



# 抗体库技术概论

2024

2024

# 目录

**01 基因工程抗体的概述**

**02 鼠抗体的人源化改造**

**03 抗体库技术**

**04 小型化及功能改造**

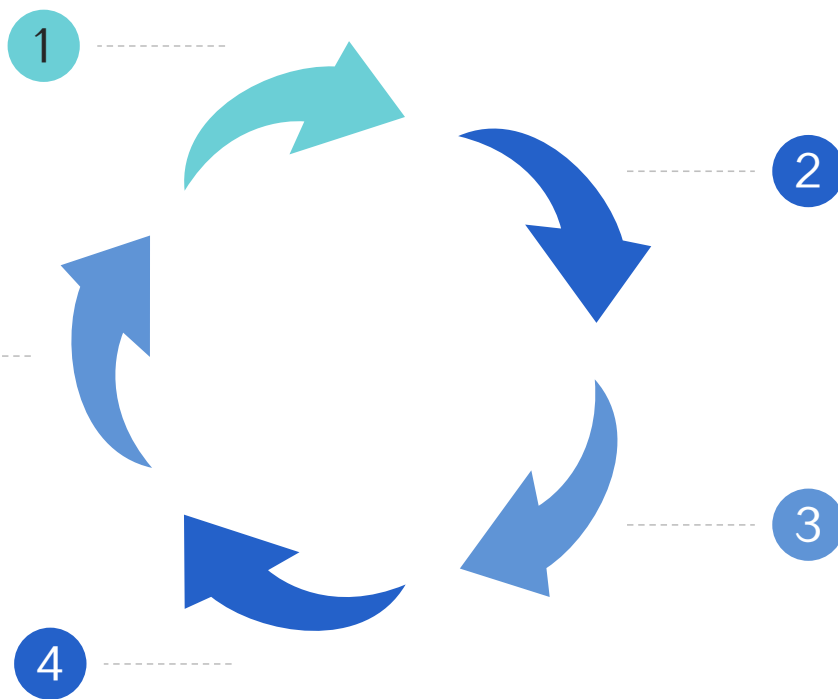
# 抗体人源化与抗体的特异性和亲和力

## 高亲和力鼠抗体进行人源化改造

嵌合抗体

镶面抗体

基于建模的人源性FR  
区重构



CDR移植与部分CDR  
移植

SDR移植

# 抗体的人源化

鼠抗体人源化

小鼠免疫获得抗体的亲和力

体外人源化改造去除  
免疫原性

人源性抗体

以人的Ig基因作为研究原料

通过体外的亲和力成熟  
来获得亲和力

# 抗体人源化改造的策略

获取目的基因的两个思路：

1. 用RT-PCR方法从**杂交瘤细胞**的mRNA中扩增VH及VL基因。
  - ① 已经通过动物的免疫系统完成了亲和力成熟
2. 用探针或者PCR从**基因文库**中钓取；
  - ① 通过人工建立基因文库，涵盖尽可能多的抗体基因用于筛选

# 抗体库技术是人源性抗体的主要方向

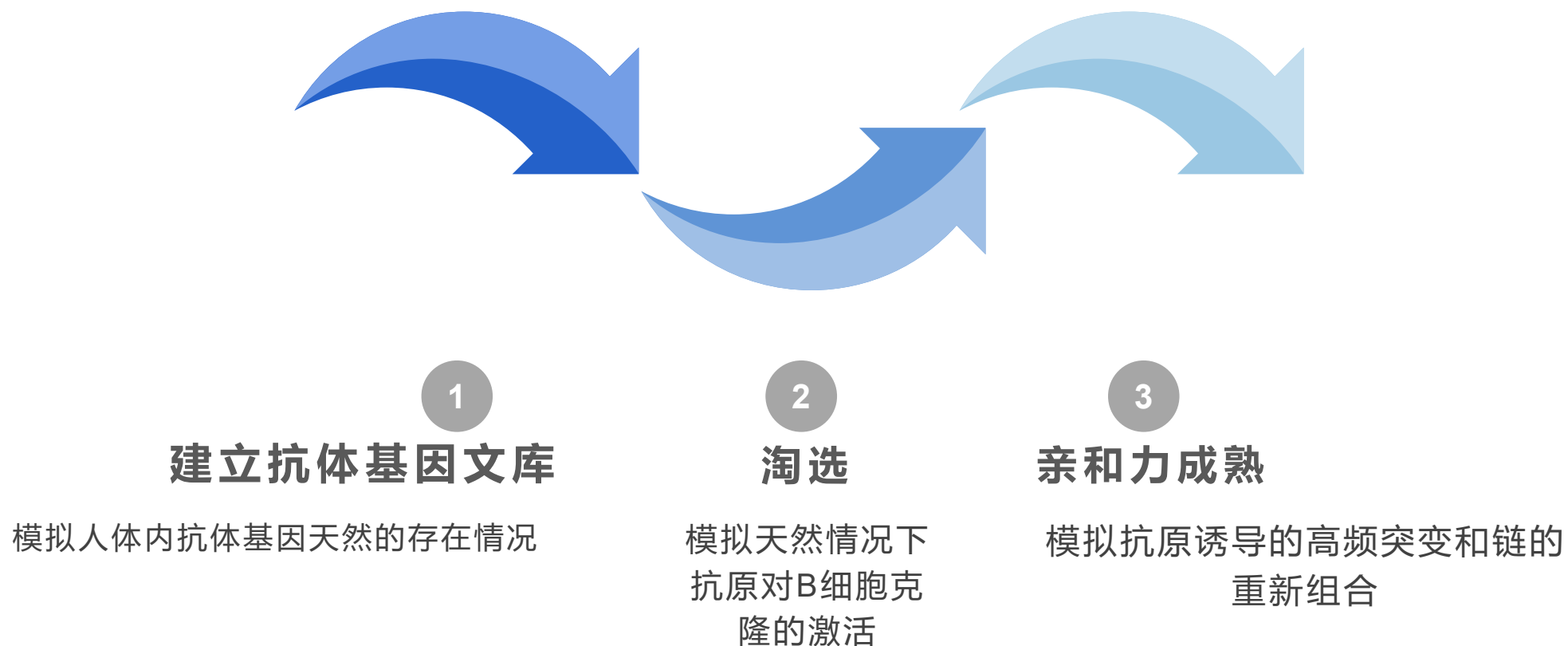
治疗性抗体的发展经历了异源抗体、人源化抗体和人源性抗体几个阶段。目前，人源性抗体是治疗性抗体发展的主要方向。

---

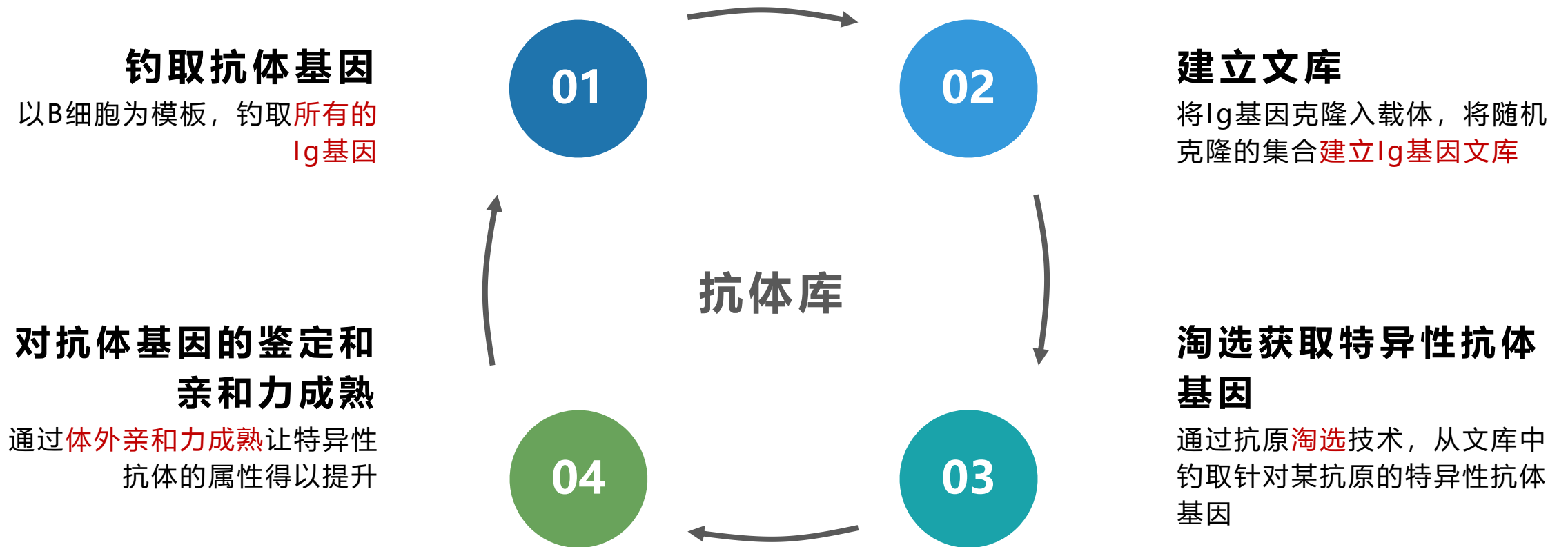
抗体库技术的出现为人源性抗体的制备提供了良好的技术平台，并且逐渐成为目前获得人源性抗体的主要手段之一。

# 抗体库的设计原则

在体外模拟体内抗体生成的生物学过程



# 抗体库技术的使用策略





# 一、库技术简介

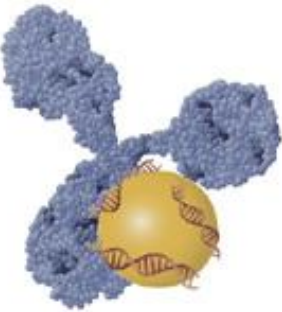
---



# 1.库技术

◆ 基因库 (gene pool) :

◆ 一个群体中所有个体的全部基因的**总和**。



◆ 基因克隆 (gene clone) :

将某一目的基因导入寄主细胞，在宿主细胞内目的基因被大量的复制，并保存在宿主细胞。

基因文库 (gene library) :

含有某种生物全部遗传信息的重组DNA分子的 **克隆总和**

# 基因库



图片来源: Veer图库 [www.veer.com](http://www.veer.com)

以游离的形式简单的混合

# 基因文库



以统一的形式混合，易于独立基因的钓取



# 基因文库就是随机克隆的集合

从**构建方法**来解释基因文库的建立：

从特定个体分离出来的一批基因，通过人工构建的方式，使这些基因以**克隆**的形式存在（用某种载体装盛导入某种宿主细胞）。

这样每个细胞就包含了一个基因片段与载体重组DNA分子，许多这样的细胞一起就包含了该生物全部基因信息，我们将这一个**集合体**叫做**基因文库**。

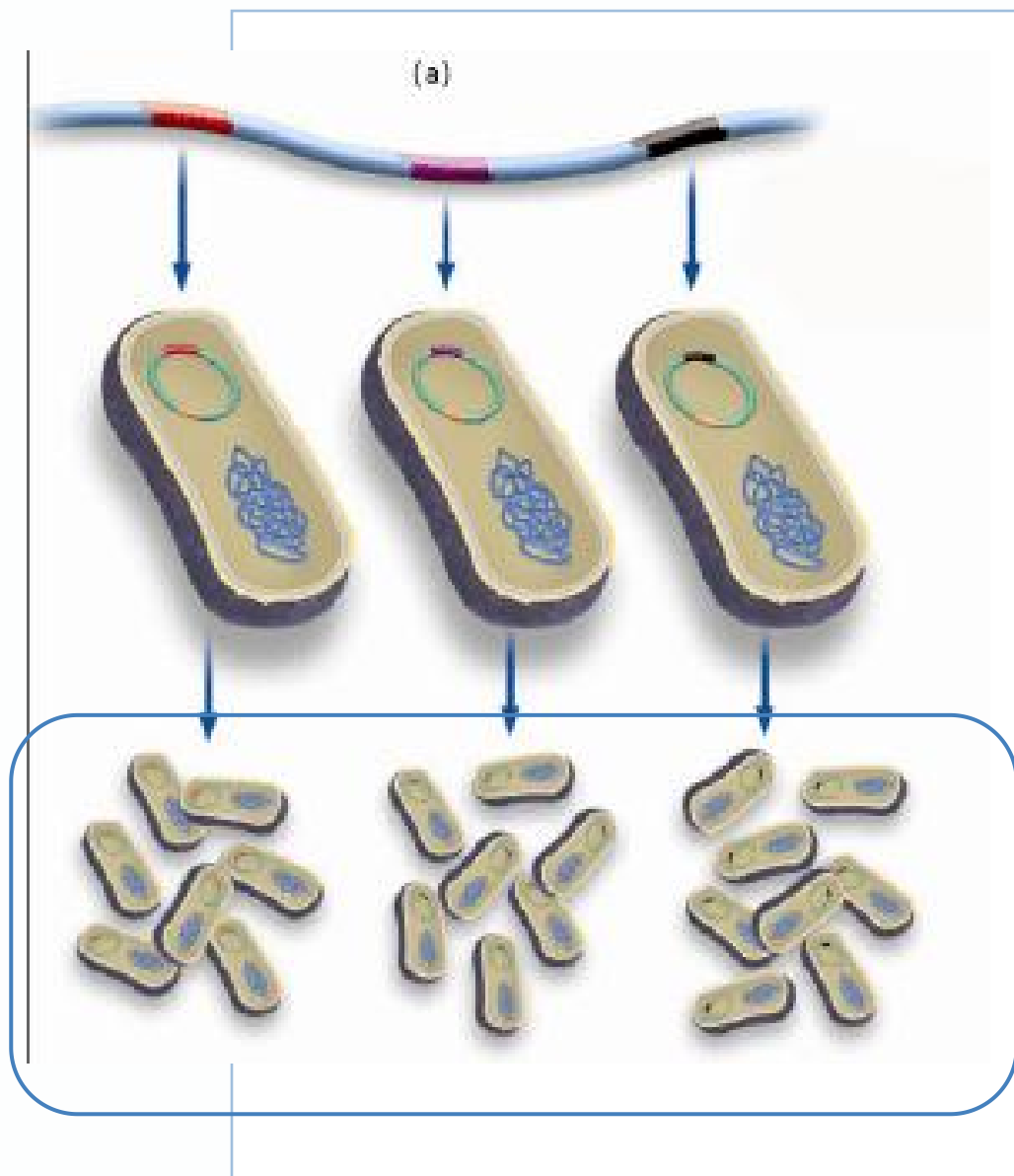




# 举例：

某生物基因DNA片段（例如 $10^n$ 个）与载体分子重组，重组DNA转化宿主细胞，转化细胞在选择培养基上长出的单个菌落（或噬菌斑）即为一个DNA片段的克隆。

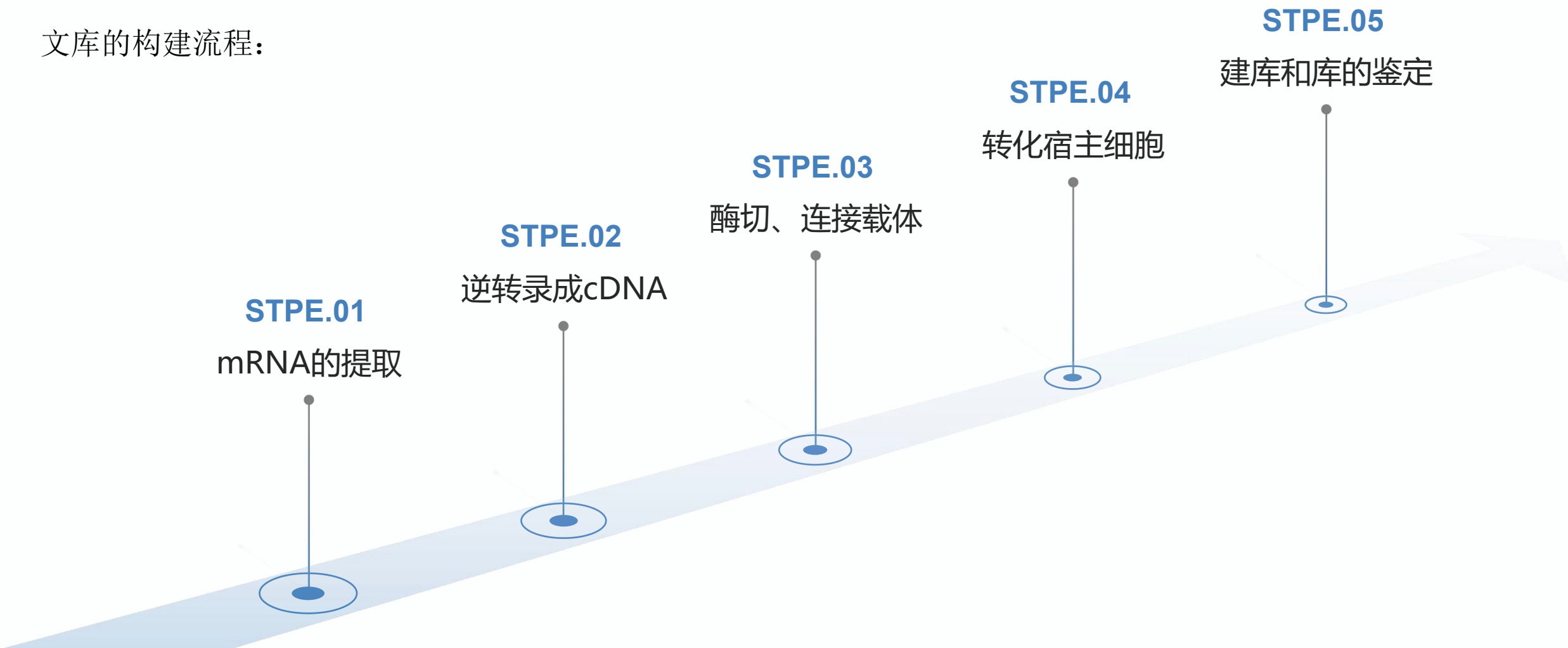
全部片段克隆的集合即为该生物体的基因文库。





# 文库的构建过程：

文库的构建流程：





## 2. 按照构建对象可以分为：

01

### 基因组文库

基因组文库是由一种生物的所有基因组DNA构建而成的。

02

### cDNA文库

cDNA文库是利用从RNA序列反转录形成的所有cDNA序列构建的。

03

### 特殊序列文库

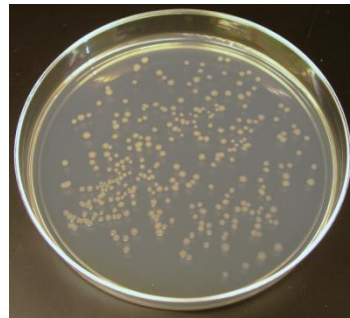
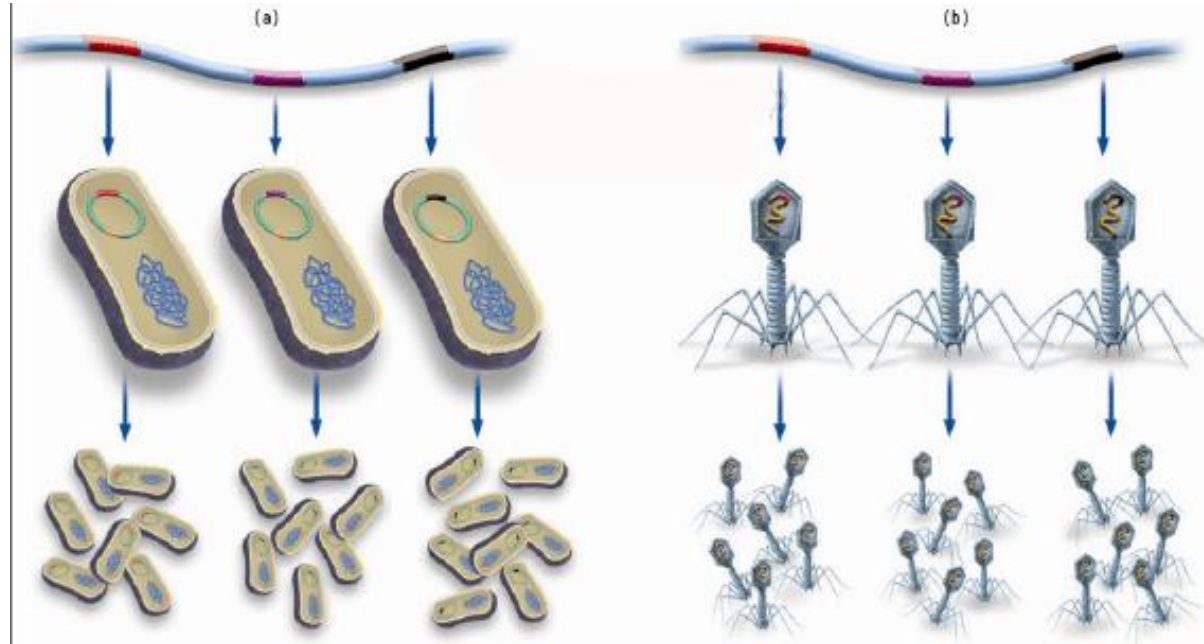
特殊序列文库是针对某些特殊基因或序列而建立的。  
(针对Ig基因, 称之为抗体库)





### 3. 按照宿主可以分为：

## 1. 细菌文库



## 2. 噬菌体文库

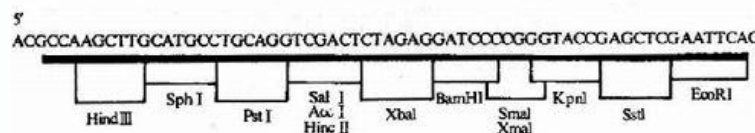
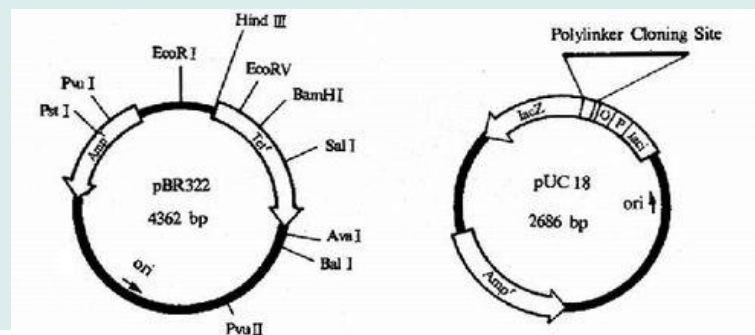




## 4. 按照载体特性可以分为： 克隆文库和表达文库

1. 克隆文库由克隆载体构建。
2. 表达文库由表达载体构建。  
与合适的宿主结合可以展示插入的基因信息。

一般克隆文库只负责保存基因信息，  
如果要做免疫筛选或者文库展示，  
则选择表达载体



克隆文库

表达文库





## 5 基因文库的 筛选



# 基因文库的应用（筛选方式）

## 一. 基因杂交法

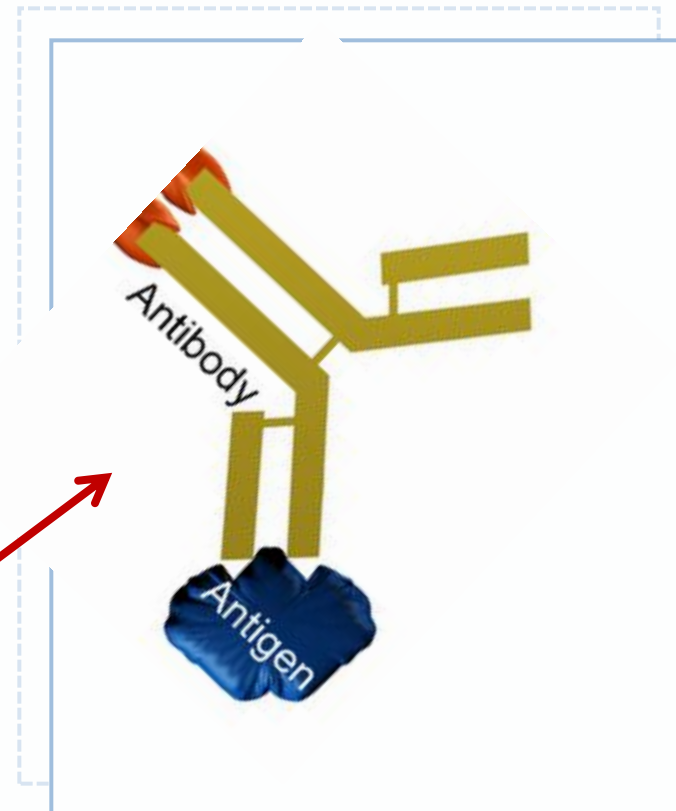
- RNA/DNA 探针法

## 二. 基因的PCR鉴定

- PCR钓取结合测序鉴定法

## 三. 基因的功能性筛选

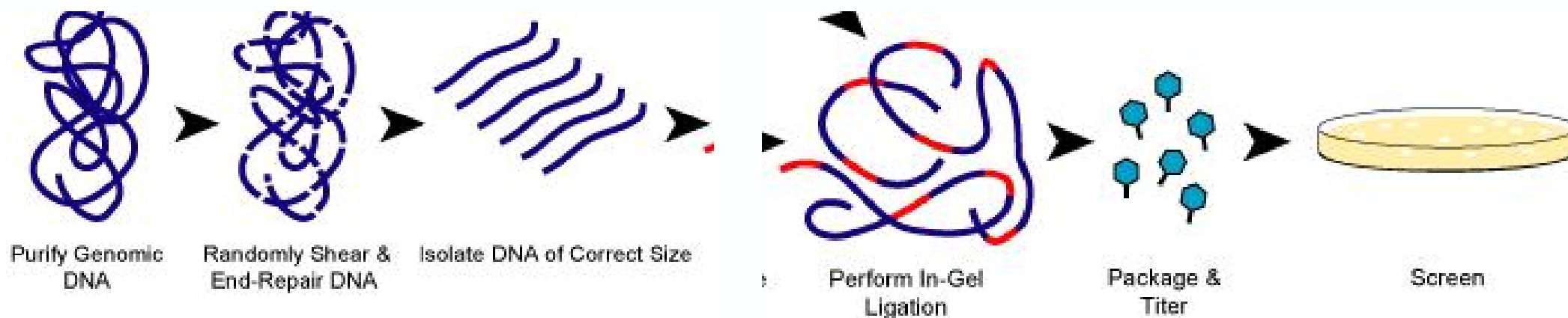
- 蛋白质相互作用, 抗体/抗原探针鉴定法





## 6. 基因文库的应用和优势

建立和使用基因文库是分离基因，特别是分离高等真核生物基因的有效手段。



- 6.1 使得连续的遗传信息片段化
- 6.2 使得目的基因通过克隆扩增的方式达到丰度的均一

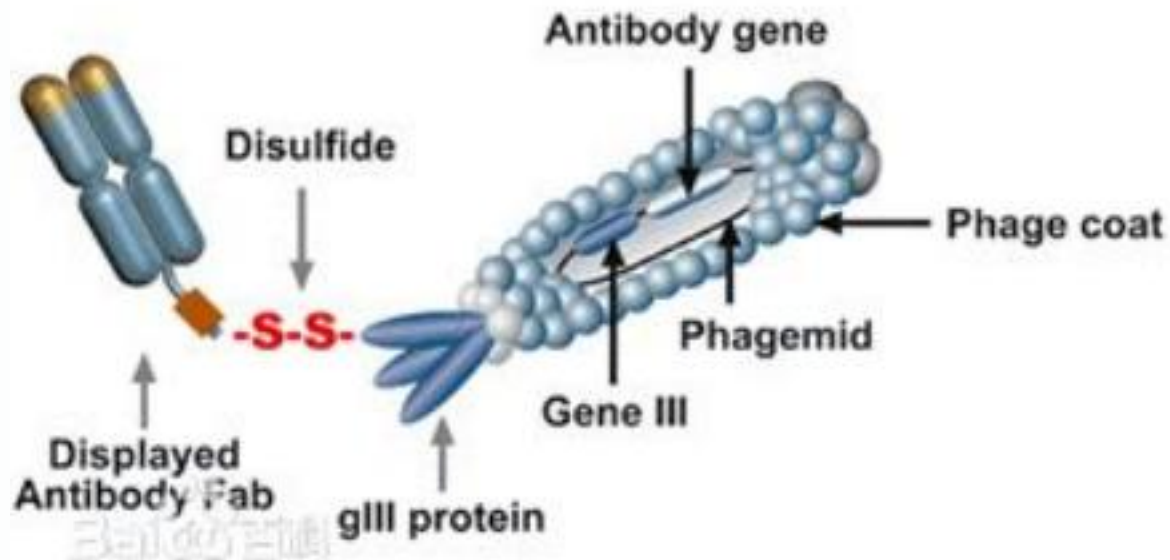




# 基因文库的应用和优势

举例： 表达文库可用于实现抗体基因和抗体亲和力的统一

噬菌体展示文库技术原理及抗体表面展示



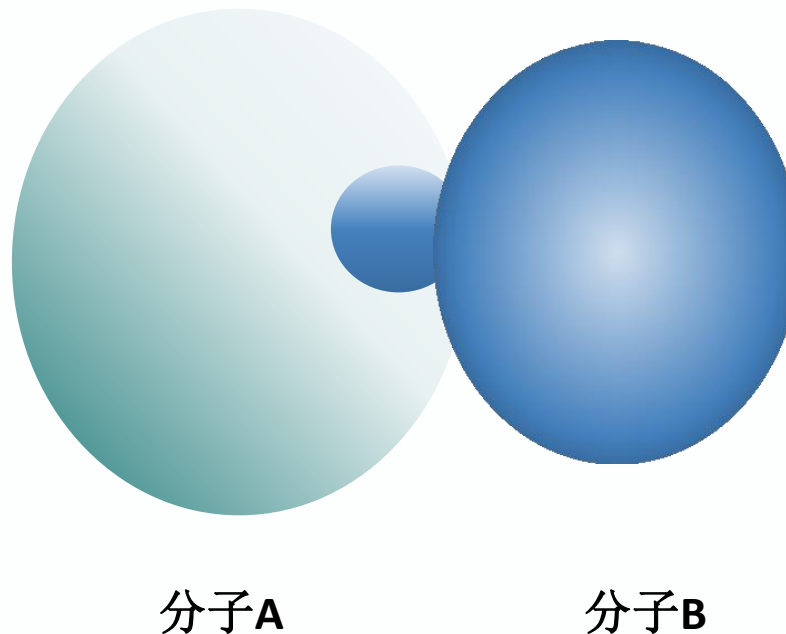
抗体基因被克隆到噬菌体内部后，抗体基因被表达在噬菌体的表面。通过噬菌体与抗原的结合，可以反推噬菌体包含的抗体基因的属性。



# 基因文库的应用和优势

## 6.3 表达文库可用于验证和分析基因产物的相互作用

文库技术对帮助理解基因的结构、功能、相互作用以及它们在生物体中的作用至关重要



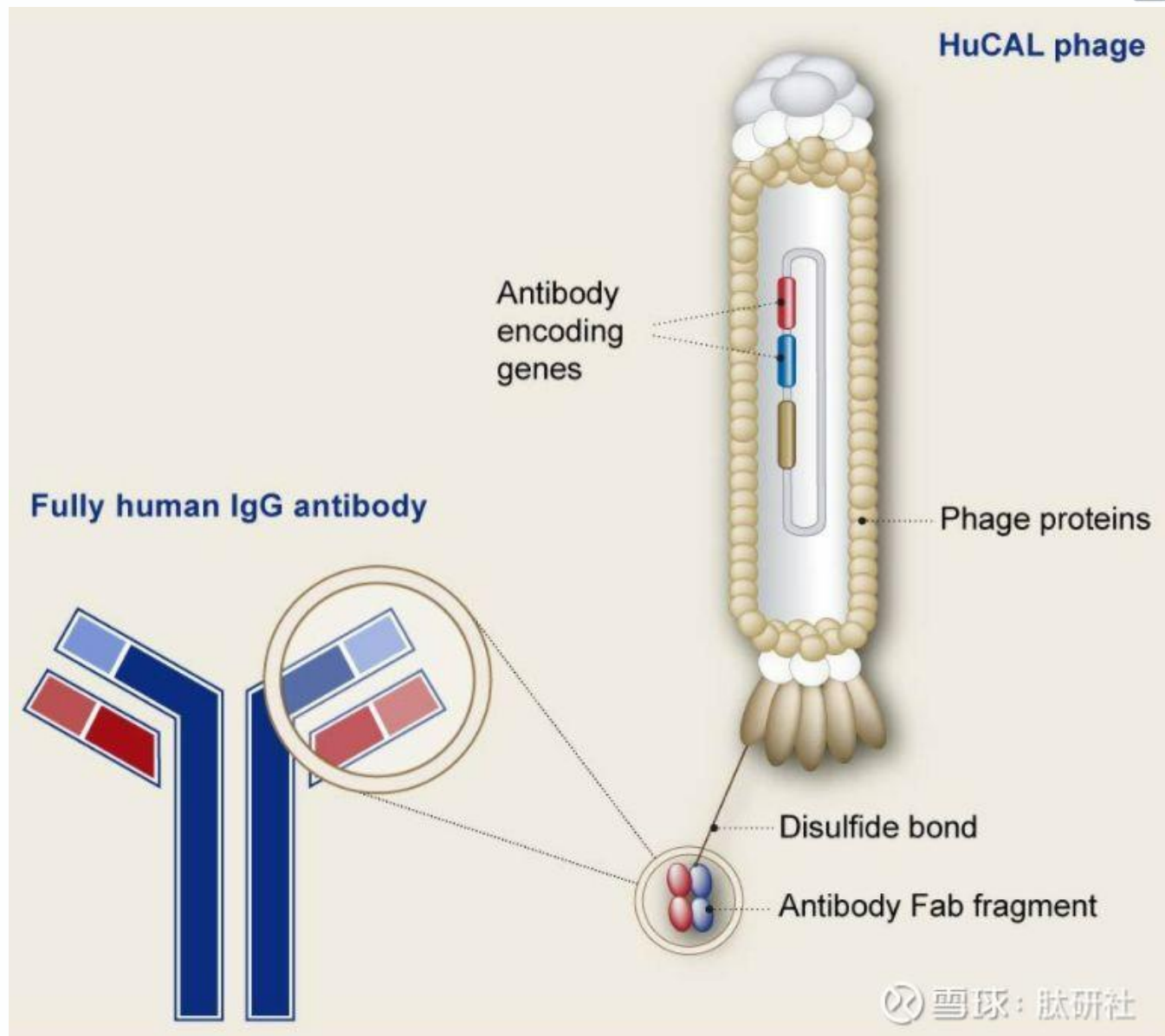




# 基因型和表型的统一

通过淘选能够与抗原特异性结合的噬菌体，就可以获得编码特异性抗体的基因片段。

噬菌体表面的抗体如果能够与抗原结合紧密那么其基因组就必定包含能够特异性结合抗原的抗体基因。



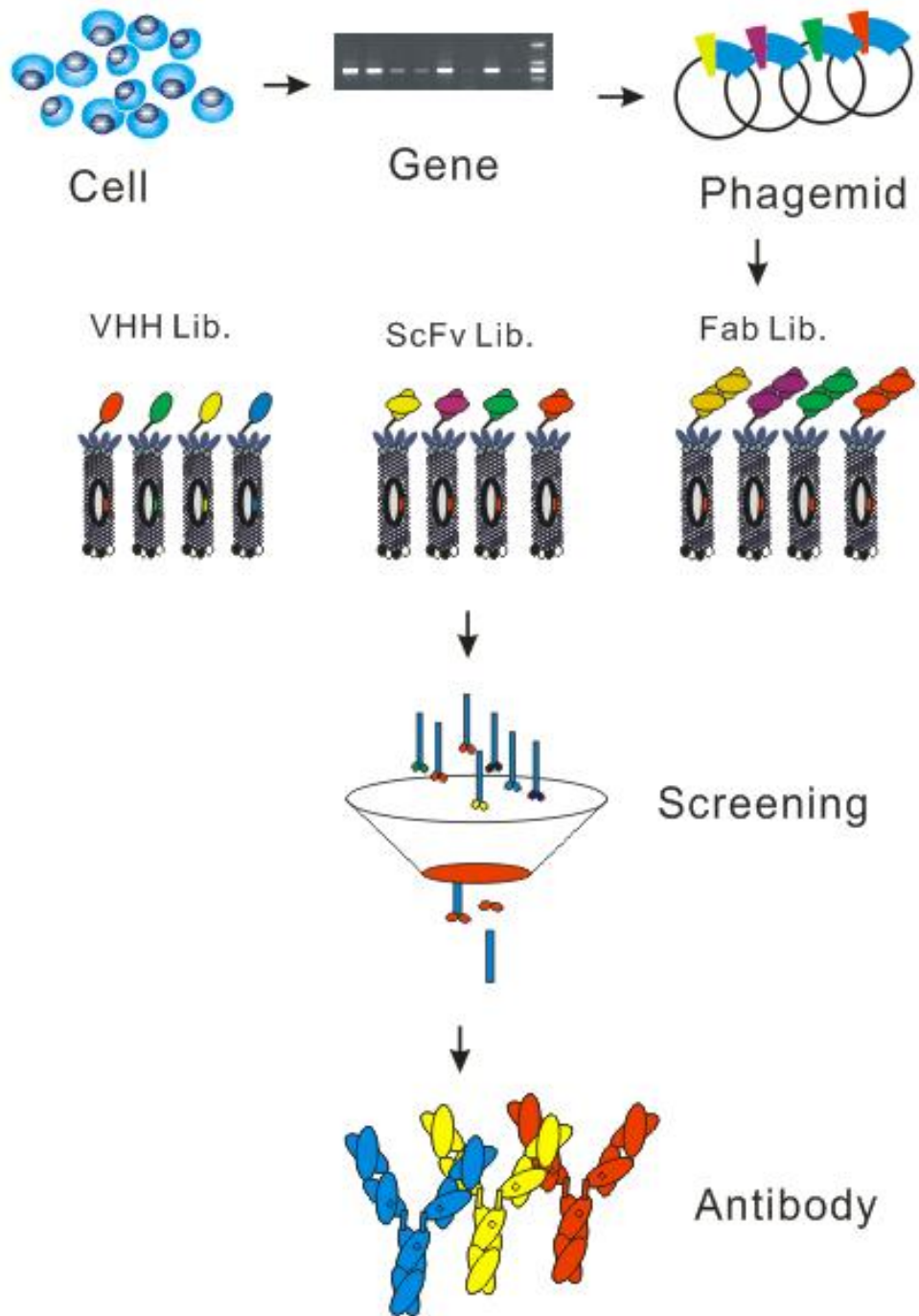


## 二、抗体库技术

- 一. 抗体库的基本概念
- 二. 抗体库的技术基础
- 三. 抗体库的类型
- 四. 抗体库的应用







# 1. 抗体库的基本概念

**抗体库技术**是将某种动物的抗体**可变区**基因克隆在质粒或噬菌体中表达，利用不同的抗原筛选出携带特异抗体基因的克隆，从而获得相应的特异性抗体的技术。

根据抗体基因的类型可以分成：

VHH/VH 文库

ScFv 文库

Fab 文库





# 抗体基因文库钓取的基因类型：



抗体文库钓取的基因类型：

## NO.01 VHH

重链抗体可变区

## NO.02 ScFv

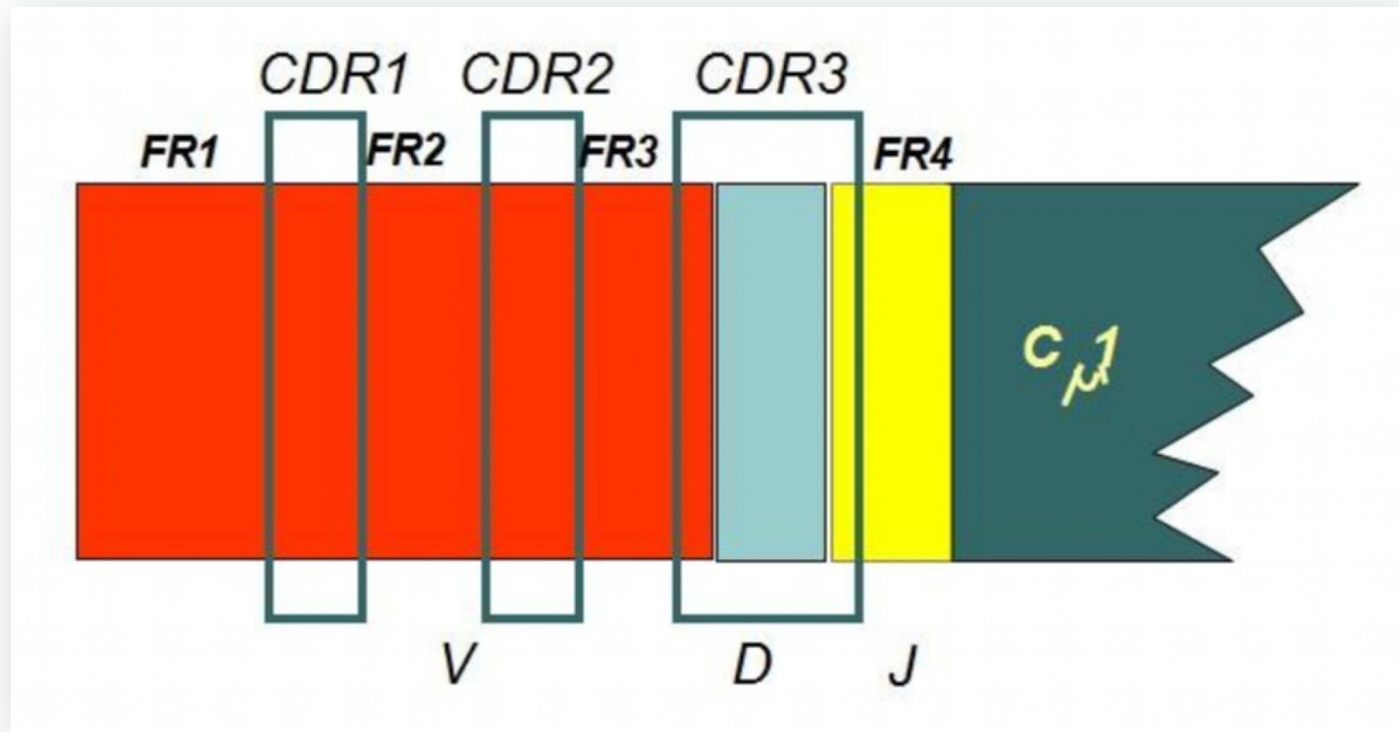
轻链、重链抗体的可变区，用人工链接的方法，形成单链基因片段，并插入载体转染宿主。

## NO.03 Fab 文库

轻链和重链的基因被分别克隆并插入到载体中。当这些基因在宿主细胞中表达时，轻链和重链蛋白质会按照其自然的配对方式组装在一起，形成完整的Fab抗体片段。



## 2. 抗体库的技术基础



2.1 PCR技术的出现和发展使人们能够使用一套引物扩增出全套免疫球蛋白可变区基因；

**技术基础：**

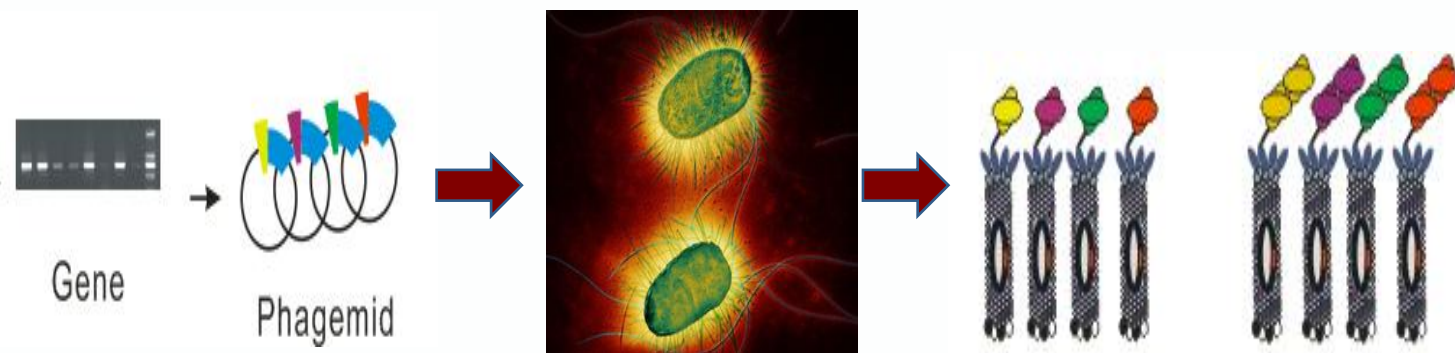
- 引物设计
- 大量兼并引物的应
- 多重PCR



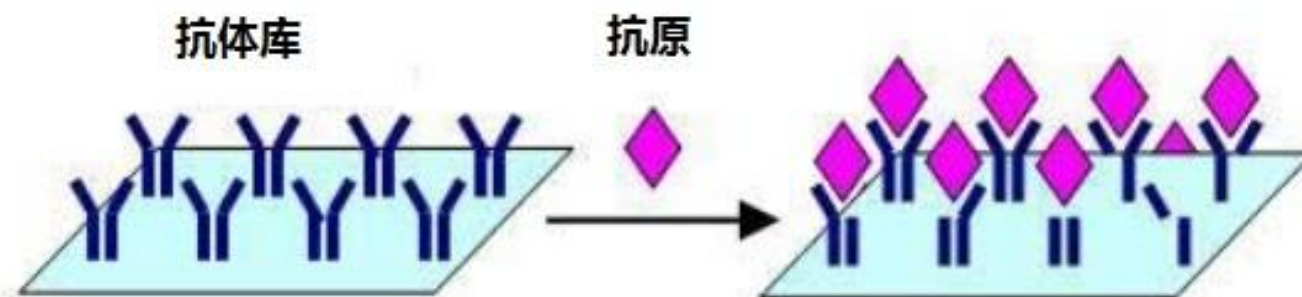


## 2. 抗体库的技术基础

2.2 利用表达系统成功表达出具有**抗原结合功能**的抗体分子片段。

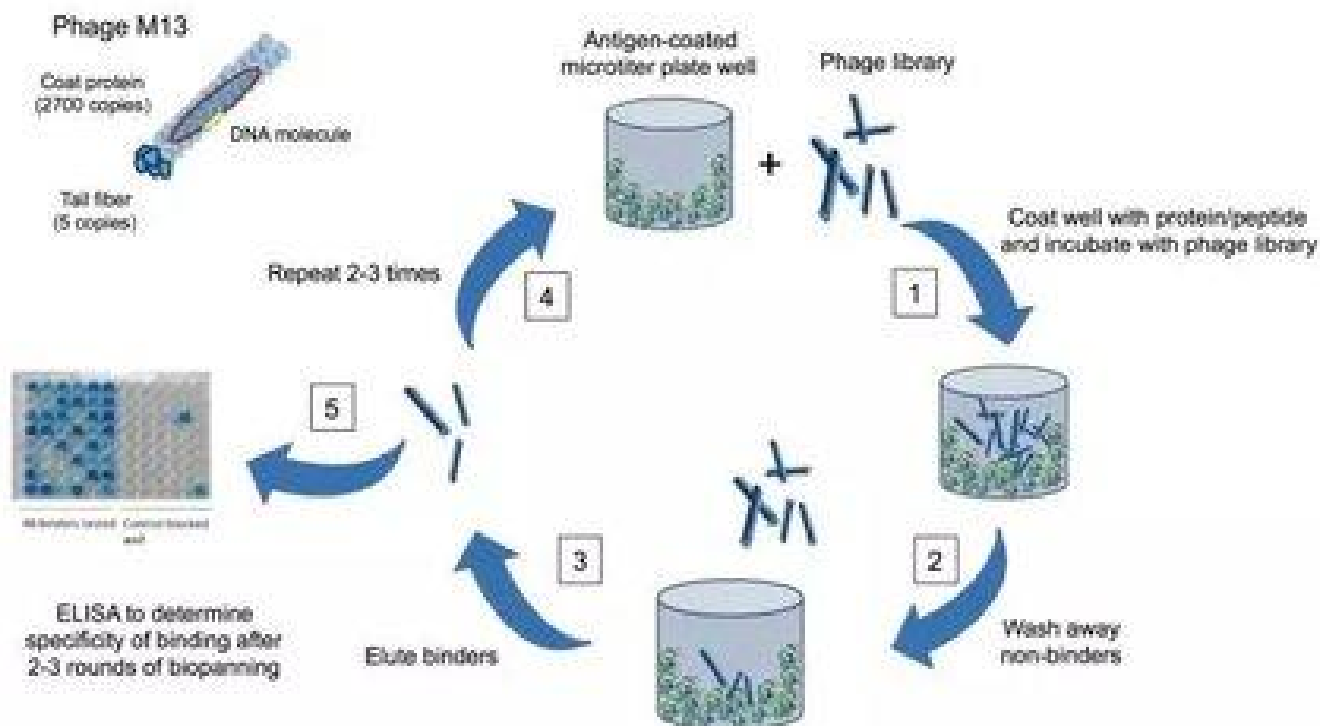


文库不仅要涵盖所有的抗体基因，还要能将这些基因表达成能与抗原结合的抗体



## 2. 抗体库的技术基础

### 2.3 有效的鉴定系统能够有效的获得高亲和力高特异性的抗体基因。



基于抗原抗体特异性结合的特性，**淘选**特异性高亲和力抗体。



# 抗体库的技术流程：

01

**基因钓取：**  
用基因克隆技术克隆全套抗体重链和轻链可变区基因；

02

**载体构建：**  
分别重组到特定的原核表达载体中；

03

**建立文库：**  
转化大肠杆菌以表达有功能的抗体分子片段；

04

**淘选：**通过亲和淘选富集获得特异性抗体可变区基因的技术。

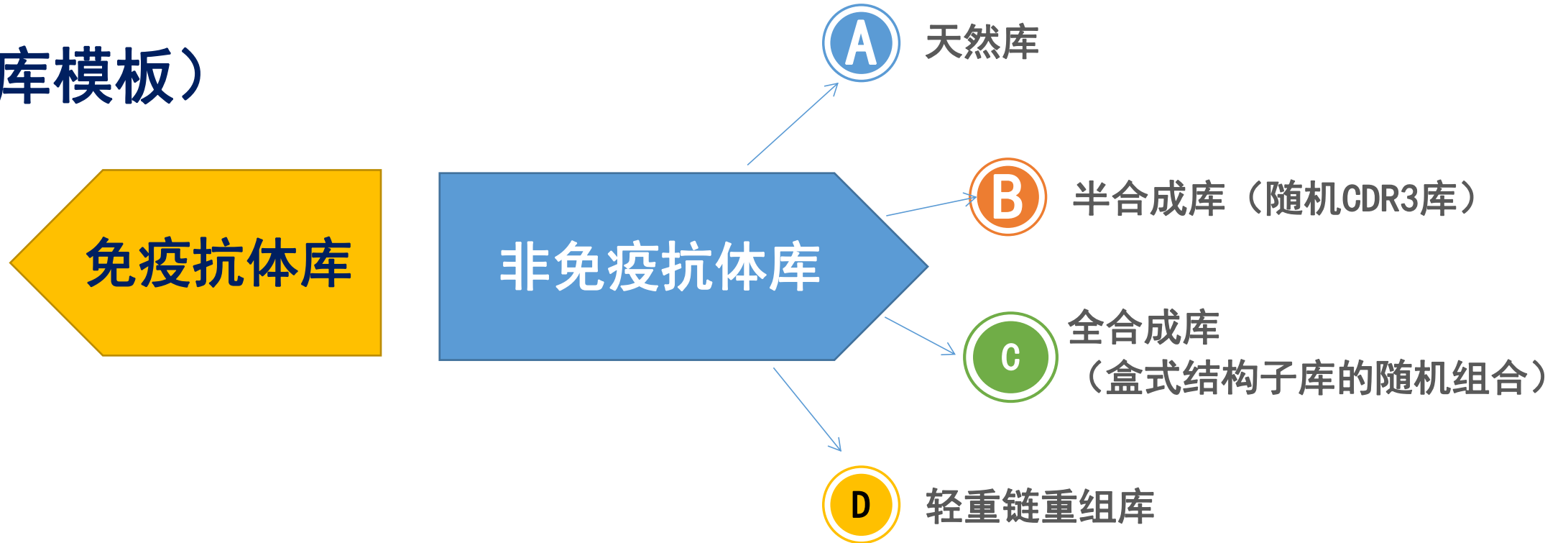
05

**制备：**利用抗体库技术筛选到的抗体基因将被用于构建和表达基因工程抗体。



### 3. 抗体库的类型

(建库模板)




- 按抗体基因的来源可以将抗体库分为：**免疫抗体库**（抗体基因来源于免疫动物的免疫细胞或者融合骨髓瘤细胞）；**非免疫抗体库**（来自未经任何抗原刺激的B细胞）





## 3.1 免疫V基因库

来源于免疫的人或动物的B细胞IgG mRNA

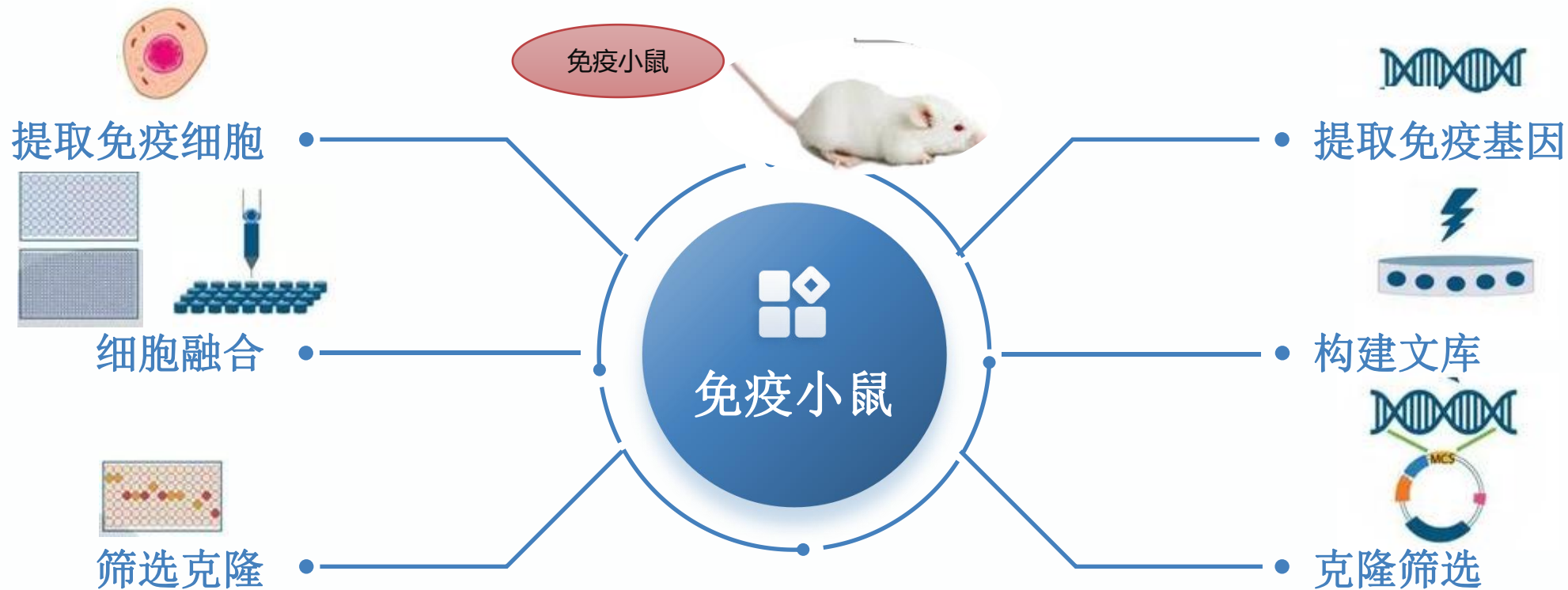
- **优点**：经过亲和力成熟，对高亲和力抗体可以预期；
- **不足**：
  - 获得的是  抗体，每一种抗原都需要单独建库
  - 需要免疫：费时（数月）
  - 对感兴趣抗原的免疫反应的不可预见性
  - 对某些低免疫原性抗原（如自身抗原或毒性分子）缺乏反应性







# 免疫V文库与杂交瘤单克隆抗体技术



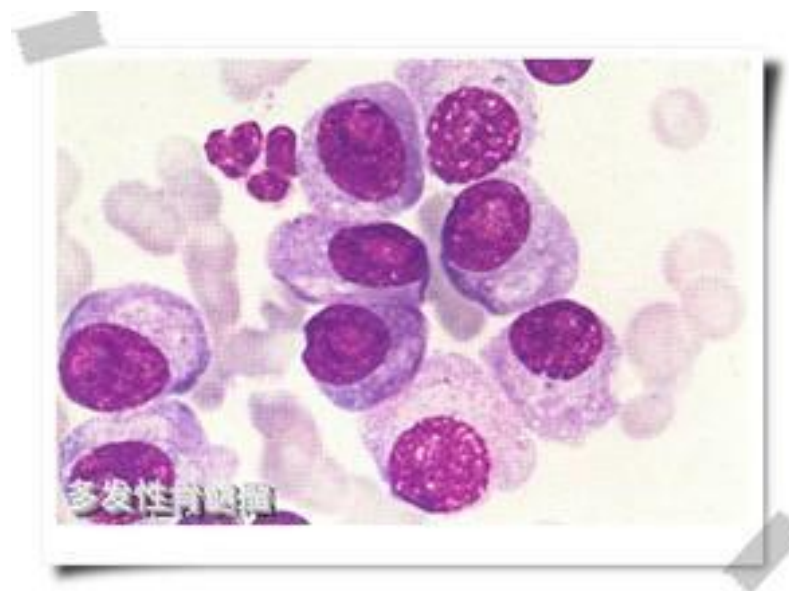
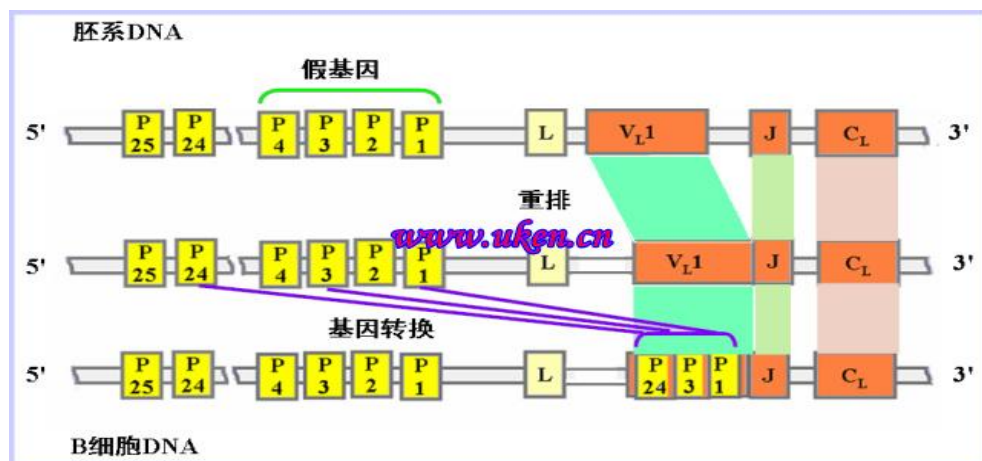
基于细胞工程手段进行特异性抗体基因的获取

基于基因工程手段进行特异性抗体基因的获取



## 3.2 天然V基因库

- 来源于非免疫的人或动物的B细胞IgG mRNA
- 理论上， B细胞库， 鼠 $10^8$ ， 人 $10^{12}$ ， 容量巨大



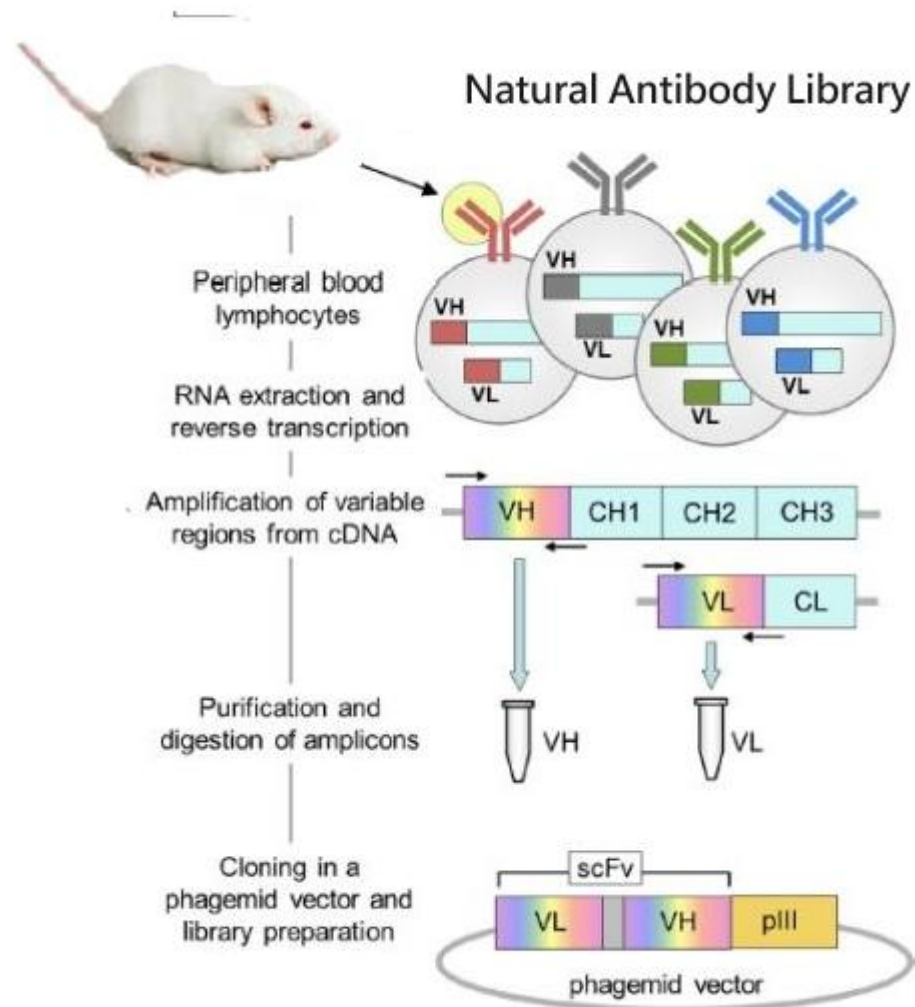
包含未经免疫的抗体基因  
编码的所有可能性

能够代表人或动物中所有初级B细胞的全貌。



## 3.2.1 天然库的优点

- 一个库可用于针对所有抗原
- 可获得人抗体
- 可产生针对自身抗原、非免疫原或毒性物质的抗体
- 如果库容足够大，只需2~4轮筛选可直接筛出高亲和力抗体





## 3.2.2 天然库的不足

- 未经免疫，未经历亲和力成熟，**高亲和力抗体的概率偏低**
- 只有在库容较大的情况下，才可能涵盖抗体亲和力的全貌
  - 如果库容较小，可能无法获取特异性抗体，或只能得到低亲和力的抗体
- **构建费时费力**
  - 由于对天然库的**大量未知及不可控因素**，影响着库的内容及质量

- 1.天然免疫抗体库的特异性相对较低。
- 2.天然免疫抗体库的抗体种类和数量有限。
- 3.天然免疫抗体库的形成和调控机制尚未完全阐明。



### 3.3 半合成抗体库

|             | IgH                                  | Ig $\kappa$ | Ig $\lambda$ |
|-------------|--------------------------------------|-------------|--------------|
| V(D)J基因片的组合 |                                      |             |              |
| V           | 65                                   | 40          | 30           |
| D           | 27                                   | 0           | 0            |
| J           | 6                                    | 5           | 4            |
| V X D X J   | 10530                                | 200         | 120          |
| 轻链和重链的组合    | $320 \times 10530 = 3.3 \times 10^6$ |             |              |
| 不准确的连接      | 多样性增加100倍                            |             |              |
| N核苷酸插入      | 多样性增加300倍                            |             |              |
| 多样性预期       | $10^{11} \sim 10^{14}$               |             |              |

天然抗体库不经免疫刺激，重排概率低，库容很小





**定义1：**人工合成一部分可变区序列与另一部分天然序列组合构建的抗体库

在人类的重链片段中，第一和第二个CDR是由种系编码的，基本上是具有规范结构的。

而**CDR3**是通过D区和J区组合而成的，序列具有高度的多样性，长度可以从2个氨基酸到26个氨基酸不等，是抗体多样性和特异性的决定因素。



### 3.3.1 半合成库的构建



## 3.3 半合成抗体库

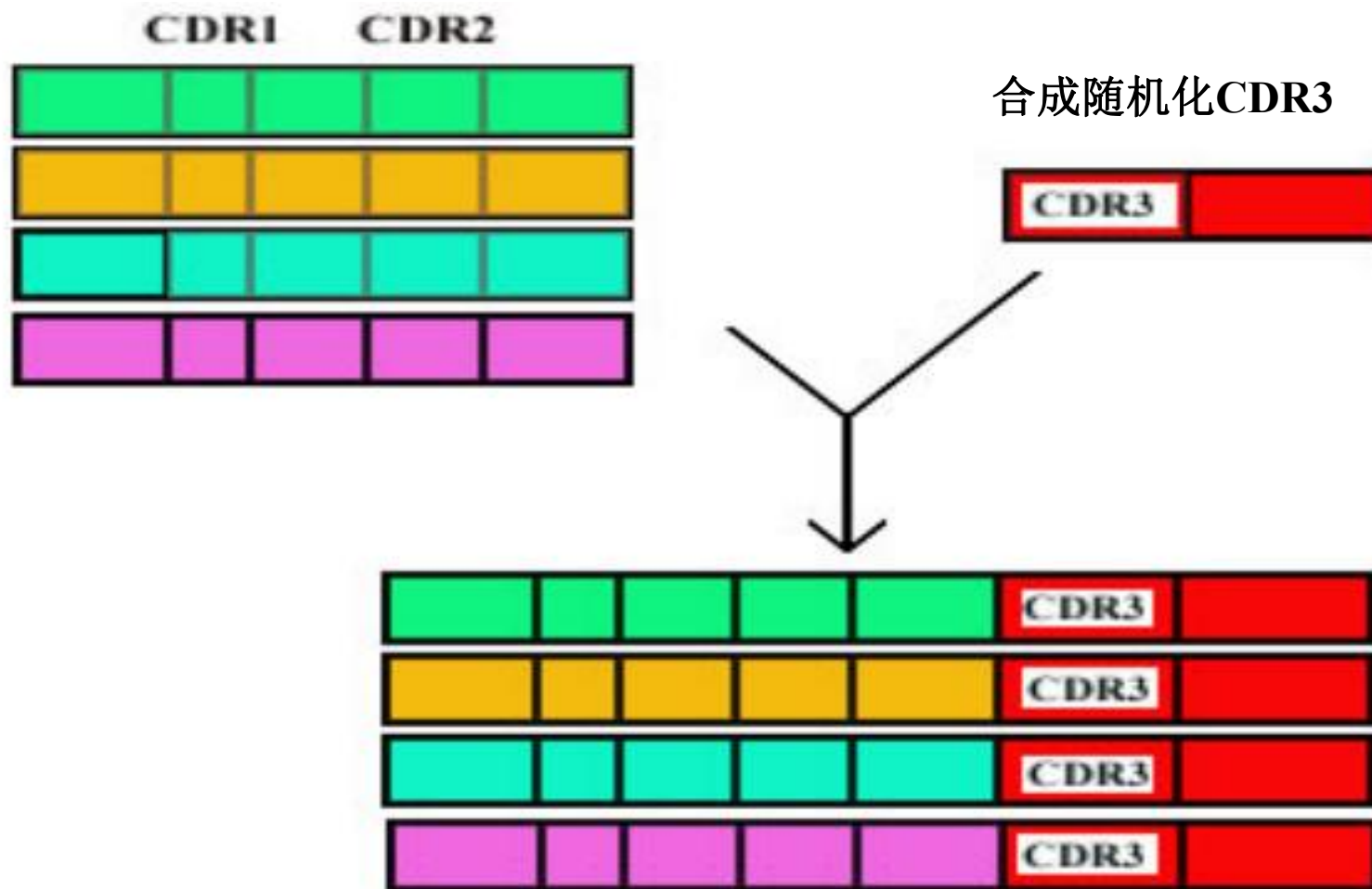
- **定义2:** 天然库的CDR1和CDR2区与人工合成的随机CDR3区的合成
- 实现抗体库功能的进一步优化，弥补天然抗体库库容不足的问题

- CDR3序列随机化
- CDR3长度多样性
- 可以模拟天然的抗体亲和力成熟的过程



## 3.2.1半合成抗体库示意图

人工增加抗体的多样性







### 3.3.2 半合成库的优缺点

#### 优点：

- 人工合成编码5~8，或者6~15个氨基酸的核苷酸序列来代替天然库中的CDR3序列，可以极大的扩充抗体库的容量。10<sup>9</sup>扩充到10<sup>12</sup>。
- 并且通过CDR3区的随机化，模拟了天然V(D)J重排所产生的抗体亲和力成熟。

#### 缺点：

CDR3为随机合成而可能形成完全无活性的克隆；  
长度变化也受到限制。

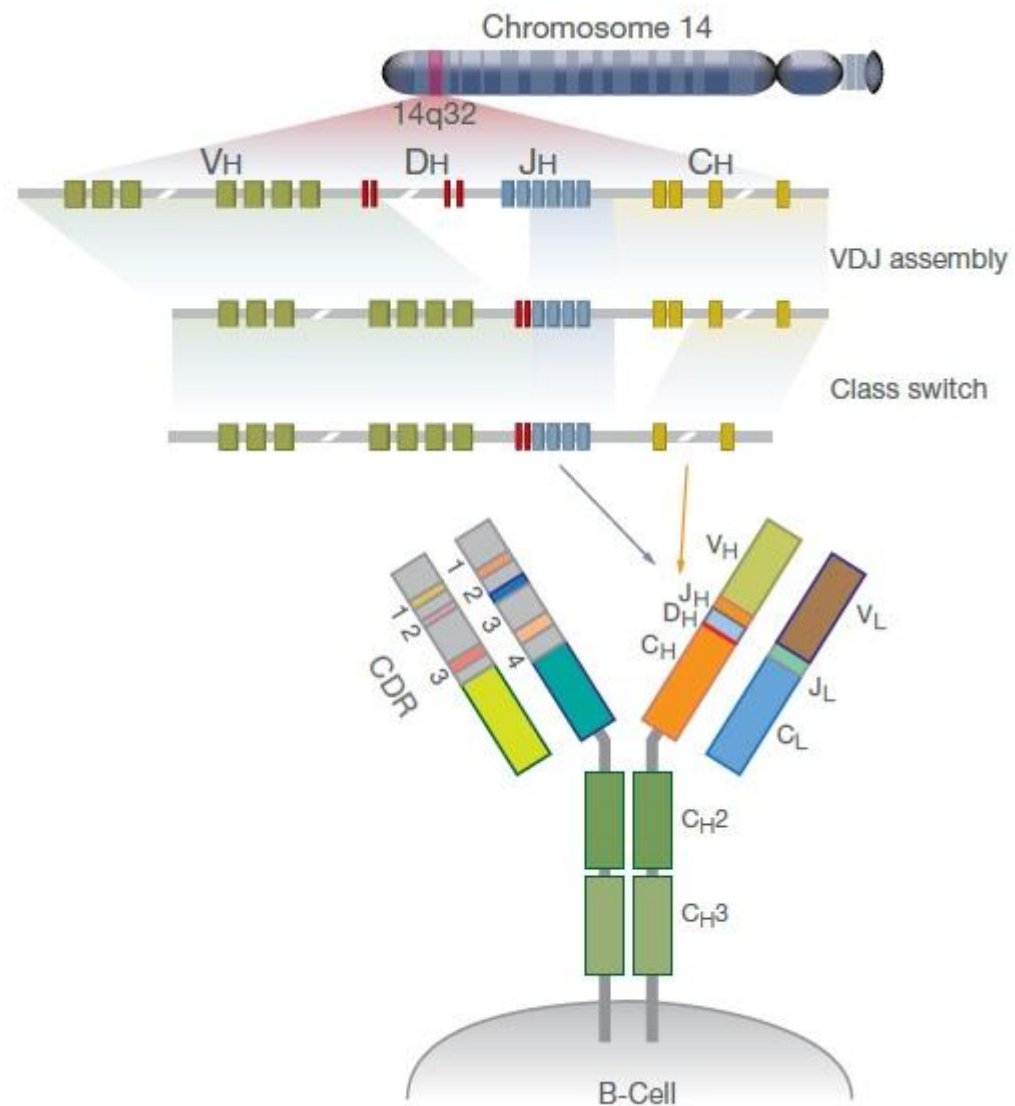




## 3.4 全合成抗体库

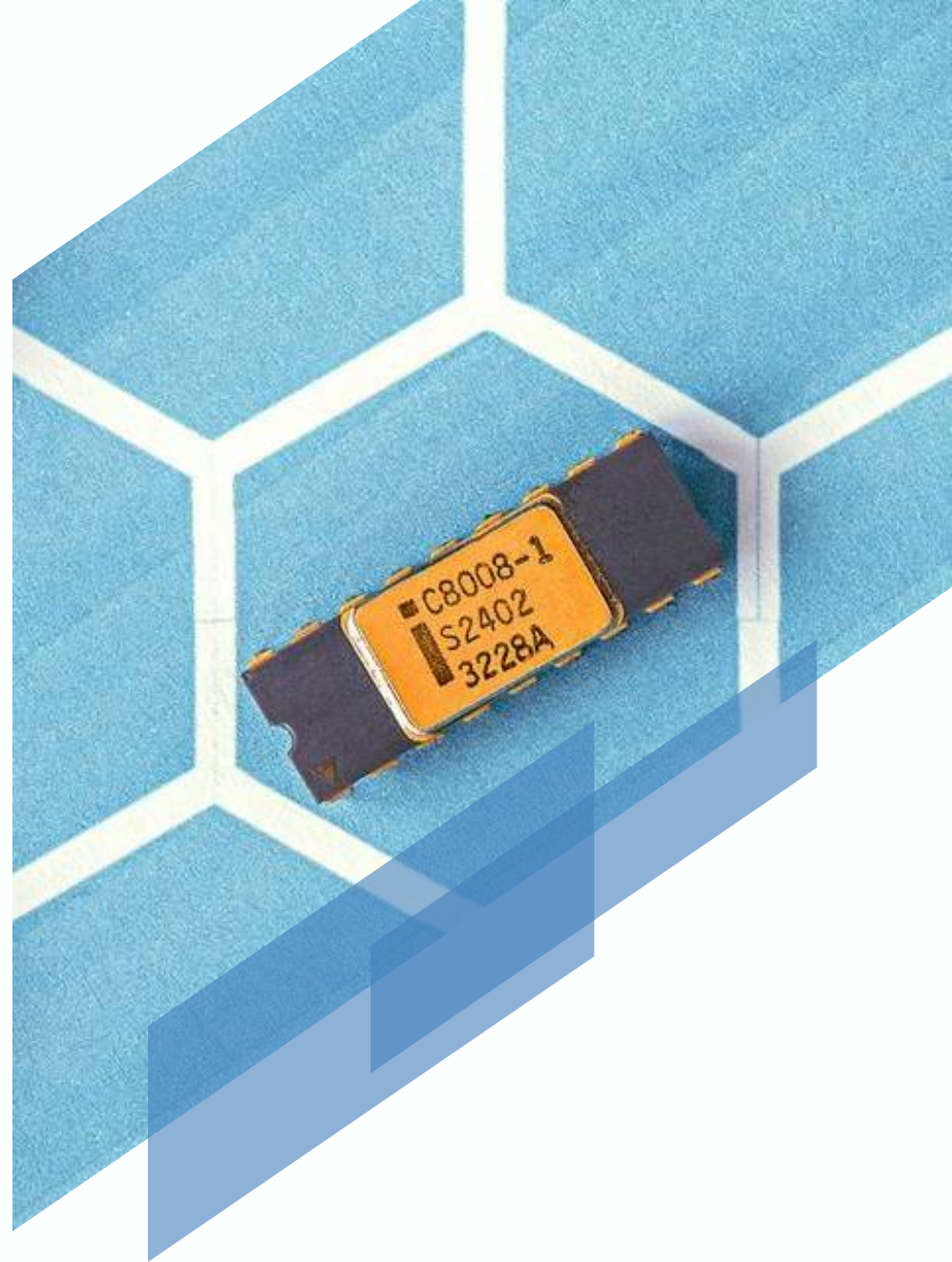
完全合成人抗体库 (the fully gene-synthetic human combinatorial antibody library)

7个  $V_H$  和 7个  $V_L$  基因家族 框架区 覆盖了 人类 抗体 多样性的 95%



## 3.4. 全合成抗体库

- 信息学基础：抗体的序列信息及结构信息
- 分类分组
  - 14个亚组：7个VH，4个V $\lambda$ ，3个V $\kappa$   
(选择部分使用频率较高的人抗体胚系基因家族的通用序列)
  - 设计并合成14个亚组各自通用的基因，作为构建组合库的主干基因库

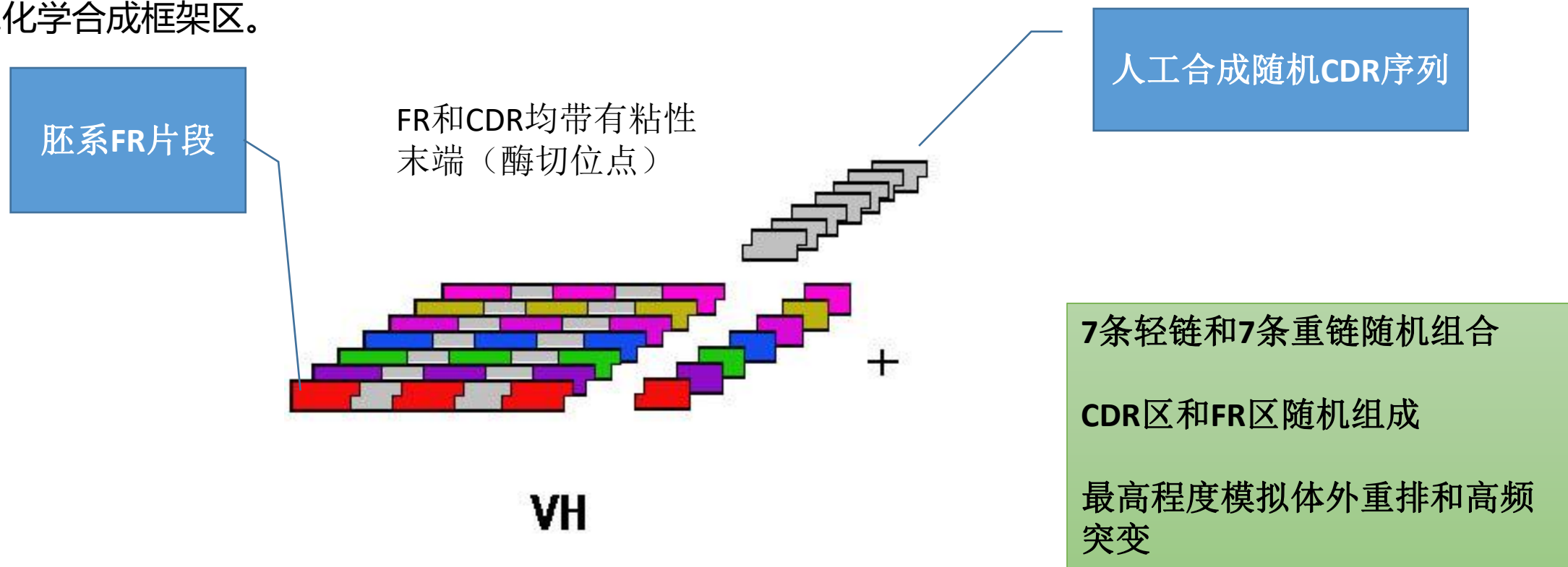


# 3.4.1 全合成抗体库

## 构建方式:

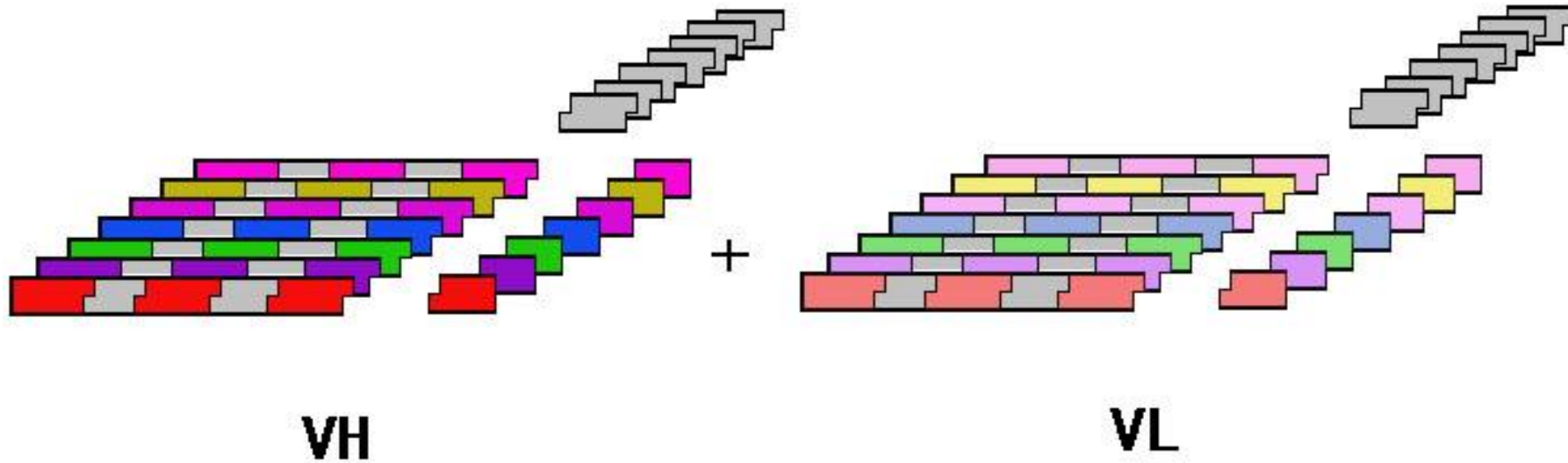
1.对重排后和胚系抗体结构进行聚类分析, 选取14条框架区, 代表14种抗体家族。(7重链, 4κ链, 3λ链)

2.化学合成框架区。



3.将随机CDRS和49个框架区子库进行酶切后连接建库。

## 3.4.1 全合成抗体库示意图



7个VH, 7个VL, 共49个子库

CDR盒式结构

嵌入一些特征：限制酶切位点，大肠杆菌偏爱密码子

构建完全模式化的载体系统pCAL



## 3.4.2 合成抗体库的优势

01

能够通过平行或逐步随机化CDR进行快速的亲和力成熟过程

02

具有很好的多样性，比常规单核苷酸诱变优越，库质量高

03

能够产生用于诊断和治疗的人抗体

04

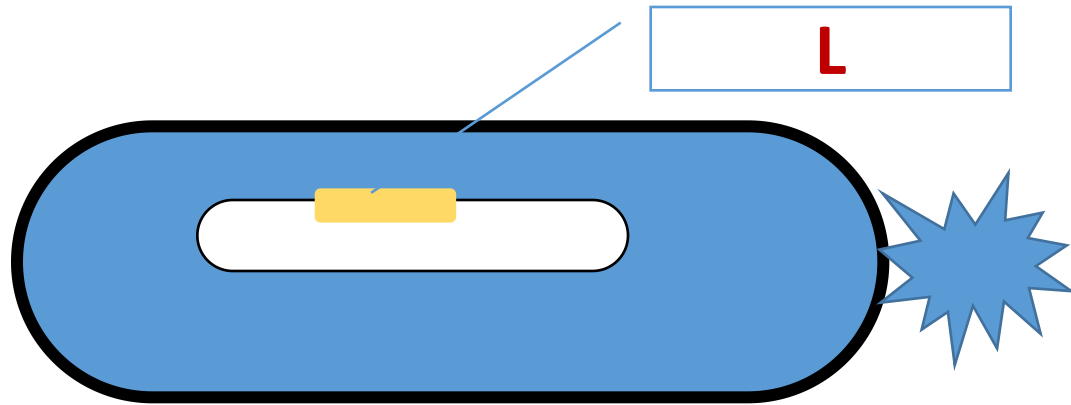
操作可控性强



# 4. 组合感染法提高抗体库的库容

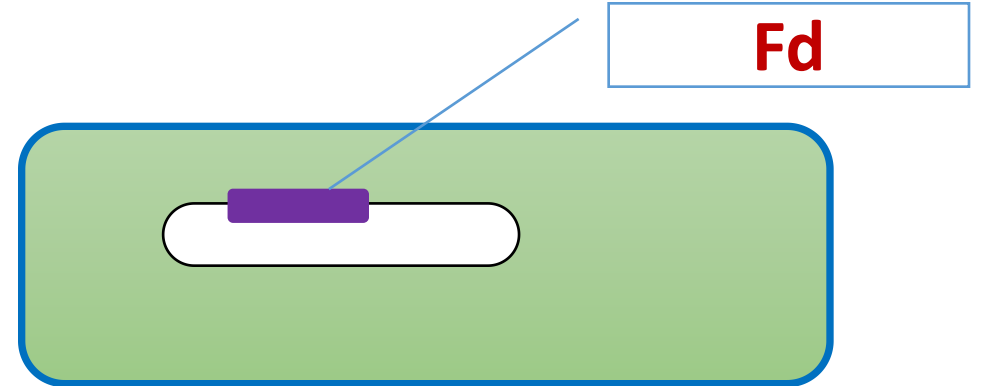
抗体由重链和轻链组成，轻链和重链的合理装配是抗体亲和力和特异性形成的关键因素

抗体轻链可变区(L)=VL+CL



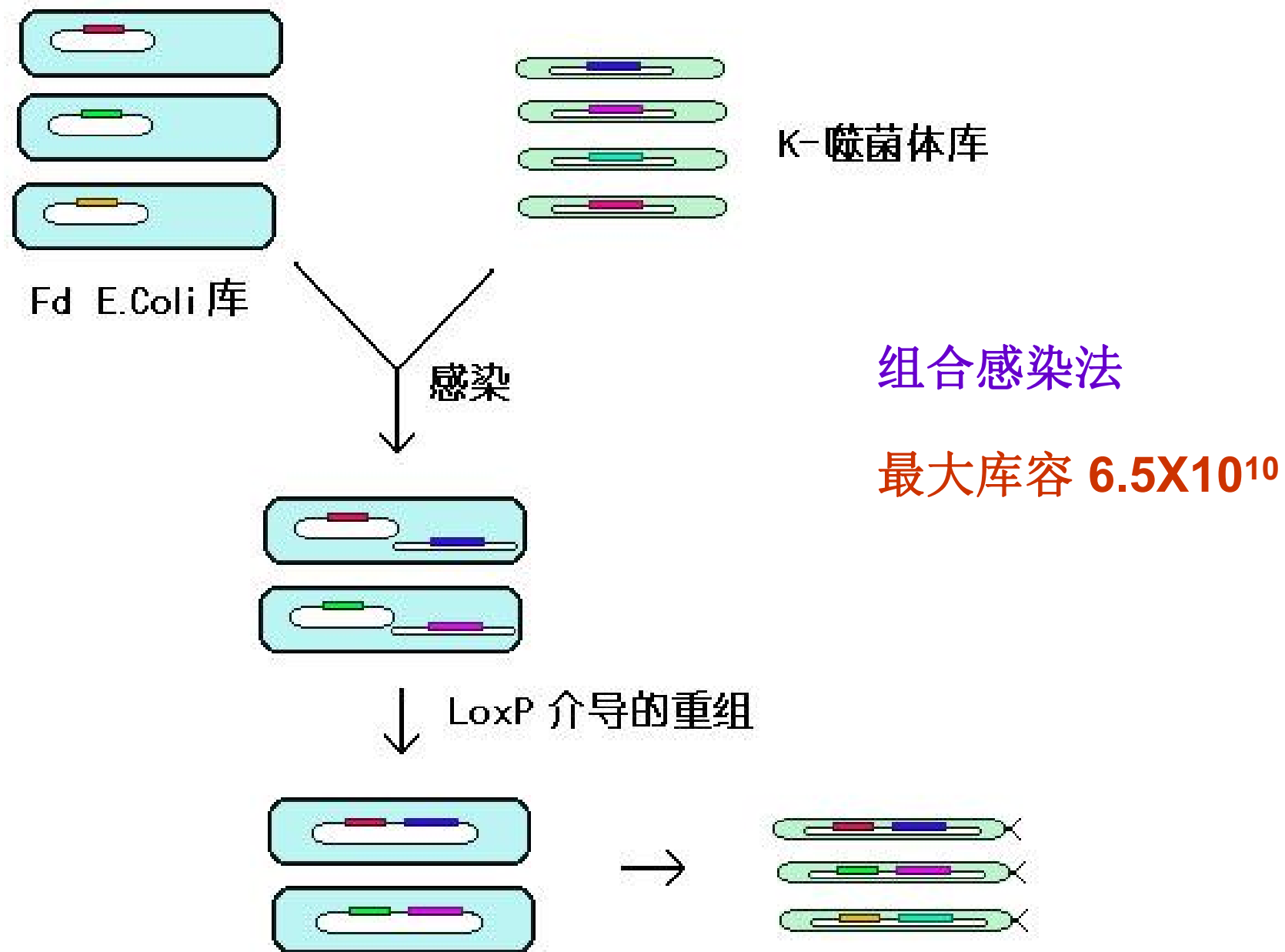
抗体轻链可变区噬菌体库

抗体重链可变区(Fd)=VH+CH1



抗体重链可变区大肠杆菌库

# 组合感染法构建抗体库







## 5、抗体库的鉴定分析

- 抗体库评价指标：

### 代表性

- -是否可以涵盖全部需要表达的信息（是否包含尽可能多的编码抗体基因的信息）
- 代表性取决于**克隆的种类（多样性）**和每种基因信息的**拷贝数（库容）**。





## 什么是多样性 (diversity) ? 什么是库容 (size) ?

比如，一个鱼池里有100只鱼，全是一种鱼（比如鲫鱼），鱼群的库容是100，多样性是1。

如果这100只鱼属于100种鱼（比如鲫鱼、鲤鱼、黄花鱼等），鱼群的库容和多样性都是100。





## 5.1 库容和多样性

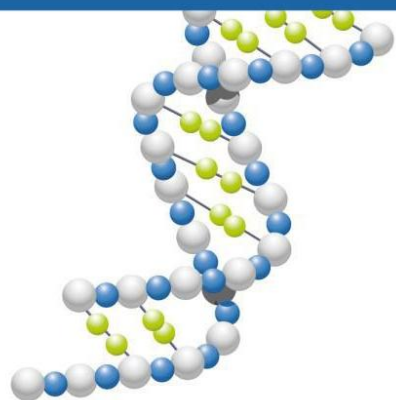
**库容：抗体库包含的克隆的数目**

**多样性：抗体库包含的克隆的类型的数目**

提高低丰度基因的方法：

- 复性动力学方法
  - 高丰度的基因往往在退火情况下复性快，低丰度的基因复性慢。
  - 可以通过复性时间的长短来控制丰度。
- 基因组杂交方法进行丰度一致
  - 相对cDNA文库而言，基因组文库的丰度一致性要好很多，可利用cDNA文库和基因组文库杂交之后，排除过多的高拷贝基因后，再建立新的文库。

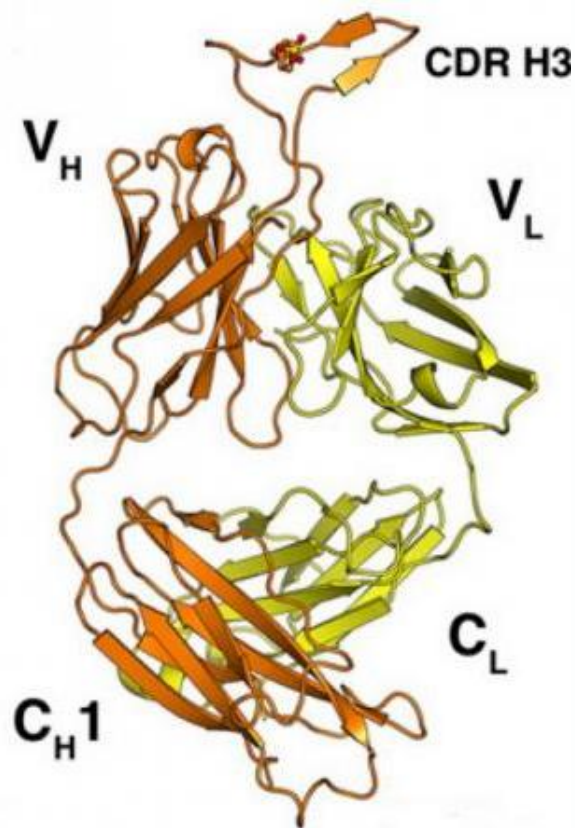




# DNA

王延峰 崔光照 著

## 编码序列的设计与优化



## 5.2 序列的完整性

### 序列的完整性

-----克隆所包含的基因信息是否可以通过宿主转化成为有功能的产物（抗体）。

- 完整性的检测方法：
- 序列测定：基因测序
- 亲和性测定：ELISA
- 特异性测定：WB





## 5.3 抗体库的覆盖度和变异度

### 抗体库的变异度：

- 抗体库中的抗体应该具有较高的变异度，包括V、D、J基因的变异，CDR序列的变异等等。变异度越高，抗体库的多样性越高。

### 抗体库的覆盖度：

- 抗体库的覆盖度指库中抗体对于特定抗原的识别和结合能力。覆盖度越高，抗体库的多样性越高。
- 可以与多种抗原结合，淘选出相应的抗体基因。





## 5.4 评价抗体库 的常用方法

### 5.41. 文库质量的判定方法

**插入片段长度：**足以表达完整可变区

**插入效率：**有插入片段的克隆在所有检测克隆中的比例

**覆盖倍数：**所有探针筛选到的阳性克隆的总数/使用的总探针的比值。

- 5.4.2. 多样性的评价方法
- 高通量测序可以直观的分析抗体库的变异度和丰度分布



# 抗体库质量的标准

抗体基因的多样性  
(diversity)

来源多，从更多的人身上提取  
B细胞建库

人工突变，人工增加多样性

抗体库的容量 (size)

反复转染

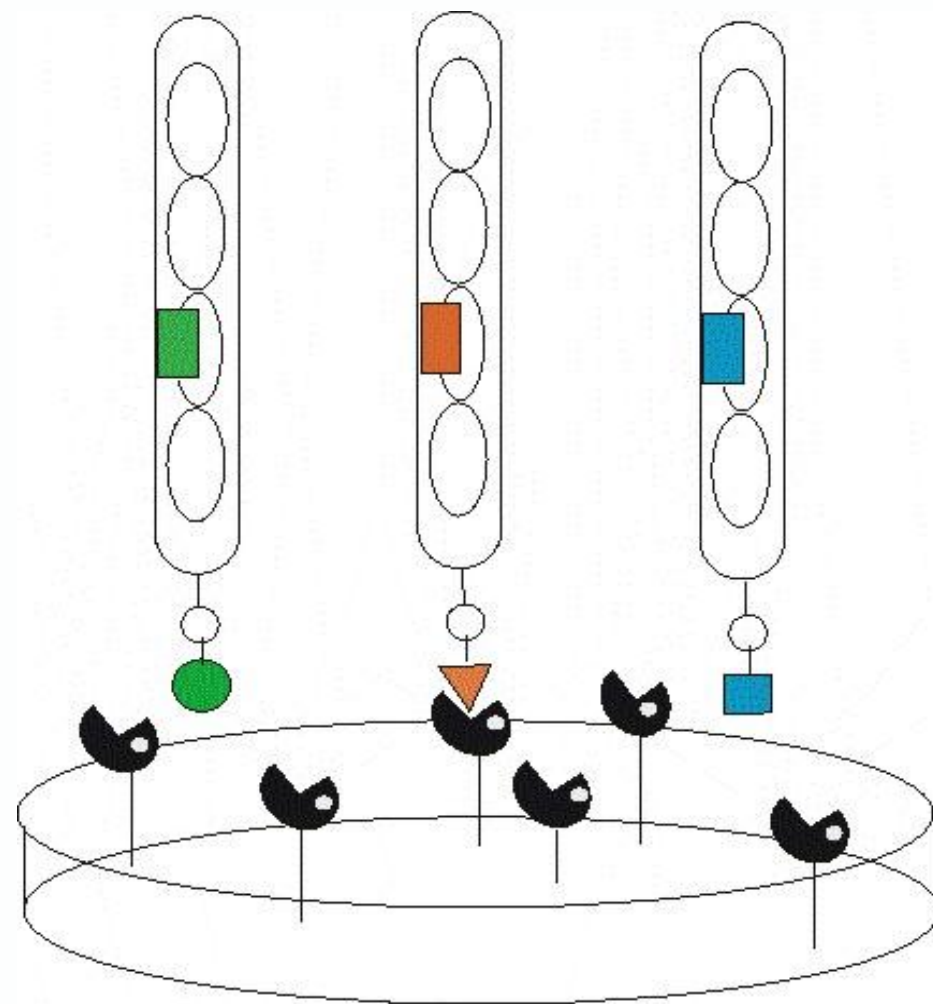
多个库反复杂交



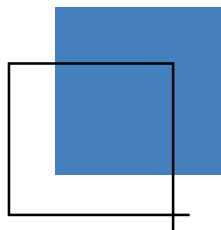
## 6. 抗体库的应用

### 淘 选

如何利用抗体库活得高亲和力抗体的基因？



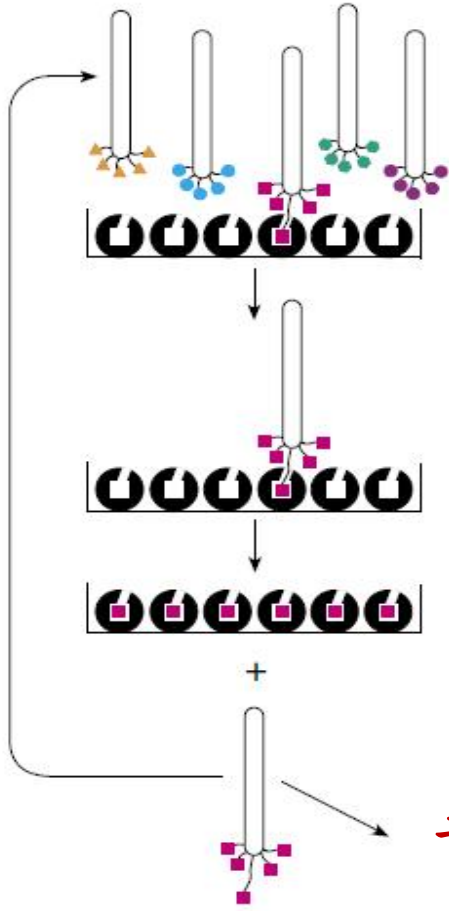
靶分子固定在塑料平皿的筛选模式  
(引自Smith, 1993)





# 生物淘洗程序示意图

每种不同的抗体都分别保存在不同的噬菌体体内  
可以通过克隆化的方式重新分离。



包被抗原并加入抗体库，特异性的噬菌体特异性吸附靶分子

洗去未结合的噬菌体

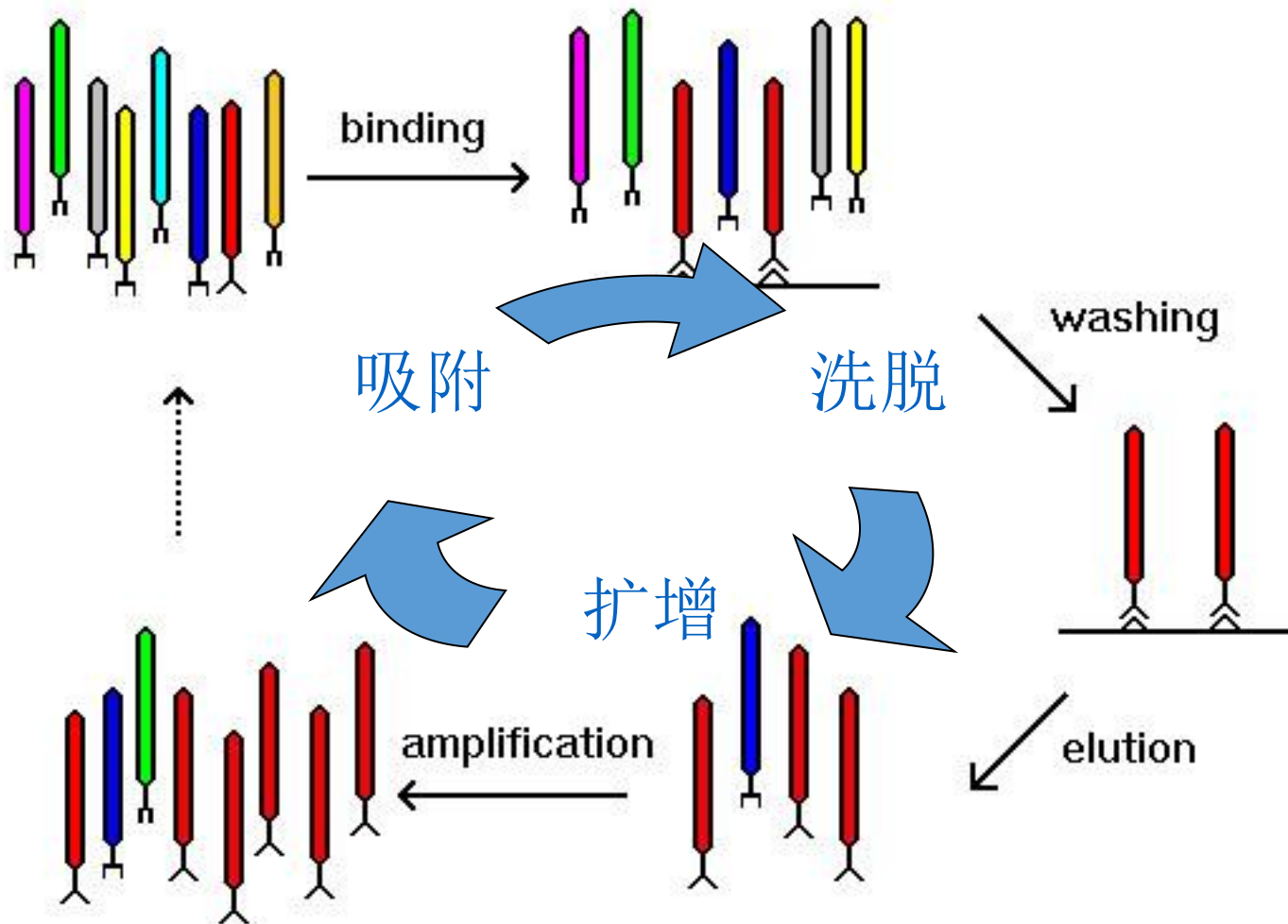
洗脱获得特异性结合的噬菌体

于大肠杆菌扩增后进行下一轮淘洗

能与抗原结合的抗体全部被留下  
可能针对不同的表位  
可能亲和力不同  
一次性获得多种不同类型的抗体

# 抗体库的富集

不能与抗原结合，  
或者特异性不高，  
亲和力较低的噬  
菌体比例不断下  
降



在大肠杆菌  
中扩增能与  
抗原结合的  
噬菌体

通过数次**竞争性结合**，数轮淘选可富集针对抗原的特异性抗体基因

## 非展示系统 (筛选)



## 展示系统 (淘选)



# 原理及特点

选择方法：不是是与非的选择，而是某种能力程度的评估

筛选 (Screening) 法院, guilty or not guilty

淘选 (Panning) 招聘, 符合标准的情况下优中选优

富集 (Enrichment): 噬菌体感染 E. coli 获得扩增

**选择能力和扩增能力相结合**



# 淘选的结果

01

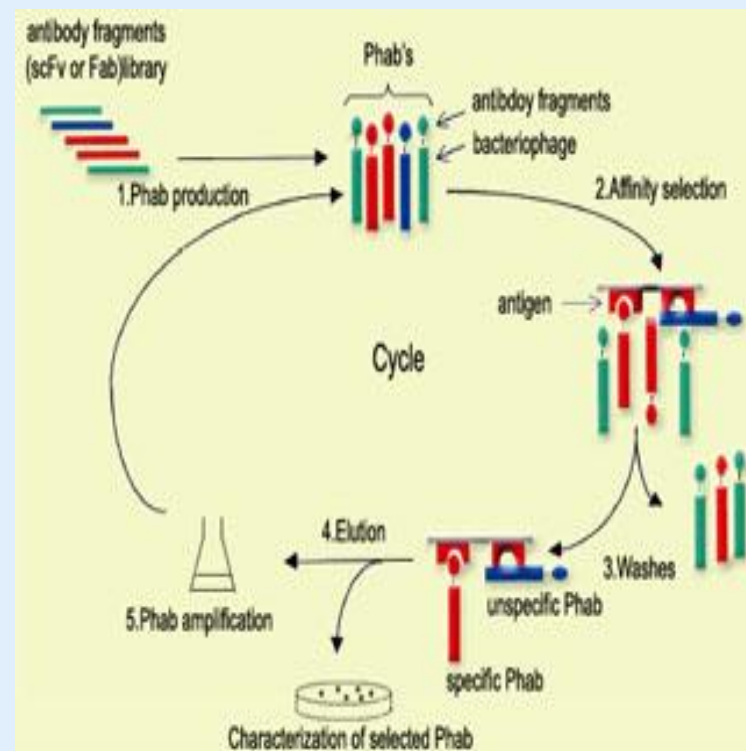
通过淘选，能够与抗原结合的噬菌体在噬菌体群体中不断富集。

02

不能与抗原结合的噬菌体数量不断减少。

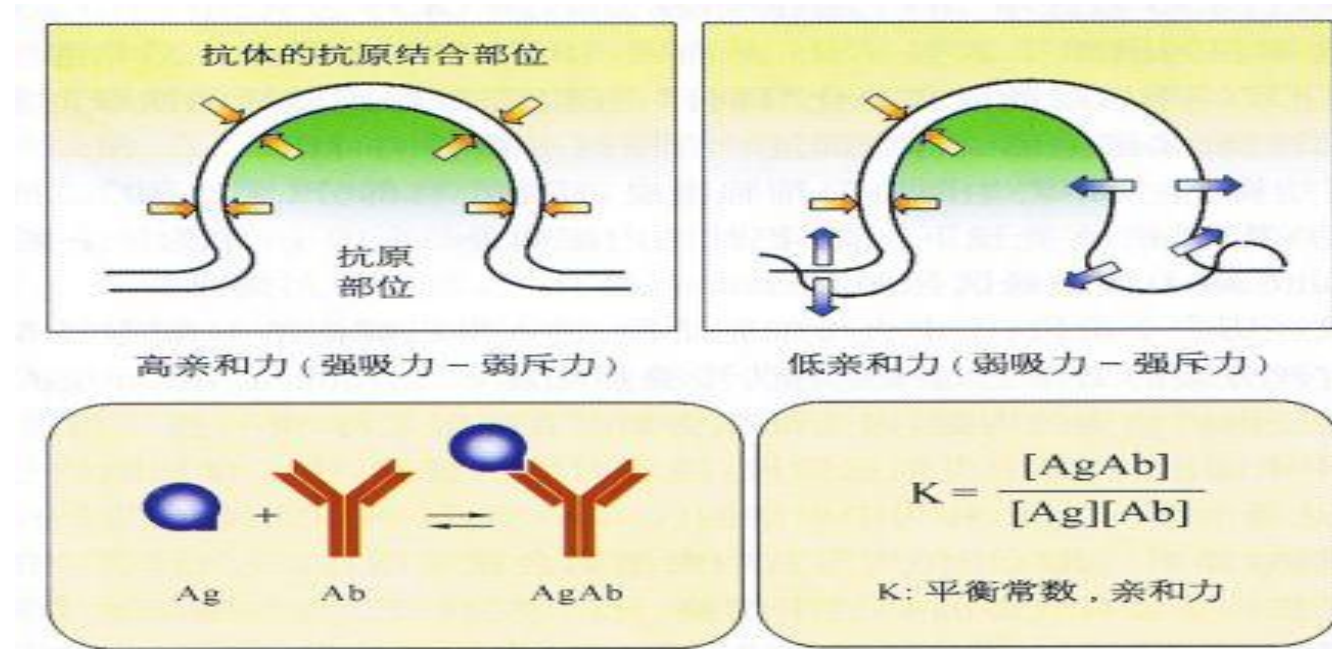
03

一批噬菌体被从抗体库中淘选出来并进行扩增。  
可用于下一步的基因改造和抗体配对。



# 四、抗体库的在亲和力成熟方面的应用

- 抗体的亲和力



抗原-抗体结合的亲和力及其测定原理

图上方表明亲和力高低由分子间吸力和斥力间的消长所决定；下方为定量评估亲和力的平衡常数计算原理



# 抗体库在亲和力成熟方面的应用

## 抗体的亲和力（affinity）：

指抗原与抗体结合的牢固程度。亲和力越大表示抗体的结合反应越快，抗原抗体复合物越不易解离。亲和力的大小是由分子的大小、抗体结合的位点、以及抗原决定簇之间的立体构型的适合程度决定的。

对于一已知天然抗体，其亲和力是无法提高或降低的。

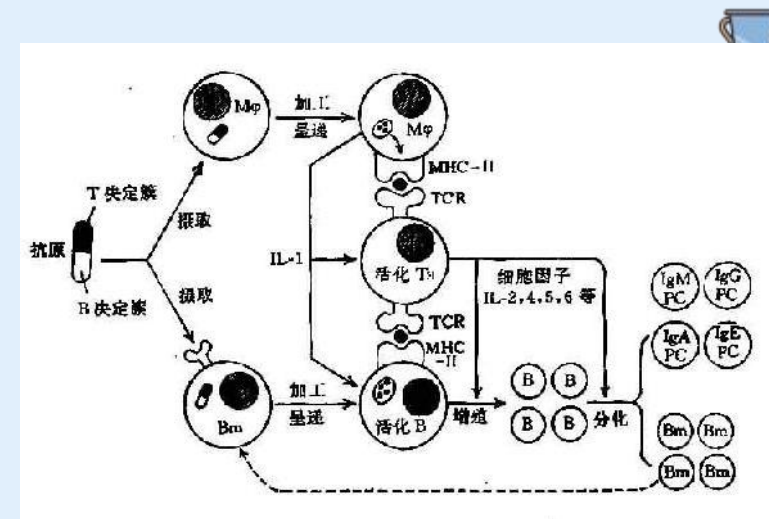




# 抗体亲和力的提高 ——亲和力成熟

抗体亲和力成熟 (antibody affinity maturation) 是指机体正常存在的一种免疫功能状态。

在体液免疫中, 再次应答所产生抗体的平均亲和力高于初次免疫应答。







# 体内免疫亲和力的成熟的方法

传统方法获得高亲和力抗体是比较盲目的

- 优化免疫条件和免疫程序
- 进行多次的融合筛选



高亲和力  
抗体获得  
方法：

- 获取高亲和力抗体不易
- 一旦亲和力形成难以提升



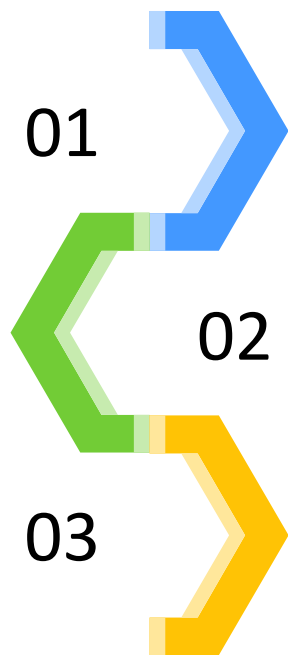
# 体外抗体亲和力成熟的基础

抗体库的库容

诱导突变，重组

重排，体细胞高频突变和链重组

只有突变后亲和力升高的克隆易于被抗原所选择并进一步增殖分化，而丧失活性和亲和力降低的克隆或发生凋亡或生长处于劣势。



抗体基因的多样性

体内巨大的B细胞克隆库为抗体的亲和力成熟打下了基础。

02

免疫记忆

免疫记忆模式能够使识别抗原的B细胞特异性增殖。

03

基于抗原的淘选



## 天然抗体库的缺点：

- 库容虽大，多样性不足。
- 未经抗原诱导，特异性不足
- 未经有效的突变和重排，亲和力不成熟

- 抗体库中大多数为低亲和力抗体
- 抗体的体外亲和力成熟，是必经之路。



# 基于抗体库的体外亲和力成熟的策略

根据天然抗体库的缺点，在体外通过人工诱导突变，抗原诱导特异性扩增，以及链重组的技术，来增加抗体库的亲和力



1

## 体外诱导突变

通过人工诱导的方式增加库容的同时增加抗体库的多样性

2

## 抗原诱导特异性 扩增

淘选富集模拟只有抗原结合克隆能够扩增

3

## 链重组

人工诱导抗体的轻重链重排，增加抗体亲和力



## 1. 随机突变

- 随机诱导突变则通过引进随机的碱基替换, 进而筛选理想的突变体。
- 通常, 采用错误倾向PCR (error-prone PCR) 可方便地引进突变。





# 1.1 错配 PCR

PCR错配：

- 利用PCRTaq酶没有3 ‘-5’ 纠错能力。
- 在扩增的过程中通过改变PCR扩增条件提高突变的概率。（改变核苷酸的浓度，调节buffer的浓度）
- 通过这种高错配的PCR，可以随机突变已有的抗体库，从而建立次级突变库。





## 1. 1. 错配PCR

01

值得注意的是，这种突变的引入是完全**随机**的。

02

可以对抗体库进行一定的扩容；

03

也可能是完全无义的突变，因此是一种完全盲目的突变模式。

**无效、错误、失活**





## 1. 2. 利用致突变性大肠杆菌在菌内进行突变

- mutD5大肠杆菌株，由于其**基因缺陷**，具有极高的突变概率。在DNA复制的过程中错配纠正能力缺陷。
- 与随机错配PCR相似。
- **该菌株没有3' -5' 纠错能力；**
- 因此，以此菌株作为宿主，可以使基因库的突变概率提高1000倍
- 依旧是一种随机盲目的突变。





## 2. CDR区重组

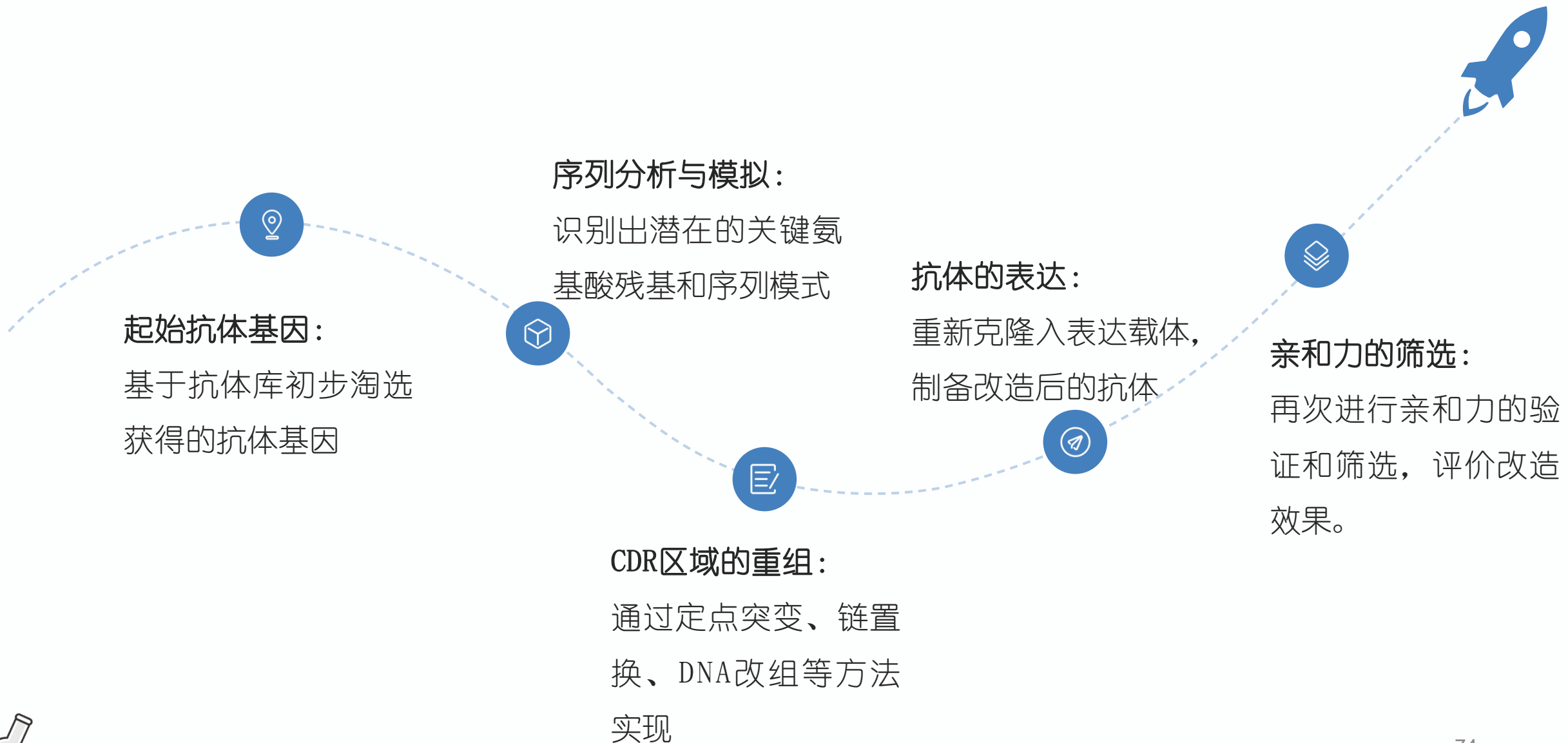
抗体的亲和力由CDR区所决定，人们充分利用抗体的结构特点，提出只对抗体的CDR区进行重点突变的策略对抗体的亲和力进行改造，收到了良好的效果。

用人工合成寡核苷酸的方法，半定向的实施突变：

- ①定点突变：在选定的位置上随机突变，突变时候产生的四个核苷酸几率相当。
- ②DNA改组：将同源的抗体基因进行切割和随机组合。
- ③链置换：替换抗体的重链或轻链



## CDR区重组的流程：





### 3. 链改组 (chain shuffling)

- 链改组又称链替换技术。

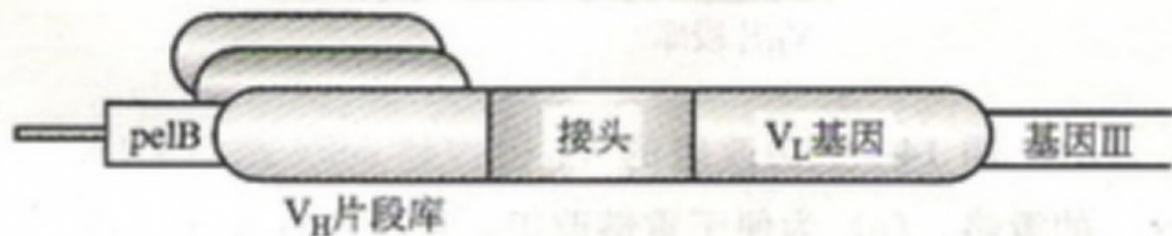
这是一种非常简便的抗体体外亲和力和成熟技术。依据抗体可变区**轻重链随机配对**的原理，将抗体的一条链保持不变，替换另一条链，筛选高亲和力的抗体分子。





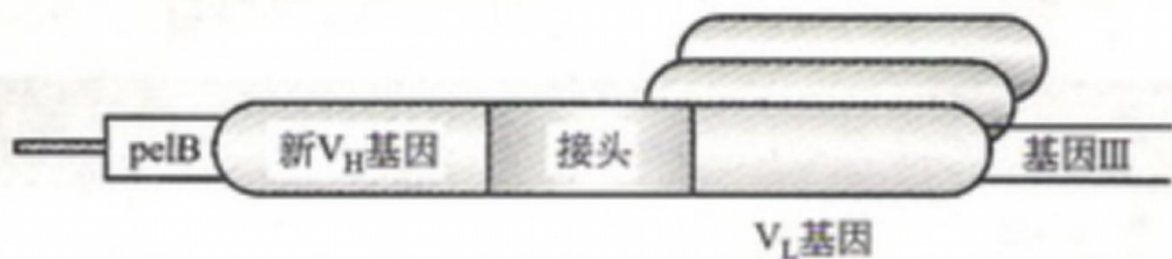
# 构建用于亲和力成熟的链改组文库

1. 通过PCR反应将 $V_H$ 基因片段克隆到噬菌粒载体中,使之与有结合能力的scFv  $V_L$ 片段相连



2. 将改进后的scFv经过噬菌体库筛选,并通过表面等离子共振技术鉴定最优克隆

3. 最高亲和性克隆的重排 $V_H$ 基因被克隆到 $V_L$ 基因库中



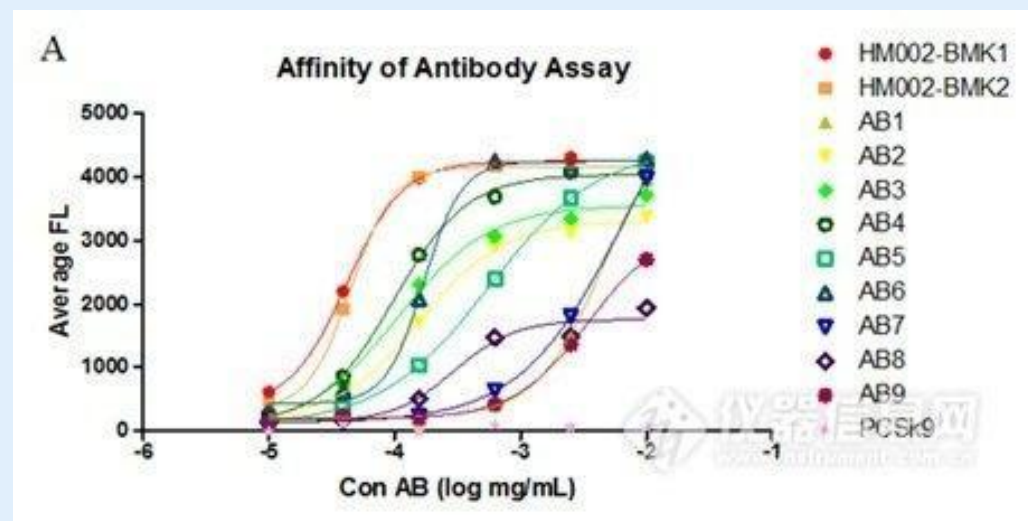
4. 将改进后的scFv经过噬菌体库筛选,并通过表面等离子共振技术鉴定最优克隆

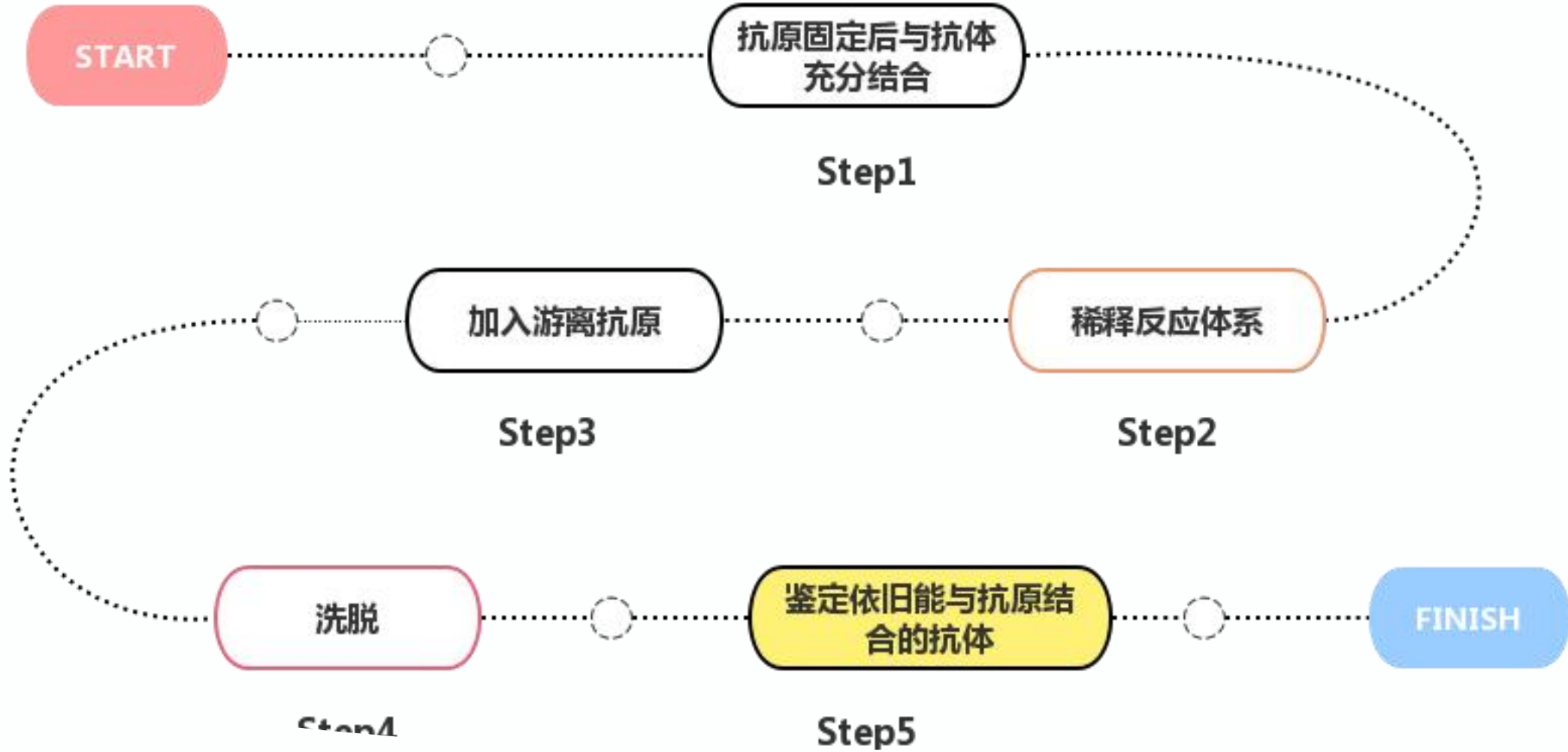
举例, 以亲本抗体的轻链为基础, 与重链文库相结合, 筛选出高亲和力的组合;

再以重链为基础, 筛选出亲和力高的轻链组合。

## 5. 基于抗体库的高亲和力克隆的选择

利用抗原-抗体结合的动力学规律，用改变抗原浓度或改变洗脱条件来将不同亲和力的克隆分离开来。



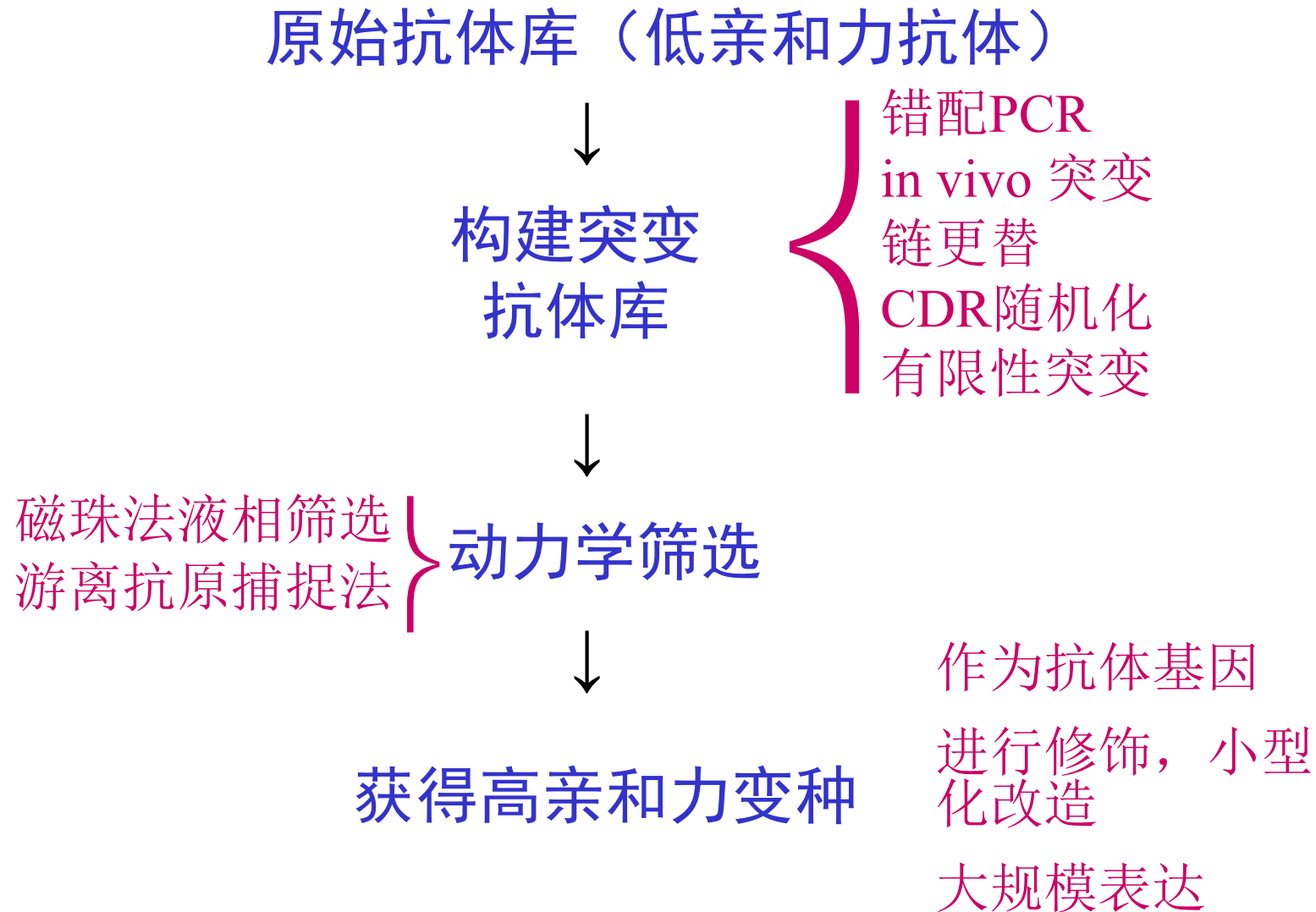


利用抗原抗体的解离速度来区分不同亲和力的抗体。

高亲和力洗脱缓慢，  
低亲和力洗脱迅速



# 亲和力成熟的技术总结



# 五、抗体库技术在鼠抗体人源化改造中的应用

---







## 链改组的技术基础：

### 抗原表位定向选择

以高特异性鼠单抗可变区为模板，利用噬菌体展示技术，通过抗原导向，筛选能够模拟鼠单抗可变区，结合相同抗原决定簇的人抗体，称为抗原表位定向选择 (epitope guided selection, EGS)。



## 4. 基于链改组 (chain shuffling) 的人源化改造



# 抗原导向的人源化抗体的亲和力成熟

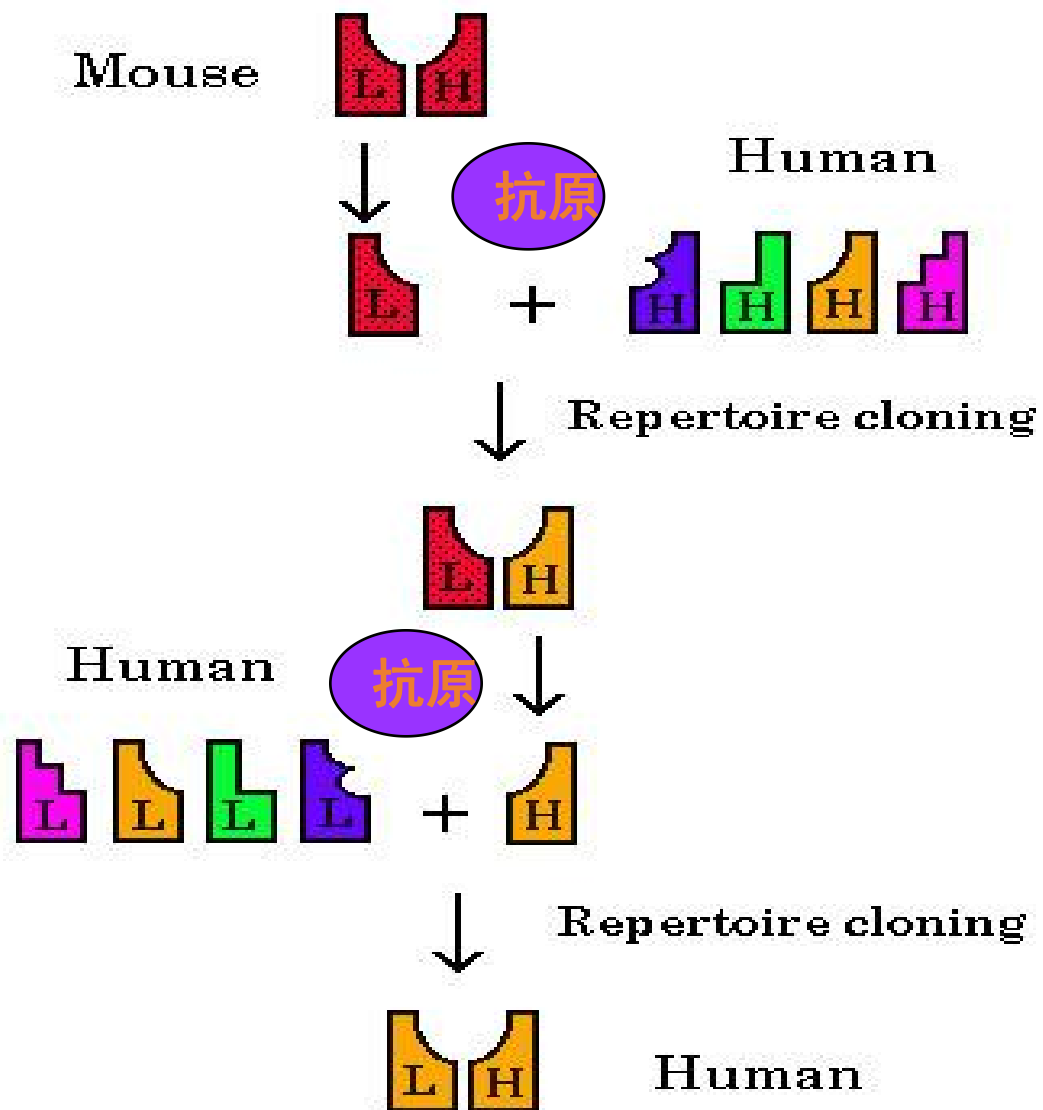
保留鼠源性单抗的轻/重链，用特定抗原体外筛选它与人抗体轻/重链，组成**杂合抗体库**，从中找到维持抗体结构的人源配对轻/重链。

---

以选出的轻/重链为基础，同样进行人源抗体库的筛选，再筛选出具有同样效能的人源性轻/重链，替换鼠源性轻/重链。



# 抗原表位导向选择



- 优点：可以获得完全的人源抗体
- 缺点：成功率不高，所或抗体性能也难以保证

## 六、抗体库技术的特点

---



# 抗体库的特点

直接生产人源性  
抗体

## 1. 模拟天然抗体基因的存在方式

避免HAMA

避免细胞融合

操作简便

库容巨大

不必担心低免疫  
原性的抗原不能  
诱发免疫反应

基于人的B细胞，通用兼并引物以及VH、VL、各个CDR片段的随即随机组合可以大大地增加抗体组合的多样性。大大的增加了抗体库的库容

# 抗体库的特点

能够模拟抗体亲和力和成熟的过程

1

巨大的库容为亲和力成熟奠定基础

抗体库本身的多样组合方式，可以模拟亲和力成熟的过程。

2

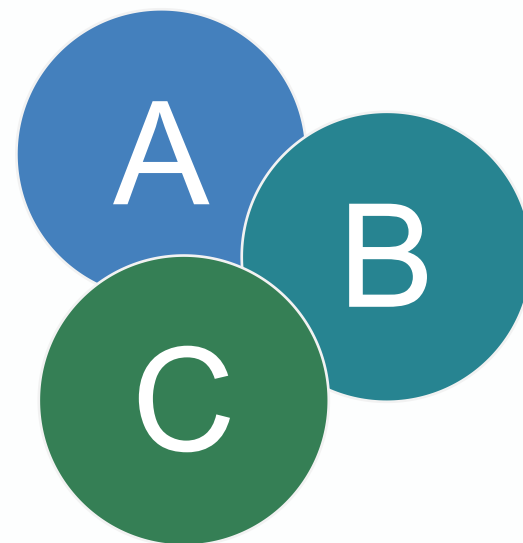
人工诱变改进亲和力

在抗体库基础上可以采用PCR错配以及随机致突变技术改变抗体的亲和力。

3

淘选机制可以进一步优化抗体的亲和力。

淘选可以模拟抗原诱导特异性扩增



# 抗体库的特点

4

抗体库筛选出来的工程菌比杂交瘤稳定，易于保存。  
简单微生物（噬菌体，大肠杆菌）是更好的基因储存载体

5

## 时间成本低

DNA 操作是在细菌中增殖，比杂交瘤技术简单快速，制备单抗从取脾细胞到稳定的克隆株至少需要数月，而噬菌体抗体库技术最短只需几周的时间。

6

## 可以制备不同类型的抗体（Fab，Scfv 等等）。

细胞工程抗体只能是完整抗体的形式，抗体库多为小分子抗体，既可是单链抗体也可以是双链抗体

7

## 可以充分利用原核表达系统

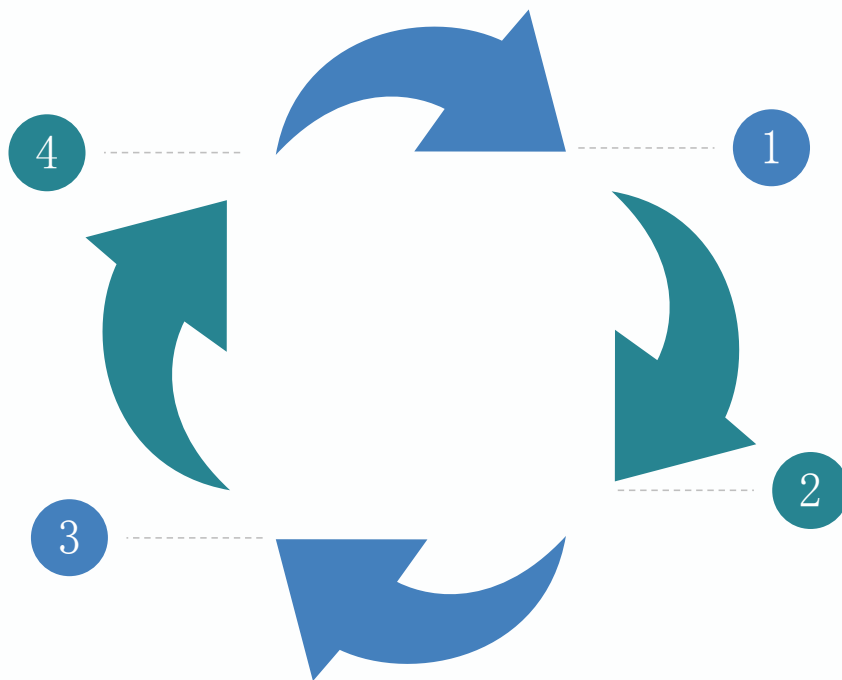


## 6. 抗体库技术的应用

### 功能研究

- 抗感染
- 抗肿瘤

抗体性能的改良（特异性、表达量、亲和力，etc.）



制备人源抗体

制备各级功能抗体片段







## 7. 抗体库技术较细胞融合杂交瘤技术制备单抗有着明显的优越性：

01

抗体库技术省去了细胞融合的步骤，**省时省力**，避免了因杂交瘤不稳定而需要反复亚克隆的繁琐程序。

02

**扩大了筛选容量**，用杂交瘤技术一般筛选能力在上千个克隆以内，而抗体库可筛选 $10^6$ 以上个克隆。

03

抗体库技术直接得到抗体的基因，既无杂交瘤丢失之虞，又便于进一步构建各种基因工程抗体。**（稳定）**

04

抗体库技术得到的抗体可以在大肠杆菌表达，可利用原核表达系统的优势。**（表达效价比高）**

05

一些难于制备的抗体，如针对弱免疫原、毒性抗原的抗体，以及人源抗体的制备可以得到解决**（不受免疫原性限制）**。



## 7. 抗体库技术较细胞融合杂交瘤技术制备单抗有着明显的优越性：

|      | 杂交瘤细胞技术     | 噬菌体抗体文库技术        |
|------|-------------|------------------|
| 宿主细胞 | 哺乳动物细胞      | 细菌               |
| 筛选范围 | $\sim 10^3$ | $10^7 \sim 10^9$ |
| 时间   | 几个月~半年      | 数周               |
| 操作   | 繁杂          | 相对简单             |
| 免疫   | 必须          | 可避免              |
| 人源   | -           | +                |
| 费用   | 昂贵          | 相对低廉             |
| 生产量  | 有限          | 无限               |
| 基因获取 | 再克隆         | 直接获取             |
| 应用前景 | 有限          | 不可估              |

•谢谢!