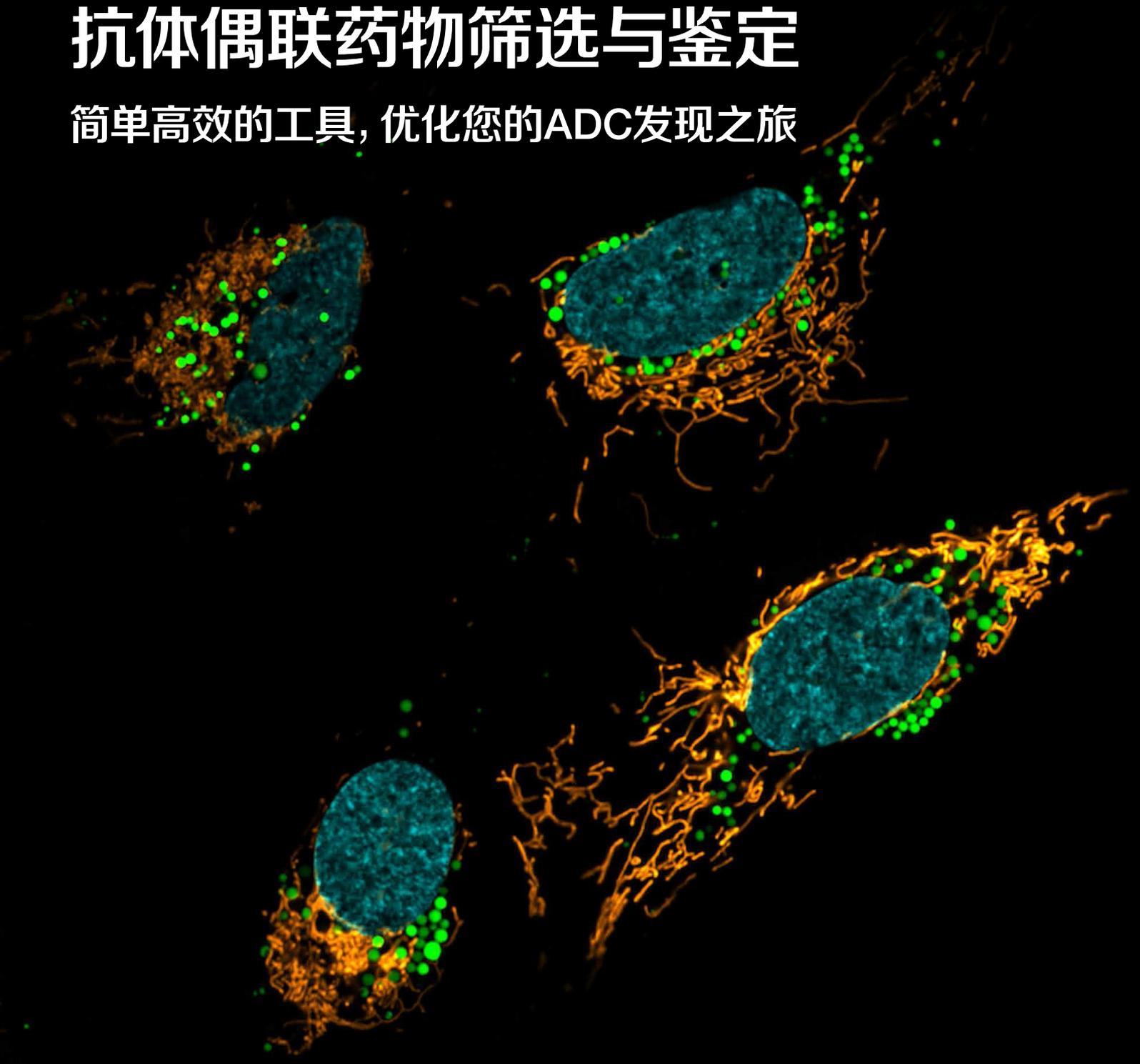


细胞分析

抗体偶联药物筛选与鉴定

简单高效的工具, 优化您的ADC发现之旅



引文: 为什么研究抗体偶联药物 (ADCs)?

抗体偶联药物 (ADCs) 通过将单克隆抗体的特异性与细胞毒性药物的效力相结合, 正在改变癌症和其他复杂疾病的治疗格局。这些靶向疗法能够选择性地药物递送至靶细胞, 同时最大限度地减少脱靶效应。

现代 ADC 的开发依赖于识别可有效抵达溶酶体的内化抗体, 在溶酶体中, 可裂解的连接子会释放细胞毒性有效载荷。诸如靶向蛋白降解剂 (包括 LYTAC 和 MabTAC) 等新兴药物利用类似的运输机制转运胞外蛋白进行溶酶体降解。在这两种情况下, 准确且动态地监视胞内运输对于优化治疗设计至关重要。

本手册概述了从候选抗体库到单一且特征明确的 ADC 的开发过程中所需的工具和技术。它涵盖了整个过程中的每个关键步骤——从结合分析开始, 到内化表征、溶酶体降解评估, 以及通过使用 Invitrogen™ SiteClick™ 试剂进行位点特异性偶联来优化抗体标记。这些工具共同支持了用于治疗应用的一致、有效和高质量的 ADC 的开发。

随着 ADC 及其相关药物的不断发展, 对用于评估内化和胞内途径的灵敏且可放大的方法的需求也日益增长。本手册中介绍的解决方案使研究人员能够准确且快速地筛选、验证和改进下一代疗法。



图 1. ADC 工作流程的关键阶段。从抗体库 (左图) 开始, 研究人员可以使用 Invitrogen™ Zenon™ Alexa Fluor™ Plus 或 Zenon™ pHrodo™ 试剂等工具快速识别可结合或内化的候选抗体。有潜力的候选抗体可以使用 Invitrogen™ pHrodo™ 胺基反应试剂或我们创新的 Invitrogen™ LysoLight™ 试剂进行溶酶体降解研究、做进一步筛选。最后, 使用 SiteClick 试剂进行位点特异性偶联, 可以生成单一且表征优异的 ADC 进行临床前评估。该简化的流程支持高效的候选抗体选择和优化, 从而获得治疗成功。

抗体结合筛选工具

为什么从抗体结合筛选开始？

ADC 开发的初始步骤之一是筛选抗体结合，以确保抗体能够特异性识别并结合细胞表面的靶抗原。这一点至关重要，因为 ADC 的有效性取决于其选择性结合癌症细胞的同时不伤害健康细胞的能力。从抗体结合开始有助于识别对靶抗原具有高特异性和亲和力的候选药物，为后续的内化和降解步骤奠定基础。

用于抗体结合快速筛选的 Zenon Alexa Fluor Plus 试剂

Invitrogen™ Zenon™ Alexa Fluor™ Plus 标记试剂是与荧光染料结合的 Fab 片段，可快速高效地筛选抗体结合。这些试剂旨在特异性地结合抗体的 Fc 区域，提供强大的信号，可使用常规成像、高内涵筛选或流式细胞术平台轻松检测。Zenon Alexa Fluor Plus IgG 标记试剂将快速且高通量的 Zenon 技术与卓越的 Alexa Fluor Plus 染料相结合，提供更高的灵敏度和一致性，使其成为筛选大量候选抗体库的理想选择。

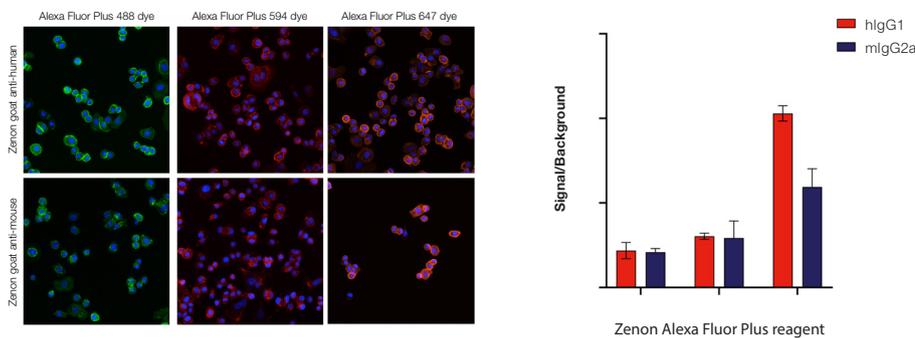


图 2. Zenon Alexa Fluor Plus 试剂能够灵敏地指示抗体结合，无论染料颜色或抗体物种。Her-2 阳性 SKBR3 细胞用 Zenon Alexa Fluor Plus 标记试剂标记的曲妥珠单抗在 37°C 和 5% CO₂ 下处理 30 分钟。用 1x PBS 清洗细胞 3 次，然后使用 Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 Pro 高内涵成像平台进行成像。阴性对照：将细胞与不含曲妥珠单抗的 Zenon 试剂一起孵育。

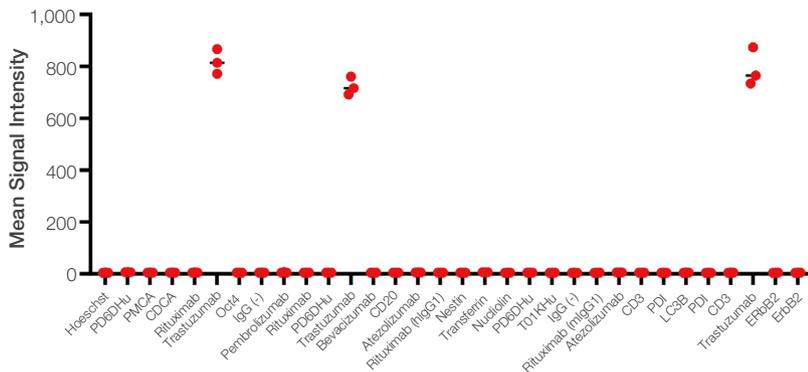


图 3. Zenon Alexa Fluor 标记试剂尤其适合高通量筛选工作流程，用于鉴定对靶细胞具有高亲和力的抗体。32 个人源化或全人源抗体（3 复孔），用 Zenon Alexa Fluor Plus 647 IgG 标记试剂标记 5 分钟，然后加入 SKBR3 细胞中。孵育 30 分钟后，用 Invitrogen™ Hoechst 33342 Ready Flow™ 试剂对细胞进行共染色，并使用 CellInsight CX7 LZR Pro HCS 平台进行成像。明亮的信号代表了对 HER2 有高亲和力最强的克隆。

Zenon Alexa Fluor Plus 试剂

激发/发射	产品	标记规格	货号
小鼠 IgG			
494/519	Zenon Alexa Fluor Plus 488 小鼠 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25619
590/617	Zenon Alexa Fluor Plus 594 小鼠 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25620
650/671	Zenon Alexa Fluor Plus 647 小鼠 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25621
人 IgG			
494/519	Zenon Alexa Fluor Plus 488 人 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25615
590/617	Zenon Alexa Fluor Plus 594 人 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25616
650/671	Zenon Alexa Fluor Plus 647 人 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25617

ADC内化检测工具

为什么检测 ADC 内化？

一旦确定了抗体的结合特异性，下一个关键步骤就是筛选 ADC 的内化。ADC 通过内化到靶细胞中、细胞毒性药物在靶细胞中释放出来发挥治疗作用。筛选内化可确保抗体能够有效进入靶细胞，这对于细胞毒性药物的递送至关重要。此步骤有助于识别既能与靶抗原结合还能被有效内吞作用的候选 ADC。

快速检测 ADC 内化的 Zenon pHrodo 试剂

Zenon pHrodo 试剂将快速可放大的 Zenon 技术与 pH 敏感的 pHrodo 染料技术相结合，使研究人员能够大规模、高特异性地研究内吞作用。pHrodo 染料仅在吞入胞内体或溶酶体的酸性环境时发出荧光，而在胞外环境的中性 pH 下保持不发荧光。pHrodo 染料有红色、绿色和深红色可供选择——深红色的 pKA 低于红色和绿色染料，这意味着它直到内吞途径的后期才会发出荧光。这种延迟荧光可以监测内吞途径的不同阶段，从而为了解内吞过程提供宝贵的见解。Zenon pHrodo 标记抗体可用于多种应用，包括活细胞成像和流式细胞术。

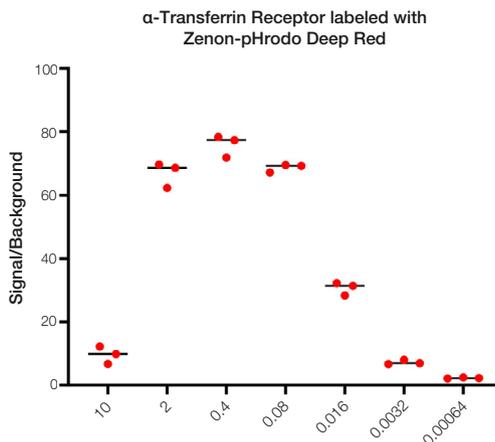
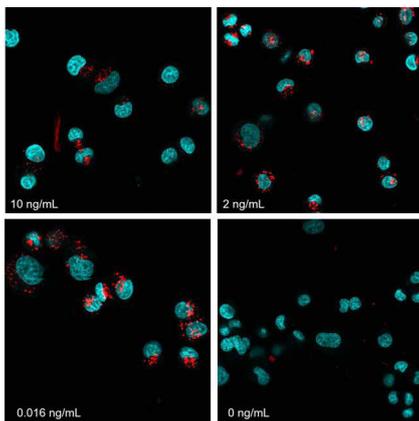


图 4. Zenon pHrodo Deep Red IgG 标记试剂灵敏度高，可在较宽的抗体浓度范围内进行阳性内化抗体筛选。将抗转铁蛋白受体进行五倍梯度稀释，浓度范围从 10 ng/mL 至 0.64 pg/mL，同时保持 Zenon pHrodo Deep Red 小鼠 IgG 标记试剂的最终测定浓度恒定在 200 nM。标记 5 分钟后，用标记抗体处理 SKBR3 细胞。在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下内化 16 小时后，使用 CellInsight CX7 LZR Pro HCS 系统对细胞进行成像和定量分析。

Zenon pHrodo 标记试剂

激发/发射	产品	标记规格	货号
小鼠 IgG			
505/530	Zenon pHrodo Green 小鼠 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25609
		20 x 96 孔板	Z25625
560/585	Zenon pHrodo Red 小鼠 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25610
		20 x 96 孔板	Z25626
640/655	Zenon pHrodo Deep Red 小鼠 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25622
		20 x 96 孔板	Z25624
人 IgG			
505/530	Zenon pHrodo Green 人 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25611
		20 x 96 孔板	Z25613
560/585	Zenon pHrodo Red 人 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25612
		20 x 96 孔板	Z25614
640/655	Zenon pHrodo Deep Red 人 IgG 标记试剂	4 x 96 孔板	Z25618
		20 x 96 孔板	Z25623

精确检测 ADC 内化的胺反应性 pHrodo 标记试剂

在筛选出更小的候选抗体库后，可以通过与胺反应的 pHrodo 试剂进行共价标记，更精确地表征内化过程。这些 pH 敏感染料能够在活细胞模型中可靠地追踪抗体的摄取、动力学和细胞内定位。pHrodo 抗体标记试剂盒简化了偶联过程，提供更易溶解的染料和即用型离心柱，从而获得高效且可重复的结果。

与 pHrodo Zenon 试剂类似，pHrodo 胺反应染料绿色和红色两种形式，可在早期内体中发出荧光，而深红色染料仅在酸性更强的晚期内体或溶酶体环境中激活。不同染料作用的 pH 区间差异可用于区分不同的运输阶段，深红色染料在低 pH 值细胞器中背景荧光更低、信号特异性更高。

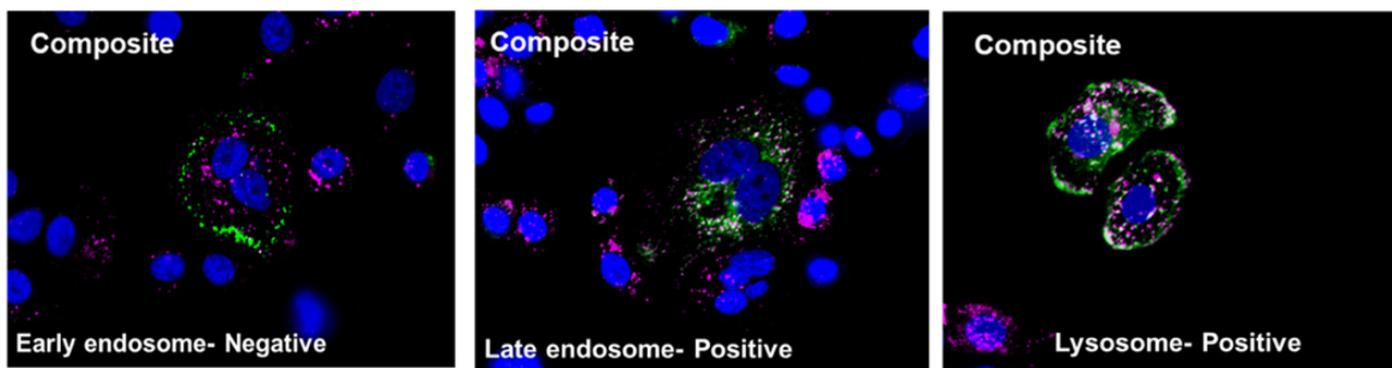


图 5. pHrodo Deep Red 在晚期内体和溶酶体中 (pH 值 5.5-6.0) 发出荧光, 可区分不同的内化和运输阶段。用 pHrodo Deep Red (货号: P35355) 标记的赫赛汀处理 SKBR3 细胞, 随后成像: 晚期内体和溶酶体中有荧光, 但在早期内体中无荧光。此实验证实了 pHrodo Deep Red 仅在酸性条件下活化。

pHrodo 反应性染料和试剂盒

激发/发射	产品	标记规格	货号
505/530	pHrodo Green 胺反应性染料	3 x 100 µg	P36013
		1 mg	P36012
	pHrodo Green 抗体标记试剂盒	3 x 20 µg	P36015
		3 x 100 µg	P36022
		3 x 1 mg	P36023
560/585	pHrodo Red 胺反应性染料	3 x 100 µg	P36011
		1 mg	P36010
	pHrodo Red 抗体标记试剂盒	3 x 20 µg	P36014
		3 x 100 µg	P36020
		3 x 1 mg	P36021
640/655	pHrodo Deep Red 胺反应性染料	3 x 100 µg	P35358
		1 mg	P35359
	pHrodo Deep Red 抗体标记试剂盒	3 x 100 µg	P35355
		3 x 1 mg	P35356

监测ADC溶酶体降解的工具

为什么要监测溶酶体降解？

确保抗体与靶抗原结合并有效内化后，下一步是监测溶酶体降解。这一点至关重要，因为 ADC 的治疗效果取决于溶酶体内细胞毒性药物的释放。监测溶酶体降解可确认内化的 ADC 被运送到溶酶体，药物在那里被释放以发挥治疗作用。此步骤有助于识别内吞后到达溶酶体释放药物的抗体。

使用 LysoLight 试剂高特异性验证溶酶体降解

Invitrogen™ LysoLight™ 抗体标记试剂盒和活性染料是监测溶酶体内 ADC 分解代谢的有力工具。与 pH 依赖的 pHrodo 技术不同，LysoLight 偶联抗体或蛋白质即使在晚期内体中也不会发出荧光，只有在被溶酶体蛋白酶裂解时才会发出荧光。这种机制提供了卓越的灵敏度和特异性，用以精准检测蛋白质或 ADC 的内化和运输。使用 LysoLight 技术，研究人员还可以评估靶向蛋白质降解候选分子对分解代谢或循环途径的倾向。这可以帮助靶向蛋白质降解领域的研究人员微调他们的候选物以获得最大的治疗潜力。LysoLight 试剂盒和试剂与多种平台兼容，例如流式细胞术、高内涵成像和活细胞分析系统。

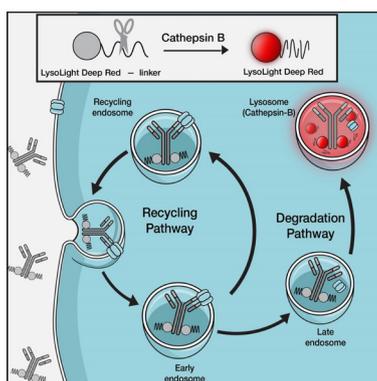


图 6. LysoLight 染料是用于直接监测目标蛋白溶酶体降解的高效工具。在未裂解形式下，LysoLight Deep Red 或 LysoLight Green 没有背景荧光。只有被溶酶体内的蛋白酶 B 裂解后，染料才会变成荧光，从而分别导致 Cy5 或 GFP/FITC 通道中出现明亮的荧光。

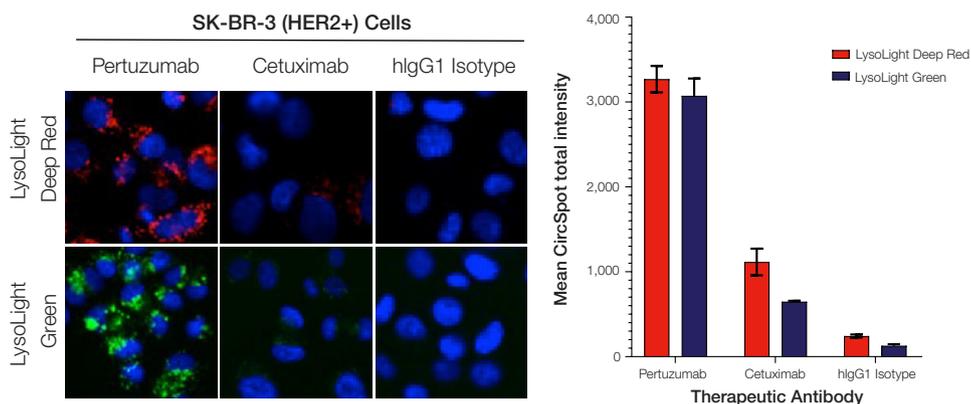


图 7. LysoLight 分解代谢产生明亮的溶酶体特异性信号。SKBR3 细胞用 1 µg/1 mL 曲妥珠单抗、西妥昔单抗或用 LysoLight Green 或 Deep Red 标记的 hlgG1 同位素对照在含 10% FBS 的 McCoy 完全培养基中处理 16 小时。使用 CellInsight CX7 LZR Pro HCS 平台对细胞进行成像和定量分析，计算平均周斑强度。

LysoLight 染料和试剂盒

激发/发射	产品	标记规格	货号
488/525 nm	LysoLight Green 胺反应性染料	3 x 100 µg 染料	L36007
	LysoLight Green 抗体标记试剂盒	500 µg 染料	L36008
650/668 nm	LysoLight Green 抗体标记试剂盒	可标记 3 x 100 µg IgG	L36005
		可标记 3 x 1 mg IgG	L36006
	LysoLight Deep Red 胺反应性染料	3 x 100 µg 染料	L36003
		500 µg 染料	L36004
LysoLight Deep Red 抗体标记试剂盒	可标记 3 x 100 µg IgG	L36001	
	可标记 3 x 1 mg IgG	L36002	

使用位点特异性标记优化您的 ADC

为什么要使用位点特异性标记进行优化？

确认结合、内化和溶酶体降解后，最后一步是优化抗体标记过程，以确保一致且可重复的结果。优化涉及微调标记条件以达到所需的 DOL (Degree of Labeling)，同时保留抗原结合位点并维持抗体功能。此步骤对于生产高质量 ADC 至关重要。

用于可重复、位点特异性标记的 SiteClick 试剂

Invitrogen™ SiteClick™ 抗体标记技术可实现荧光染料或毒素的位点特异性结合，确保抗体 Fc 部分的标记一致。Invitrogen SiteClick 抗体叠氮修饰试剂盒使用酶通过叠氮部分特异性修饰抗体的碳水化合物结构域。通过无铜点击化学，多种 sDIBO 或 DBCO 炔烃标记物可在孵育步骤进行结合。例如，将 pHrodo Red sDIBO 通过点击化学反应加到叠氮修饰的曲妥珠单抗上，以评估 SKBR3 球状体中的内化情况（图 9）。

SiteClick assay mechanism

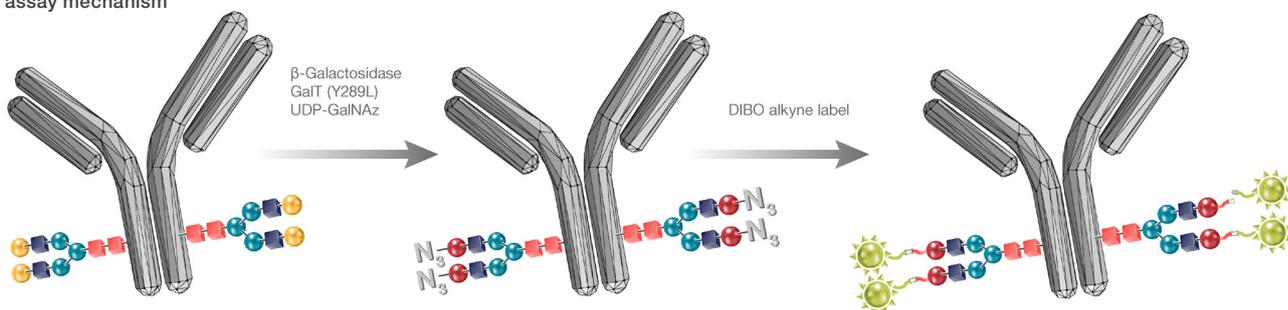


图 8. SiteClick 修饰试剂盒采用位点特异性法，利用 β -半乳糖苷酶和 β -1,4-半乳糖基转移酶修饰碳水化合物结构域，然后将叠氮化物修饰的糖附着在 IgG 抗体的重链上。由于修饰只发生在重链的 Fc 部分，因此标记的位置和 DOL 非常一致，抗原结合结构域保持不变。

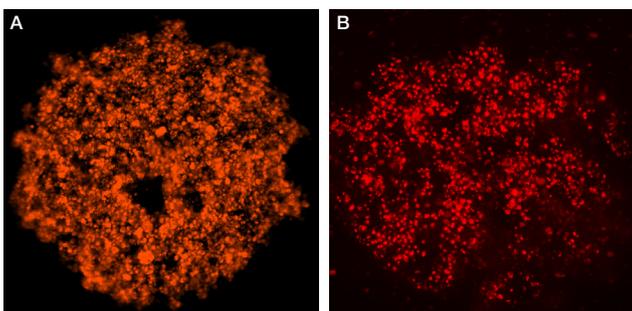


图 9. SiteClick 标记不影响抗原结合，从而在 3D 模型中准确评估内化情况。两个球状体用 pHrodo red 偶联的抗 HER2 抗体曲妥珠单抗标记。(A) 所有细胞均表达 Her-2，因此所有细胞都内化了抗体，显示亮红色信号。(B) 由 SKBR3 和 MDA-231 细胞混合制成的球状体显示，只有一半细胞表达 Her-2，荧光信号减弱。将细胞孵育 24 小时，并在 Invitrogen™ EVOS™ M7000 成像系统上进行成像。

SiteClick 试剂盒和试剂

激发/发射	产品	标记规格	货号
N/A (不含 sDIBO 标签)	SiteClick 抗体叠氮基修饰试剂盒	250 μ g	S20026
		1 mg	S10900
		5 mg	S10901
560/585	SiteClick pHrodo Red sDIBO 炔烃	250 μ g	C20034
		1 mg	S10903
		5 mg	S10908
640/655	SiteClick pHrodo Deep Red sDIBO 炔烃	250 μ g	S10914
		1 mg	S10915

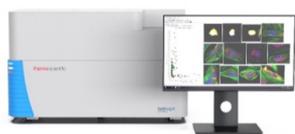
赛默飞仪器平台：可视化和量化内化的多功能工具

了解治疗性抗体的内化机制是推进抗体偶联药物研发的关键。赛默飞世尔科技提供一系列平台来支持这一目标，从动态活细胞成像到高通量定量分析。

Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR Pro HCS 平台或 Invitrogen™ EVOS™ M7000 成像系统，搭配 Invitrogen™ EVOS™ 活细胞成像模块，可为活细胞实验维持合适条件，并支持使用 pHrodo 染料和 LysoLight 探针等工具实时可视化抗体的内化和运输过程。对于更高通量的需求，Thermo Scientific™

Varioskan™ LUX 多功能酶标仪可跨时间点和条件进行快速、基于孔板的定量分析。Invitrogen™ Attune™ 流式细胞仪系列采用声学聚焦技术，各种型号以满足多样化需求，加速药物研发进程——从可靠的 Invitrogen™ Attune™ NxT 流式细胞仪，到支持 AI 分析的成像型 Invitrogen™ CytPix™ 流式细胞仪，再到灵活、高参数、具备光谱和常规分析功能的 Invitrogen™ Attune™ Xenith™ 流式细胞仪。

这些平台共同支持定性和定量分析，从而支持 ADC 开发工作流程的每个阶段。



CellInsight™ CX7 LZR Pro
高内涵筛选平台



EVOS™
细胞成像系统

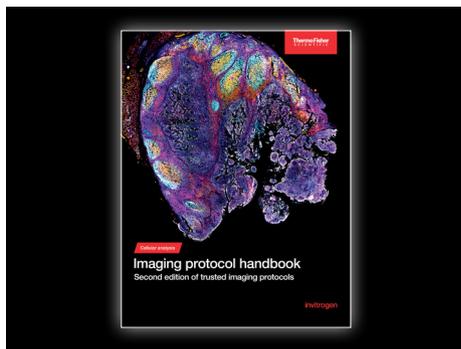


VarioSkan™
多功能酶标仪

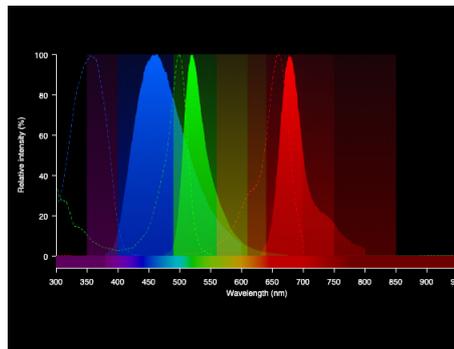


Attune™
系列流式细胞仪

其他资源



细胞成像实验方案手册



SpectraViewer 荧光光谱查看器



了解更多 thermofisher.cn/adcdiscovery



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC