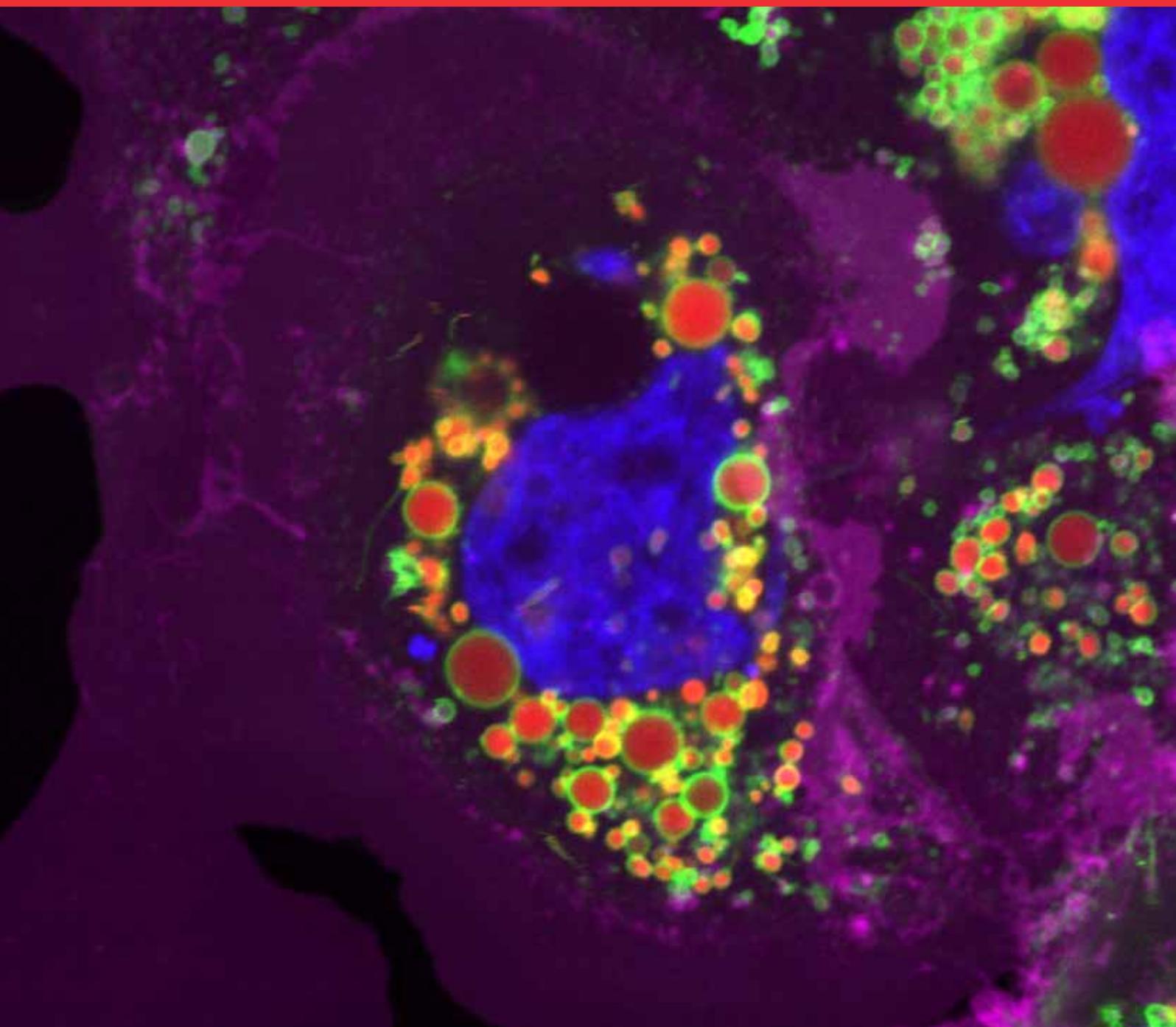


invitrogen



## 抗体药物偶联物(ADC)筛选和鉴定

便捷高效的检测抗体内化的工具

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

# 抗体药物偶联物

## “眼见为实”的抗体内化

过去十年来，生物制剂越来越多地被用作治疗药物。对于抗体药物偶联物(Antibody-Drug Conjugates, ADC)，抗体的内化是一种强有力的作用机制，可以使ADC从靶细胞质膜上的结合位点转移至溶酶体的裂解环境中，从而激活与其相连的毒素(图1)。

内化过程的效率与ADC的治疗指数直接相关。在Invitrogen™ 品牌下，我们整合了强大的pHrodo™ iFL技术、Zenon™ 标记技术和SiteClick™ 抗体标记技术，提供便捷高效且易于使用的研究内化的抗体标记工具。

## pHrodo iFL技术

### pHrodo iFL试剂非常适合检测生物分子内化

一些荧光强度不受环境影响的荧光基团(如Invitrogen™ Alexa Fluor™ 染料)研究内化时需要使用淬灭剂。而pHrodo iFL染料在中性pH时不发出荧光，内化后在酸性pH环境下可自动发出明亮的荧光(图2)，无需使用淬灭剂。

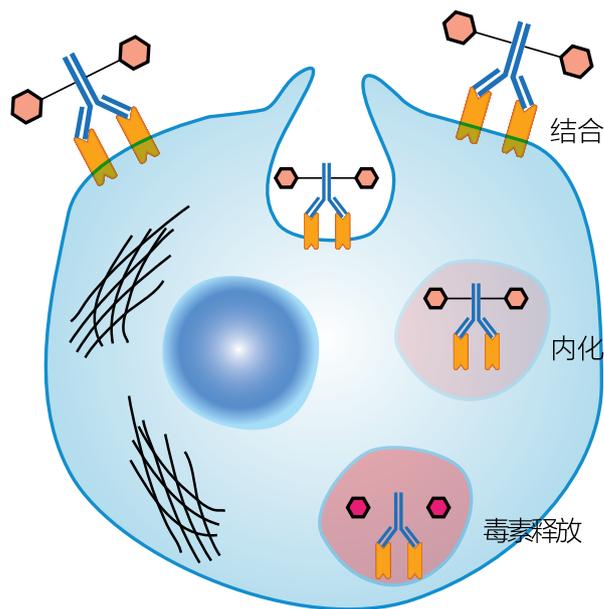


图1. 抗体药物偶联物的内化。抗体药物偶联物(ADC)由一个直接靶向肿瘤细胞抗原的单克隆抗体结合一个小的细胞毒性分子而组成的。ADC可特异性地结合靶细胞，并被迅速内化，一般在转运至溶酶体后释放出药物，产生具有高度靶向性的化学治疗药物的效用。

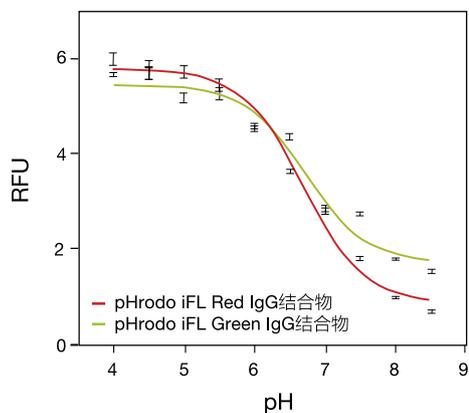
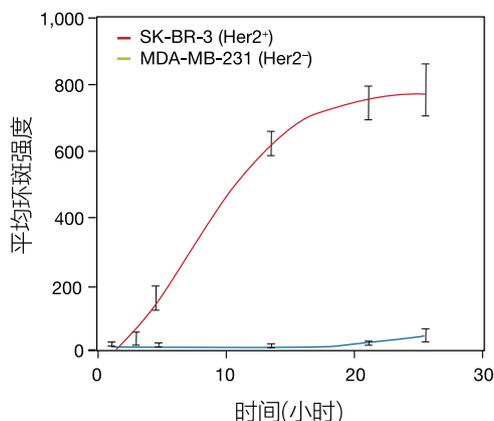


图2. 使用氨基反应性Invitrogen™ pHrodo™ iFL Red和pHrodo™ iFL Green试剂制备的赫赛汀结合物的pH应答图谱。这些结合物在细胞外中性pH下几乎无荧光，一旦内化进入细胞后可发出明亮的荧光。

使用pHrodo iFL染料标记的生物分子在细胞外不发出荧光，因此，无需清洗和淬灭即可检测活细胞中的ADC内吞和转运，只有特异性内化的抗体才可以检测到荧光信号(图3)。此外，还可以用于研究内吞途径中内化抗体的位置。图4显示了溶酶体中与GFP共定位的pHrodo iFL染料的信号。

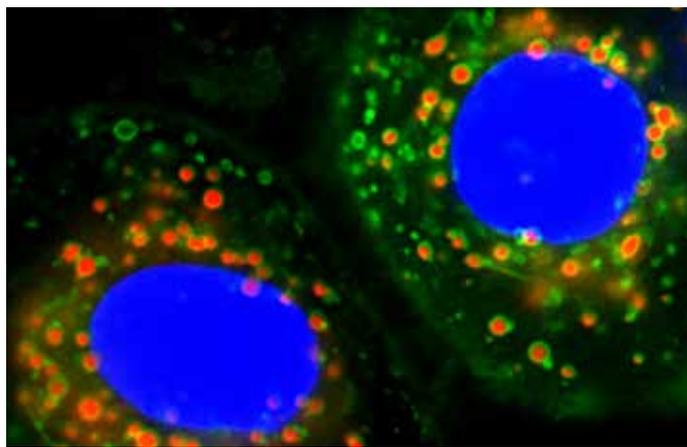


**图3. 仅在Her2+细胞内可以检测到赫赛汀—pHrodo iFL Red结合物的荧光信号，显示了特异性的内化作用。**使用5 nM赫赛汀—pHrodo iFL Red结合物37°C处理SK-BR-3 (Her2<sup>+</sup>) 或MDA-MB-231 (Her2<sup>-</sup>)细胞一定的时间，在Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5高内涵筛选(HCA)平台上分析细胞，结合的赫赛汀不断内化至Her2<sup>+</sup>细胞内；而Her2<sup>-</sup>细胞则几乎无信号。

## pHrodo iFL抗体标记方法

### pHrodo iFL Red和Green氨基反应性染料和标记试剂盒

pHrodo iFL产品可用于抗体赖氨酸的传统抗体标记。这些氨基反应性的pHrodo iFL STP酯有绿色和红色两个版本，可作为单独包装或微量蛋白标记试剂盒提供，后者包含标记和纯化蛋白或抗体所需的全部产品。



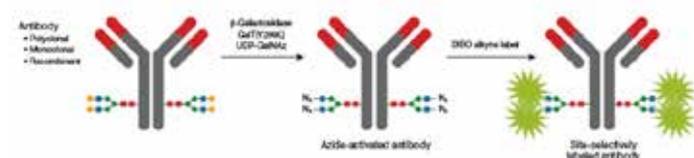
**图4. 使用氨基反应性的pHrodo™ iFL Red STP ester制备的赫赛汀结合物，只有在内化至酸性细胞器内才可发出荧光。**使用Invitrogen™ CellLight™ Lysosomes-GFP和NucBlue™ Live ReadyProbes™试剂标记这些Her2<sup>+</sup>的SK-BR-3细胞，用pHrodo™ iFL Red-Herceptin结合物处理18小时，在Invitrogen™ EVOS™ FL Auto成像系统上成像。

# 高效简单且可重复的抗体标记方法

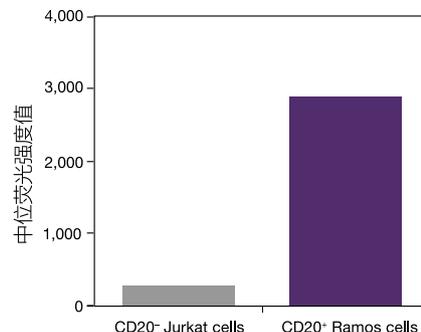
## SiteClick抗体标记技术

### 可重复性高且简单的IgG抗体位点特异性修饰

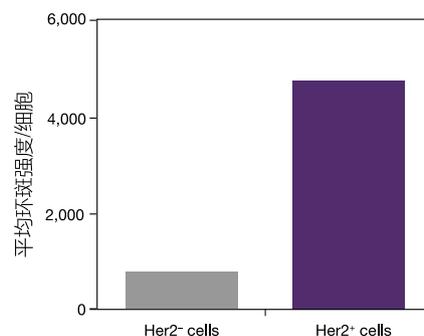
Invitrogen™ SiteClick™抗体标记技术可以简单且位点特异性地将化合物(包括荧光染料或毒素类)连接至只在几乎所有IgG抗体(不管哪种构型和宿主种属)的重链才存在的碳水化合物结构域上(图5)。SiteClick标记技术基于click化学反应。Invitrogen™ SiteClick™ Antibody Azido Modification Kit可以使用酶特异性地将叠氮基团连接至抗体碳水化合物结构域。连接叠氮后,只需简单的孵育步骤即可结合多种sDIBO炔烃标记物。例如,将pHrodo iFL Red sDIBO alkyne连接至叠氮修饰的抗体上,评估悬浮的和贴壁的癌症细胞模型的内化作用(图6、7)。



**图5. SiteClick标记包括3步, 使用酶修饰, 然后通过click化学反应进行标记物连接。** SiteClick抗体标记过程的第一步是使用 $\beta$ -半乳糖苷酶去除重链N-连接聚糖上的末端半乳糖残基, 暴露可修饰的GlcNAc残基。第二步, 使用GalT(Y289L)酶通过酶促反应将GalNAz连接至末端GlcNAc残基上, 利用叠氮标签活化游离的末端GlcNAc残基。第三步, 利用click化学反应使叠氮残基与所选择的二苯环辛炔(sDIBO)一功能化的探针(如Alexa Fluor 488 sDIBO炔烃)反应。



**图6. 使用SiteClick标记抗体和悬浮细胞进行内化分析, 在Attune NxT流式细胞仪上检测。**使用rituximab-pHrodo iFL Red结合物处理CD20<sup>+</sup>Ramos细胞或CD20<sup>-</sup>Jurkat细胞16小时, 在Attune NxT流式细胞仪上检测。CD20<sup>+</sup>细胞的中位荧光强度明显更高, 标明了特异性的抗体内化作用。



**图7. 使用SiteClick标记抗体和贴壁细胞进行内化分析在CellInsight CX5 HCA上检测。**使用trastuzumab-pHrodo iFL Red结合物处理Her2<sup>+</sup>SK-BR-3细胞或Her2<sup>-</sup>MDA-MB-231细胞18小时, 在CellInsight CX5 HCA平台上分析。Her2<sup>+</sup>细胞的平均环斑强度明显更高。

# 快速且不同规模的ADC筛选

## Zenon pHrodo iFL试剂盒

### Zenon pHrodo iFL试剂 — 快速简便，最适合内化筛选的抗体标记方法

Zenon标记技术提供了一种可靠的方法，使用pHrodo iFL Green或Red标记物可在10分钟内生成荧光标记抗体。Zenon片段可以特异性地靶向并结合人或小鼠IgG抗体的Fc片段(图8)。Zenon标记方法提供了独特的灵活性，可用于筛选不同的抗体或不同抗体浓度(图9)。利用Zenon标记技术，可标记低至1  $\mu\text{g}$ 的抗体，与传统的使用氨基或巯基反应性标记物的标记方法不同，Zenon标记步骤还可与BSA及其他稳定蛋白兼容。

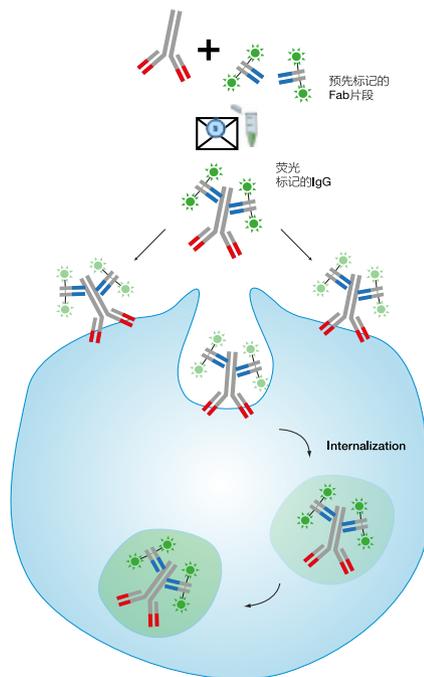


图8. Zenon pHrodo iFL标记试剂可与人或小鼠IgG结合，迅速标记，从而快速、规模可扩展地筛选多种抗体样本的抗体内化。

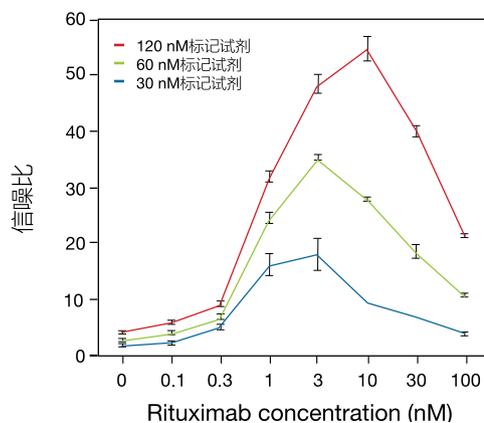


图9. 使用Zenon pHrodo iFL Red试剂标记的Rituximab被内化至CD20+细胞后可发出明亮的荧光，清晰显示了广范的抗体浓度范围内的特异性抗体内化。使用三种不同浓度的Zenon pHrodo iFL Red试剂标记后，将不同浓度的标记rituximab加入CD20+细胞中，37°C孵育16小时，使用Attune NxT流式细胞仪检测信噪比(S/N)。

您可以利用多种仪器检测平台的收集数据更好地了解、预测并最终改变影响抗体内化作用和药物开发研究的因素。



Attune NxT  
流式细胞仪



Varioskan™ LUX  
酶标仪



CellInsight CX5  
HCA平台



EVOS FL Auto 2  
细胞成像系统

## 订购信息

| 产品  | 规格         | 货号     |
|---|------------|--------|
| pHrodo iFL Red STP ester, amine reactive                    | 1 mg       | P36010 |
|   | 3 x 100 µg | P36011 |
| pHrodo iFL Green STP ester, amine reactive                  | 1 mg       | P36012 |
|   | 3 x 100 µg | P36013 |
| pHrodo iFL Red Microscale Protein Labeling Kit              | 1 kit      | P36014 |
| pHrodo iFL Green Microscale Protein Labeling Kit            | 1 kit      | P36015 |
| SiteClick Antibody Azido Modification Kit                   | 1 kit      | S20026 |
| SiteClick Biotin Antibody Labeling Kit                      | 1 kit      | S20033 |
| Click-iT Alexa Fluor 488 sDIBO Alkyne for Antibody Labeling | 1 kit      | C20027 |
| Click-iT Alexa Fluor 555 sDIBO Alkyne for Antibody Labeling | 1 kit      | C20028 |
| Click-iT Alexa Fluor 647 sDIBO Alkyne for Antibody Labeling | 1 kit      | C20029 |
| Click-iT Biotin sDIBO Alkyne for Antibody Labeling          | 1 kit      | C20030 |
| Click-iT Amine sDIBO Alkyne for Antibody Labeling           | 1 kit      | C20031 |
| Click-iT SDP Ester sDIBO Alkyne for Antibody Labeling       | 1 kit      | C20032 |
| Click-iT pHrodo iFL Red sDIBO Alkyne for Antibody Labeling  | 1 kit      | C20034 |
| Zenon pHrodo iFL Green Mouse IgG Labeling Kit               | 1 kit      | Z25609 |
| Zenon pHrodo iFL Red Mouse IgG Labeling Kit                 | 1 kit      | Z25610 |
| Zenon pHrodo iFL Green Human IgG Labeling Kit               | 1 kit      | Z25611 |
| Zenon pHrodo iFL Red Human IgG Labeling Kit                 | 1 kit      | Z25612 |

如需了解更多信息，请登录 [thermofisher.com/adcdiscovery](http://thermofisher.com/adcdiscovery)



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982

销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com

技术咨询信箱：LifeScience-CNTS@thermofisher.com

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC