序**  
> 随时可以

**抗体表达服务**  
> scFv  
> Fab  
> VHH  
> 各种类型的全长抗体  
【大约3-4周】  
**突变服务**  
> 亲和力测试  
> 单点突变



- 标准选择**
- 抗原
    - > 蛋白质
    - > 肽
    - > 抗体
    - > 全细胞
    - > DNA, 寡核苷酸
    - > 毒素
    - > 碳水化合物
    - > 灭活病毒/细菌

【项目在收到抗原后立刻启动】

每轮淘选后进行ELISA检测

96xn个克隆

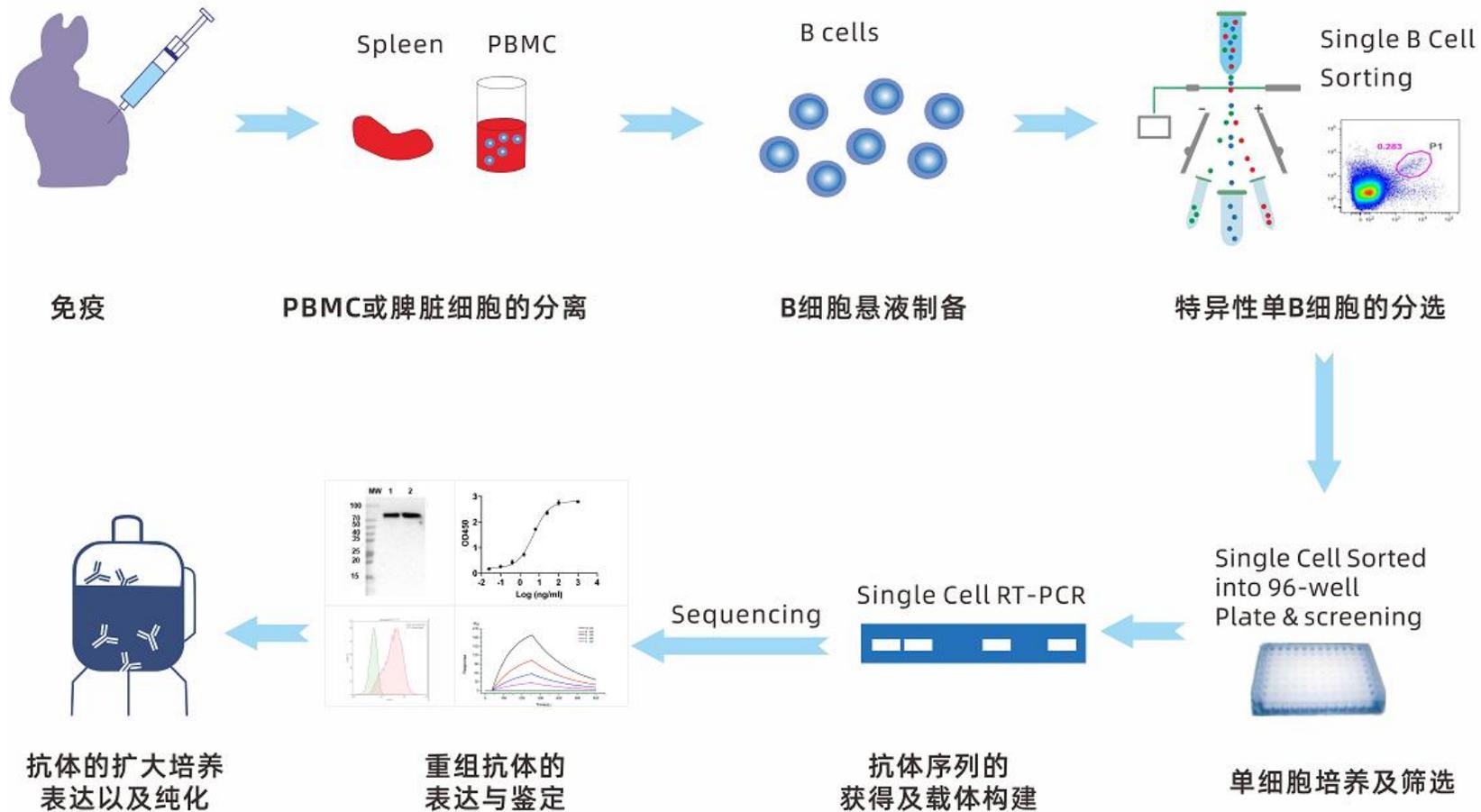
ELISA鉴定  
流式鉴定

特异性抗体  
序列分析

特异性 (ELISA)  
纯度 (SDS PAGE)  
亲和力测定 (SPR)



# 普健生物抗体开发平台-单B细胞抗体开发平台





# 普健生物抗体开发平台



## 杂交瘤融合技术平台

将 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合。  
**合适的骨髓瘤细胞；融合效率限制**

## 噬菌体展示技术平台

VHH/Fab/scFV 基因文库展示在噬菌体上。  
**抗体重轻链进行体外重组；体外亲和力成熟。**



## 单B细胞抗体测序平台

直接分离抗原特异性的单B 细胞（培养或不培养），扩增抗体基因，测序分析。  
**增加了抗体筛选的多样性和特异性，提高了筛选高特异性的稀有抗体的机率。**



# 单B细胞抗体开发背景

抗体由B细胞产生，在B 细胞发育及成熟过程中，可以使不同染色体上的， 由非编码序列隔开的V、D、J 基因片段组合在一起， 成为有功能的基因，编码抗体的不同功能域。

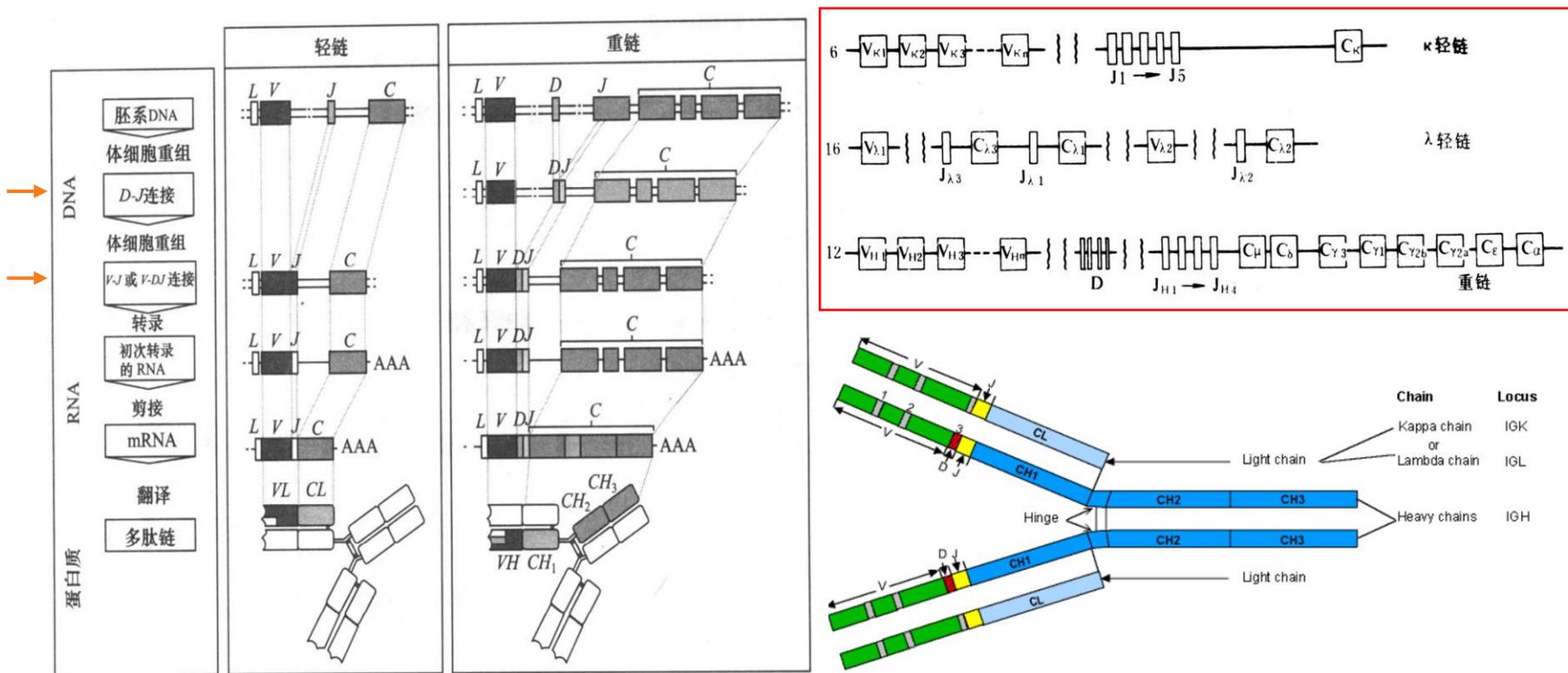


Fig 1. 抗体基因重排机制



# 单B细胞抗体开发背景

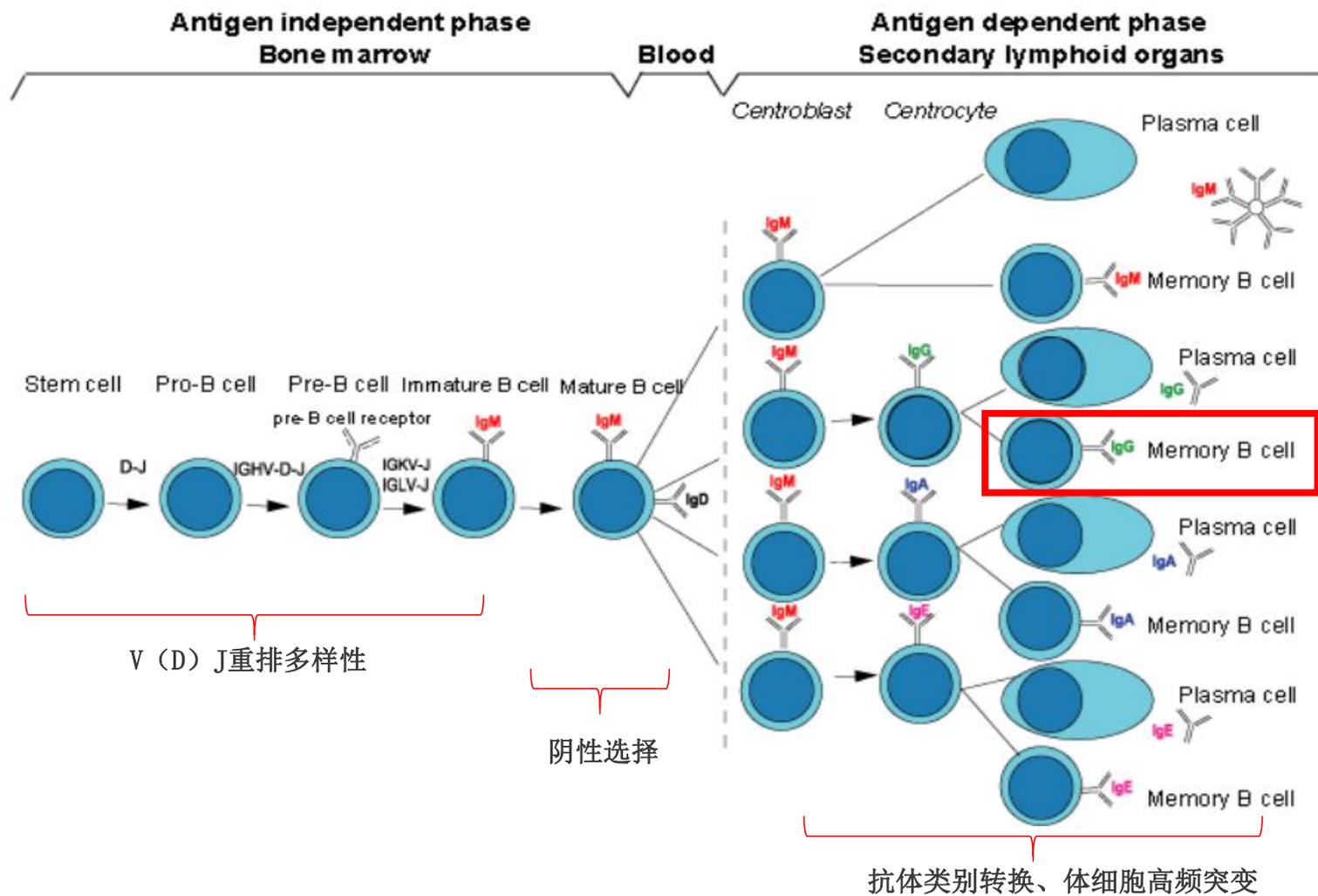


Fig 2. B细胞分化发育机制



# 单B细胞抗体开发背景

## 高特异性

与小鼠和其他啮齿动物相比，免疫系统更优秀，能对小分子，半抗原产生强烈的免疫反应。另外，一些在鼠中免疫反应弱的抗原可以选择用兔进行免疫。



## 高多样性

兔有独特的B 细胞成熟机制（SGC）。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。



## 高稳定性

与常规小鼠单抗相比，兔IgG 结构稳定性高。

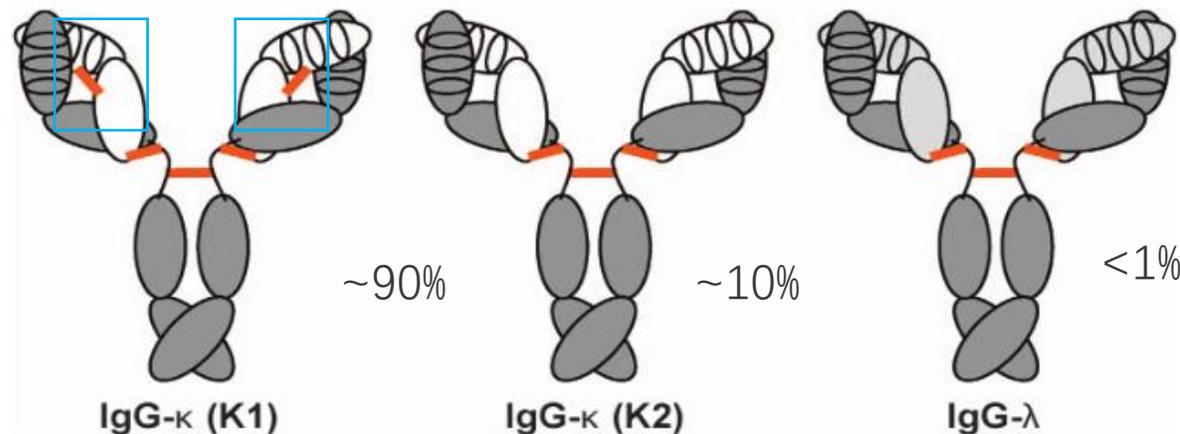


## 高亲和力

兔单抗的亲和力是啮齿动物单抗的10-100倍。

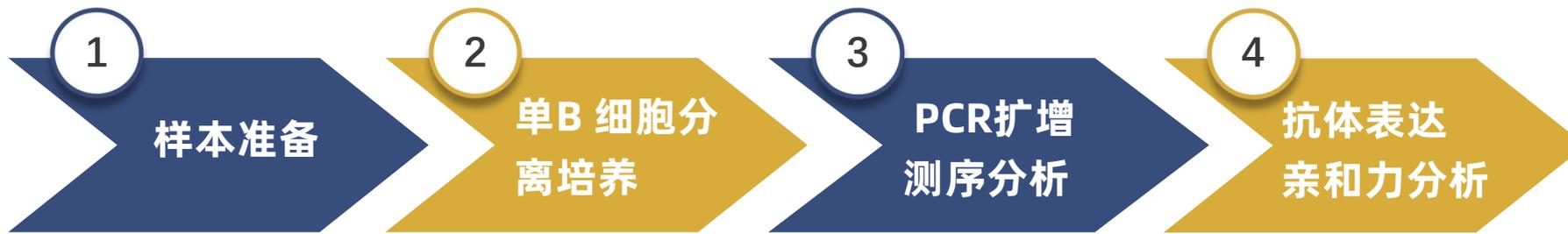


Fig 3. 兔单抗的优势

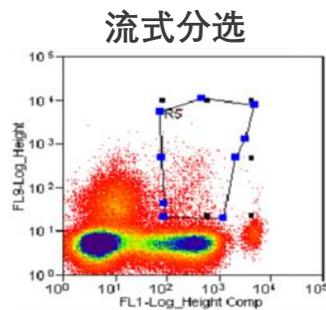
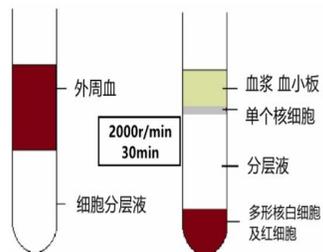




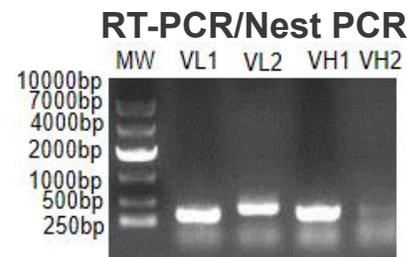
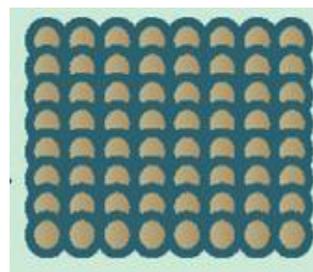
# 兔单B细胞抗体开发流程



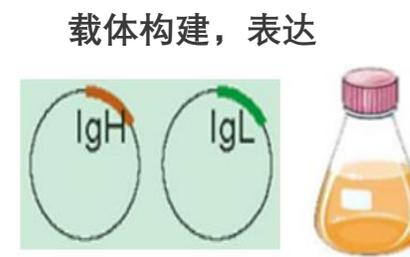
PBMC



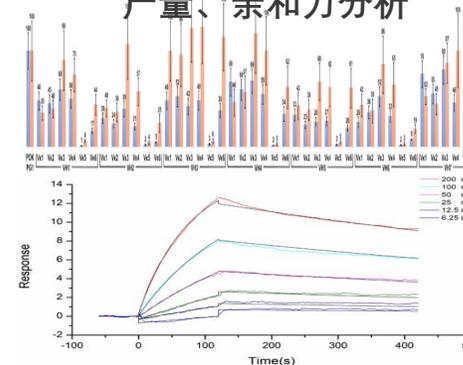
单B细胞培养



可变区鉴定, CDR 鉴定, V(D)J分类



产量、亲和力分析





## 兔单B细胞抗体开发案例

### 蛋白抗原制备:

具体参考普健生物不同表达系统蛋白制备方法。先评估蛋白，再选择适合的表达系统。

- ✓ 原核表达系统（大肠杆菌，枯草芽孢杆菌）
- ✓ 酵母表达系统
- ✓ 杆状病毒-昆虫细胞表达系统
- ✓ 哺乳表达系统（CHO、HEK293常规及高密度表达系统）

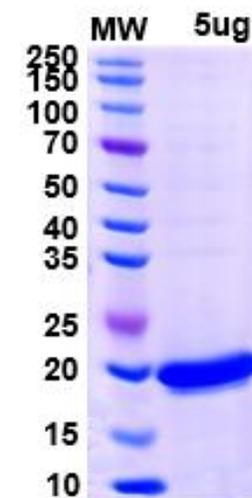


Fig 4. 抗原QC分析



## 兔单B细胞抗体开发案例

免疫:

按如下要求用抗原免疫2只新西兰大白兔（常规免疫4次，可加免1-2次）

免疫时间	质量 (mg/只)	体积 (ul)	佐剂 (ul)	总体积 (ul)	免疫方案
1免 (Day1)	0.25 mg	500	500	1000	2点皮内, 3点皮下
2免 (Day15)	0.25 mg	500	500	1000	
3免 (Day25)	0.25 mg	500	500	1000	
4免 (Day30)	0.25 mg	500	500	1000	
5免 (Day37)	0.25 mg	500	500	1000	
6免 (Day44)	0.25 mg	500	500	1000	

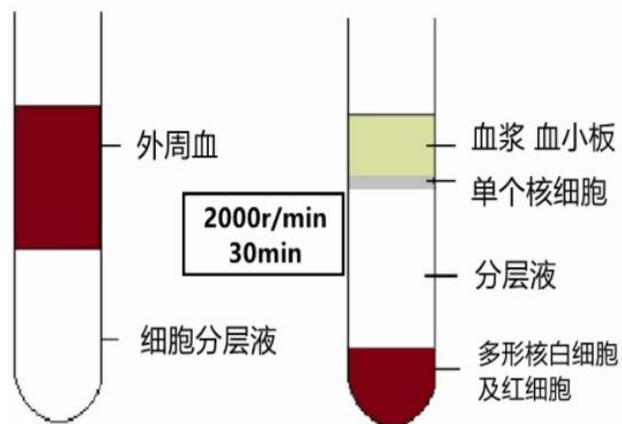
三疫血清效价

	2k	4k	8k	16k	32k	64k	128k	PBS	效价
4免血清效价	3.81	3.21	2.43	1.81	1.29	0.74	0.45	0.08	128K

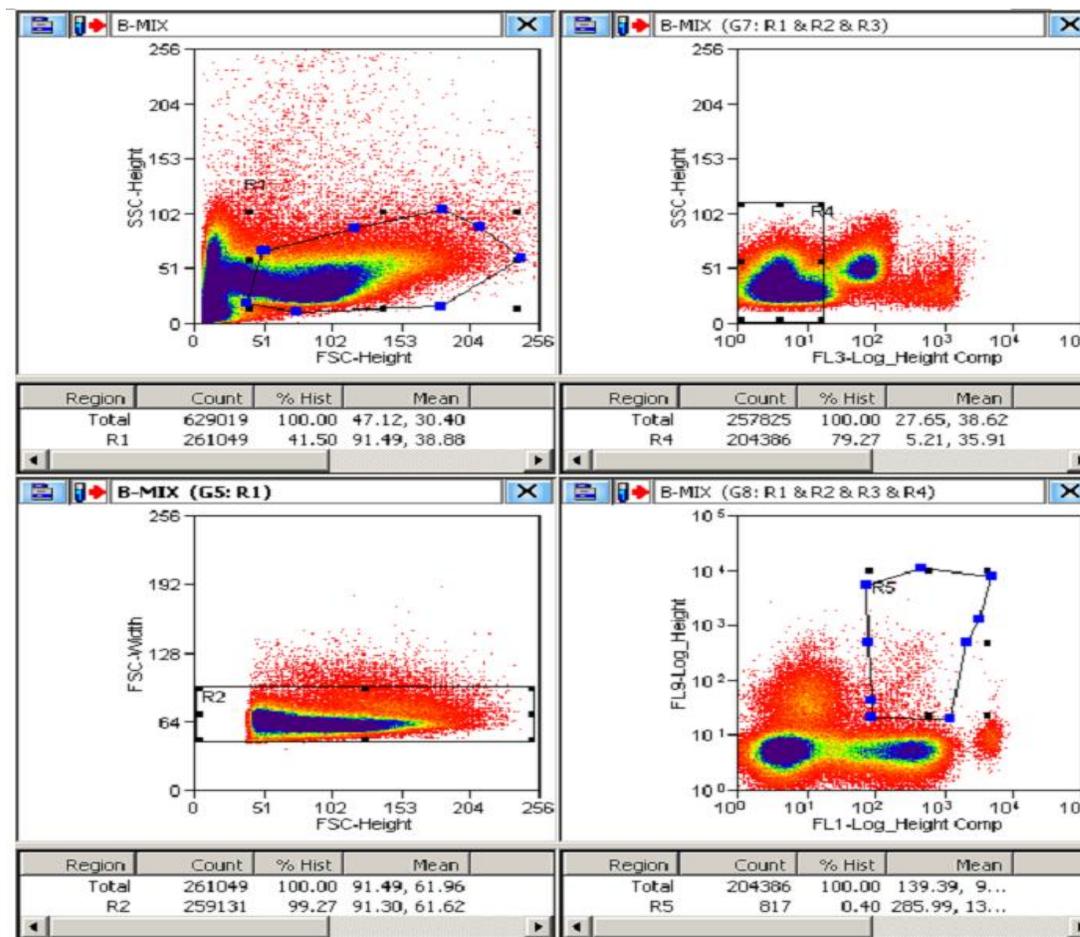


# 兔单B细胞抗体开发案例

## 抗原特异性单B细胞流式分选:



PBMCs包括70-90%淋巴细胞(T细胞70-85%、B细胞5%-20%和NK细胞5-20%)、10-30%单核细胞和1-2%DC细胞。





# 兔单B细胞抗体开发案例



## 初筛

plate3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.13	0.33	2.00	0.13	0.16	0.07	2.22	0.08	0.07	0.08	2.36	0.07
B	2.44	1.54	0.25	0.28	0.07	2.30	1.33	2.20	1.77	2.31	0.19	0.95
C	2.40	1.38	0.09	1.55	1.46	2.06	1.40	0.78	0.26	0.08	1.89	0.07
D	0.43	0.06	2.25	0.23	0.77	1.99	0.09	2.41	0.82	2.30	1.92	1.80
E	0.07	2.12	0.06	0.42	2.92	0.56	0.07	1.81	1.50	2.06	2.45	0.08
F	2.77	2.48	1.95	0.39	0.06	0.36	0.20	0.23	0.58	0.20	1.66	0.27
G	0.39	0.07	0.44	1.47	1.38	0.70	0.43	0.06	2.37	0.06	0.76	1.23
H	2.56	0.92	0.37	1.65	0.28	0.12	0.08	0.10	1.81	0.89	1.47	0.08

plate4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.38	0.08	0.18	0.08	0.17	0.64	0.07	0.35	1.33	0.07	0.87	0.08
B	0.09	0.07	1.90	0.23	2.18	0.07	3.06	1.29	0.67	0.34	0.08	0.25
C	0.10	1.38	0.28	2.70	2.55	0.19	0.07	2.90	0.18	0.99	0.54	0.98
D	0.08	2.13	3.31	0.31	0.24	2.54	0.09	0.37	0.64	0.06	0.94	0.18
E	0.46	3.04	0.06	0.06	3.56	0.12	2.30	3.72	0.29	0.87	1.75	0.06
F	0.07	0.06	0.07	0.17	0.06	2.89	0.60	2.42	0.91	1.96	0.54	0.08
G	0.62	0.90	2.30	0.06	0.62	2.63	0.06	1.55	1.34	0.19	2.08	1.51
H	0.68	1.87	2.00	0.08	3.34	0.50	0.19	0.08	0.65	2.40	0.67	1.02

## 复筛

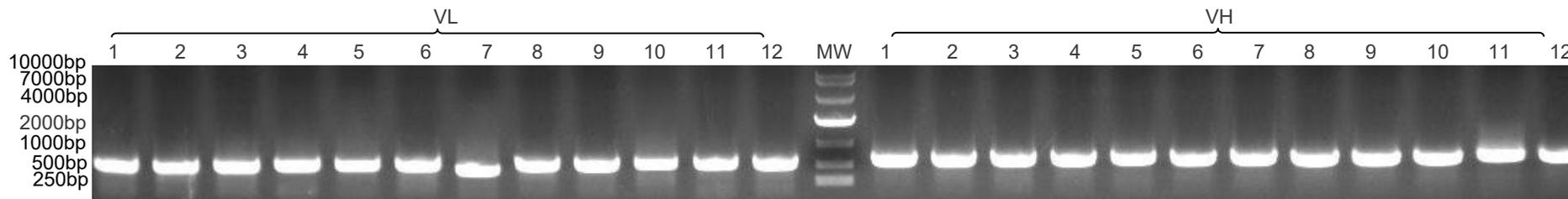
Plate-1-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1B1	1C8	2E3	2A11	3E2	3C5	3C7	3B10	3H11	4D3	4D6	4F8	4G12	6A11	7F5
B	1A2	1A9	2E7	2A12	3F2	3E5	3B8	3D10	3D12	4G3	4F6	4G8	4H12	6E11	7H5
C	1F3	1C10	2F8	3B1	3A3	3G5	3D8	3E10	3G12	4H3	4G6	4A9	5A4	7B1	7C6
D	1B5	1D10	2G8	3C1	3D3	3B6	3E8	3A11	4C2	4C4	4B7	4G9	5E5	7D2	7D6
E	1H5	1E10	2H8	3F1	3F3	3C6	3B9	3C11	4D2	4B5	4E7	4F10	5E6	7E2	7H6
F	1C6	2D1	2D9	3H1	3C4	3D6	3E9	3D11	4E2	4C5	4B8	4H10	5B12	7G2	7H11
G	1C7	2E1	2D10	3B2	3G4	3A7	3G9	3E11	4H2	4E5	4C8	4E11	6D6	7H2	7G12
H	1D7	2G2	2H10	3C2	3H4	3B7	3H9	3F11	4B3	4H5	4E8	4G11	6G10	7F3	1H9

Plate-1-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	0.39	0.62	1.04	0.70	0.89	0.52	0.36	1.05	0.33	2.13	0.90	0.50	0.25	0.23	0.25
B	1.17	0.45	1.00	0.28	1.87	2.37	1.09	0.98	0.41	0.48	1.33	0.26	0.22	0.13	0.38
C	1.21	1.97	0.84	0.99	0.99	0.34	1.45	0.86	0.32	0.37	0.43	0.44	0.90	0.64	0.36
D	0.44	0.39	0.51	1.45	1.18	0.71	0.55	0.82	0.52	1.28	1.27	0.61	0.05	0.50	1.84
E	1.63	1.85	0.82	2.10	0.60	0.68	0.55	0.72	0.45	1.01	0.82	0.34	2.22	0.17	1.09
F	0.58	0.47	1.74	0.95	0.65	1.26	0.36	0.53	1.09	0.56	0.39	1.80	0.86	0.27	0.76
G	0.48	0.86	1.11	0.89	0.38	0.78	1.24	0.85	0.48	1.33	1.65	0.63	0.73	0.53	0.09
H	1.58	0.75	2.08	0.63	0.42	0.41	0.39	0.47	0.37	1.17	2.44	0.39	1.38	1.61	0.85



# 兔单B细胞抗体开发案例



克隆序号	VH					VL				
	DNA sequence	Protein sequence	CDR1	CDR2	CDR3	DNA sequence	Protein sequence	CDR1	CDR2	CDR3
1	cagtcggtggaggagtccgg	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	GIDLSSYT	ISTGGS	ARFWDL	gcgcaagtgtctgaccagactccatc	AQVLTQTPSSVSAAVGGTVTISQCSSQSW	QSVYDNDW	DSS	LGGWVGNRA
2	cagtcggtggaggagtccgg	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	GFLSSYA	INTGSA	NAVYSTC	gtgcatccaatctggcatctggggtct	QGRPKLLIYCANLASCVSSRFRSGSGT	QSICGN	GAS	QCTYYGETYT
3	cagtcggtggaggagtccgg	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	GFLSTYG	ISSTDT	ARFWDL	tatgatgcatccactctggcatctggg	KPGQPKLLIYDASTLASGVPFRFGSGS	QSVYDNNW	DAS	VGGYSGIRA
4	cagtcggtggaggagtccgg	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	GIDLSSYS	ISTGGS	ARFWDL	gcgcaagtgtctgaccagactccatc	AQVLTQTPSSVSAAVGGTVTISQCSSQSW	QSVYDNDW	EAS	LGGWVGNRA
5	agcacatactacgagctgg	MSSYSGSTYYASWAKGRFT	GFLSNNT	SSYSGS	EWAGSSHG	gcgcaagtgtctgaccagactccatc	AQVLTQTASPVSAAVGGTVTISQCSSQSW	QSVANNNF	SAS	LGEFSCSSADCNV
6	ctacgcgagctgggcaag	SDGVAYIASWAKGRFTISK	GFLSSYA	ISSDGA	DSYGYGT	tcgaaactggcatctggggtcccatc	QPKLLIYDTSKLASGVPFRFGSGSGTE	QSI STA	DTS	QGYYSSTDWGA
7	cagtcgatagaggagtccgg	QSI EESGRLVTPGTPLTL	GIDLSSDT	LDSGTH	ARGDL	gcccgaagtgtctgaccagactccatc	AQVLTQTPSPVSAVGDVTINCAASQSW	QSVFSNNY	DAS	LGEFSCSSADCCA
8	cagtcggtggaggagtccgg	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	GFLSNSA	IYASGT	AREFFNL	gacctgtgctgaccagactccatc	DPVLTQTPSSVSAAVGGTVTISQCSSQSW	QSVYDNNY	PAS	AGGYSNIIYT
9	cagtcgctggaggagtccag	QSL EESRGLIKPGGTLTL	GFLSNNG	ISSGSA	ARAGV	gcagctgtgctgaccagacaccatc	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKQSSQSW	QSVYDSNL	DAS	LGGYDDADFFA
10	cagtcgctggaggagtccgg	QSL EESGGLVKPGGSLTL	GFLSISNG	IHSGSA	ARAGV	gcagctgtgctgaccagacaccatc	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKQSSQSW	QSVNNNLL	DAS	LGGYDDADFFA

Sequence	V-DOMAIN	V-GENE a	J-GENE and	D-GENE and	V-D-J-REGION	V-J-REGIC	V-REGION	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CDR2-IMGT	FR3-IMGT	CDR3-IMGT	JUNCTION	JUNCTION fr	J-REGION	FR4-IMGT
1-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVKESGGGLFKPTDITLTL	QSVKESG	QSVKESG	GIDLSSYA	MSWVVRQ	ISPDGSS	YYATWAI	AGFWDV	CAGFWDVW	in-frame	DVWGGQ	WGQGT	LTVVSS
2-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVKESGGRLVTPGTPLTL	QSVKESG	QSVKESG	GFLSSY	VSWVVRQ	IYSDGT	SYASWA	ARNIGTS	CARNIGTSDTNLW	in-frame	NLWGGP	WGPGL	LTVVSS
3-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	QSVVEESG	QSVVEESG	GFLSSY	MSWVVRQ	IGSSGST	YYASWA	ARGVYGS	CARGTYCGGLW	in-frame	WGPGL	WGPGL	LTVVSS
4-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVKESGGRLVTPGTPLTL	QSVKESG	QSVKESG	GFLSSY	VNWVVRQ	INSGGSA	YYASWA	ARGVYGS	CARGVYDSYGYAGA	in-frame	WGPGL	WGPGL	LTVVSS
5-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVKESGGRLVTPGTPLTL	QSVKESG	QSVKESG	RFLSSY	MSWVVRQ	IGSDGDT	YYASWA	ARGTYAS	CARGTYASGLW	in-frame	WGPGL	WGPGL	LTVVSS
6-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVKESGGRLVTPGTPLTL	QSVKESG	QSVKESG	GFLSSY	MNWVVRQ	IGSFDNP	YYATWAI	GRGANSI	CGRGANSYDYMISLW	in-frame	SLWGGP	WGPGL	LTVVSS
7-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSL EESGGRLVTPGTPLTL	QSL EESG	QSL EESG	GFLSSY	MIWVVRQ	IGSSGTT	YYASWA	ARGVYGS	CARGVYSGNSDNYNL	in-frame	NLWGGP	WGPGL	LTVVSS
8-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	QSVVEESG	QSVVEESG	GFLSNYA	MSWVVRQ	ITNTYTT	SYATWAI	VRLWLSL	CVRLWLSLW	in-frame	LWGGP	WGPGL	LTVVSS
9-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVKESGGRLVTPGTPLTL	QSVKESG	QSVKESG	GFLSSN	ISWVVRQ	IYSGGPV	DYASWA	ARGLFGV	CARGLFGVDNLGNLW	in-frame	NLWGGQ	WGQGT	LTVVSS
10-VH	productive	Orycun IG	Orycun IGHJ4	Orycun IGHJ4	QSVVEESGRLVTPGTPLTL	QSVVEESG	QSVVEESG	GFLSSY	MSWVVRQ	IGSSGST	YYASWA	SRRVVVV	CSRRVVVVADLW	in-frame	LWGGQ	WGQGT	LTVVSS
1-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELVMTQT	ELVMTQT	ELVMTQT	ESIYKNNI	LAWYQQI	SAS	TLASGVP	AGVYSG	CAGVYSGSIYAF	in-frame	AFGGGT	FGGGT	EVVVK
2-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELDMTQT	ELDMTQT	ELDMTQT	PSVYNNN	LSWFQQI	SAS	TLASGVS	AGAYAGT	CAGAYAGTVVAF	in-frame	VAFGGT	FGGGT	EVVVK
3-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELDMTQT	ELDMTQT	ELDMTQT	PSVYDGN	LAWYQQI	ETS	TLESGVP	AGAYSGN	CAGAYSGNIYTF	in-frame	TFGGGT	FGGGT	EVVVK
4-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELVLTQT	ELVLTQT	ELVLTQT	QSIYSN	LAWYQQI	RTS	TLASGVP	QDTWYS	CQDTWYSSSSTYLNA	in-frame	LNAFGG	FGGGT	EVVVK
5-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		AQVLTQT	AQVLTQT	AQVLTQT	QSVYDKN	LAWYQQI	SAS	TLESGVP	AGVYSGN	CAGVYSGNIYDF	in-frame	SFGGGT	FGGGT	EVVVK
6-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELVMTQT	ELVMTQT	ELVMTQT	QSISSY	LAWYQQI	SAS	TLASGVS	QQGYSG	CQQGYSGSDVDNAF	in-frame	NAFGGT	FGGGT	EVVVK
7-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELVLTQT	ELVLTQT	ELVLTQT	QSISSS	LAWLQQI	RAS	TLASGVP	QSIYSS	CQSIYSSSISYGNIT	in-frame	GNTFGG	FGGGT	EVVVK
8-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		ELVMTQT	ELVMTQT	ELVMTQT	QSVYDNN	LAWYQQI	SAS	TLASGVP	AGVYSGN	CAGVYSGNIYVF	in-frame	VFGGGT	FGGGT	EVVVK
9-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		AQVLTQT	AQVLTQT	AQVLTQT	QSVYNNN	LAWFQQI	DAS	KLASGVP	LGGYDCL	CLGGYDCSSDCCAF	in-frame	AFGGGT	FGGGT	EVVVK
10-VL	productive	Orycun IG	Orycun IGKJ4		AQVLTQT	AQVLTQT	AQVLTQT	QSVVNNN	LAWYQQI	SAS	TLESEVP	AGVYSGI	CAGVYSGNIYTF	in-frame	TFGGGT	FGGGT	EVVVK



# 兔单B细胞抗体开发案例

自主开发的YtcrQ10 抗体表达系统适合表达不同种属抗体 嵌合抗体及人源化抗体

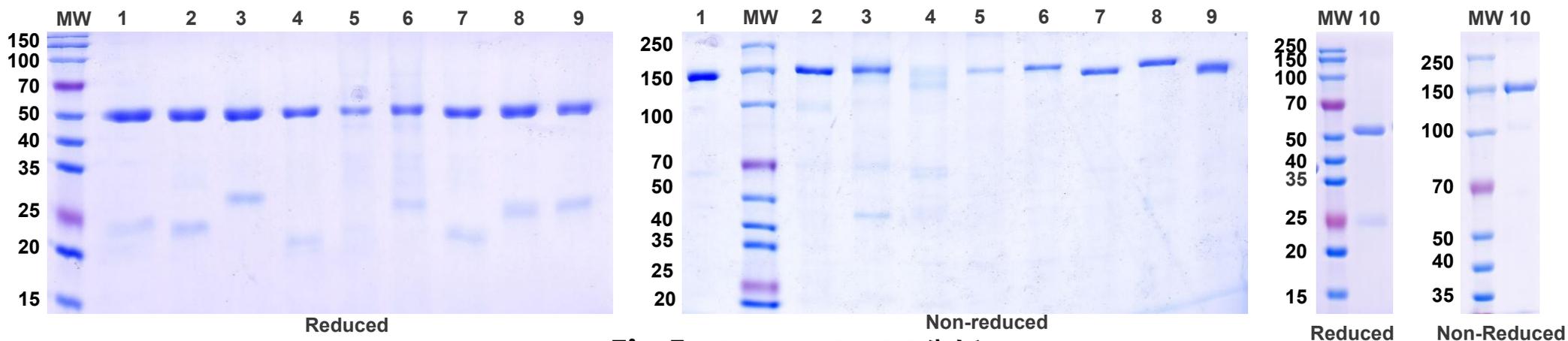


Fig 5. SDS-PAGE QC分析

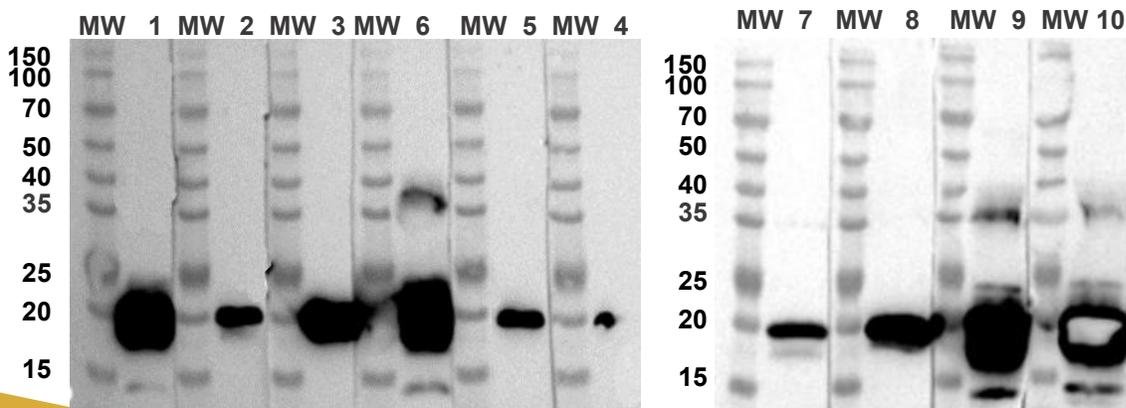


Fig 6. WB分析

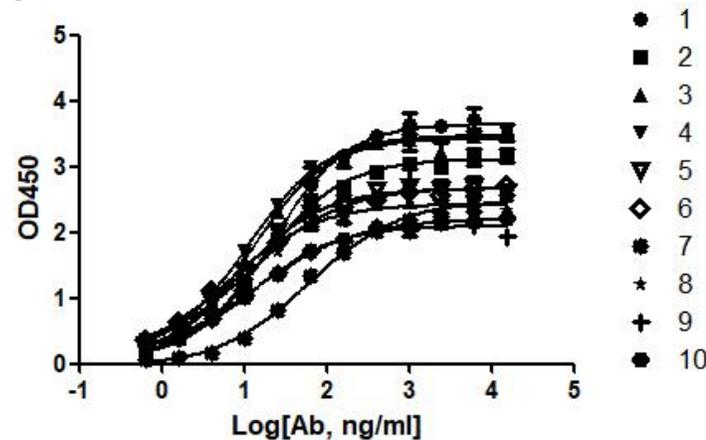


Fig 7. Elisa 分析



# 兔单B细胞抗体开发案例

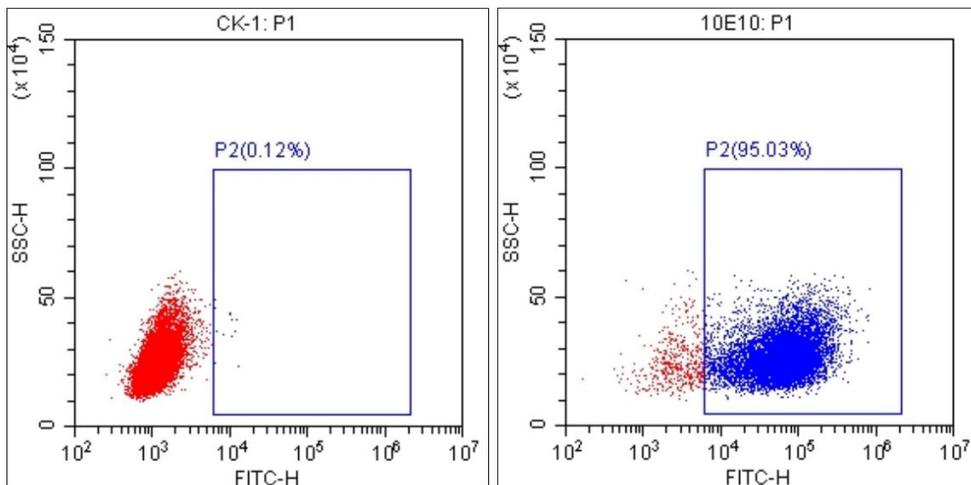


Fig 8. 流式分析

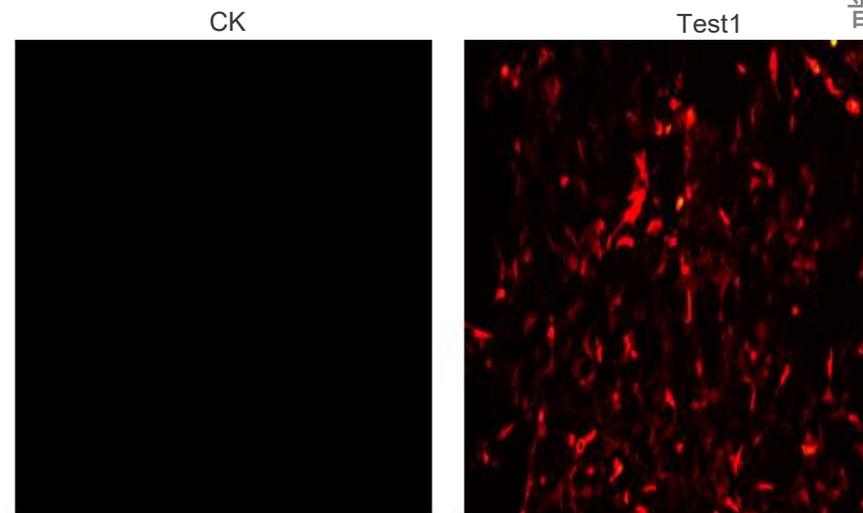
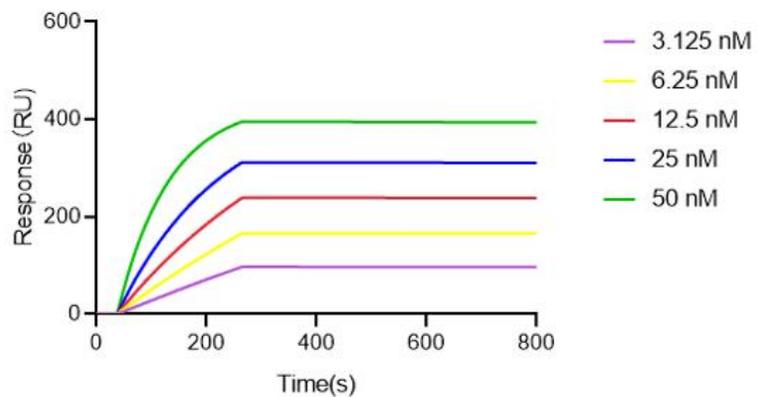


Fig 9. IF分析



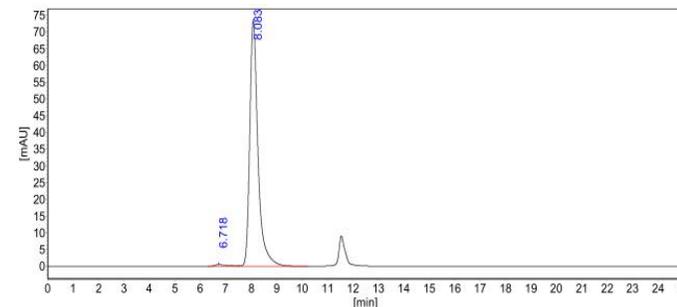


# 兔单B细胞抗体开发案例



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
ATG7729& Ab1	1.29E+05	9.52E-06	7.36E-11

Fig 10. SPR 亲和力分析



Analysis Results

No.	Compound Name	R. Time [min]	Height [uAU]	Area [uAU*s]	Area%	Conc. [%]	Type
1		6.718	530.0	18332.6	1.0995	1.0995	VV
2		8.083	73185.4	1649084.3	98.9005	98.9005	VB
Total:			73715.4	1667416.9	100.0000	100.0000	

Fig 11. SEC-HPLC分析





## 抗体开发下游平台



### 抗体质检平台

SPR分子互作分析平台、SEC-HPLC检测平台、DSF热稳定性分析、流式分析平台及体外药效检测平台。

### 稳转细胞株

CHO/GS 筛选平台，抗体稳转细胞株开发工艺成熟稳定

### 人源化抗体

由专家团队进行人源化序列设计（有上市抗体药物设计经验）

### 抗体表达

自主开发的XtenCHO抗体表达系统，既可以实现高通量表达，又可以进行放大生成。

# 谢谢观看！

网址：[www.atagenix.cn](http://www.atagenix.cn)

邮箱：[Sales@atagenix.com](mailto:Sales@atagenix.com)

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

