

MonoRab™ Anti-VHH Antibodies

检测驼科/人源化单域抗体的独特工具



CONTENTS

简介 01

什么是VHH?

VHH特点

Anti-VHH抗体

Anti-VHH抗体在VHH抗体发现中的应用 02

案例1. 驼科B细胞克隆技术优化

案例2. VHH抗体高特异性纯化

Anti-VHH抗体在人源化VHH抗体优化中的应用 04

案例1. 人源化VHH抗体的检测

案例2. 人源化VHH高特异性亲和纯化

Anti-VHH抗体在细胞疗法及VHH药物开发中的应用 06

案例1. 基于VHH的CAR-T细胞表征

案例2. 基于VHH的CAR-T细胞富集

案例3. 基于VHH的CAR-T细胞定位

案例4. VHH药物的药代动力学检测

产品选择指导 10

Anti-VHH抗体产品列表

Anti-VHH抗体系列比较

产品性能 11

MonoRab™技术保证高亲和力 $K_d \approx 10^{-11}$ M

亚型特异性—仅结合重链抗体

高通用性

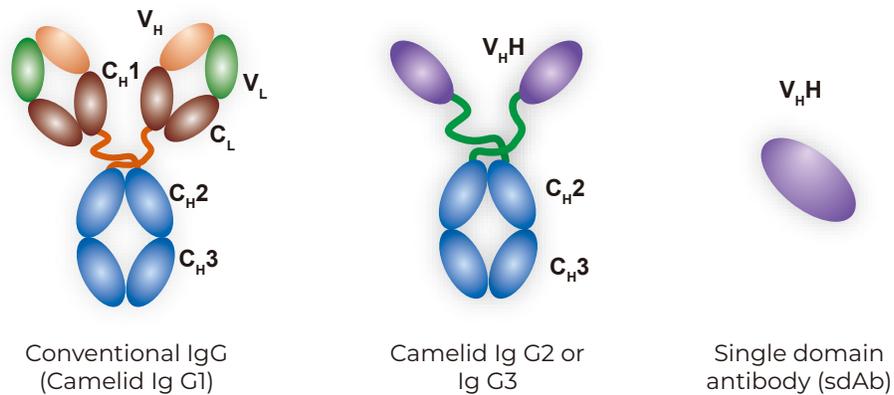
高稳定性

高灵敏度

简介

什么是VHH?

美洲驼、羊驼和骆驼等驼科动物家族会产生两种不同类型的 IgG 抗体。一类是由两条重链和两条轻链组成的常规 IgG1抗体（MW~150 kDa）。另一种类型包括 IgG2 和 IgG3（MW~90 kDa），它们缺少轻链以及重链的一个恒定结构域（CH1 结构域）。这些抗体通常被称为重链抗体（HCAb）。HCAb 的可变域称为单域抗体，也称为 sdAb 或 VHH。VHH 被认为是最小的抗原结合个体。



VHH特点

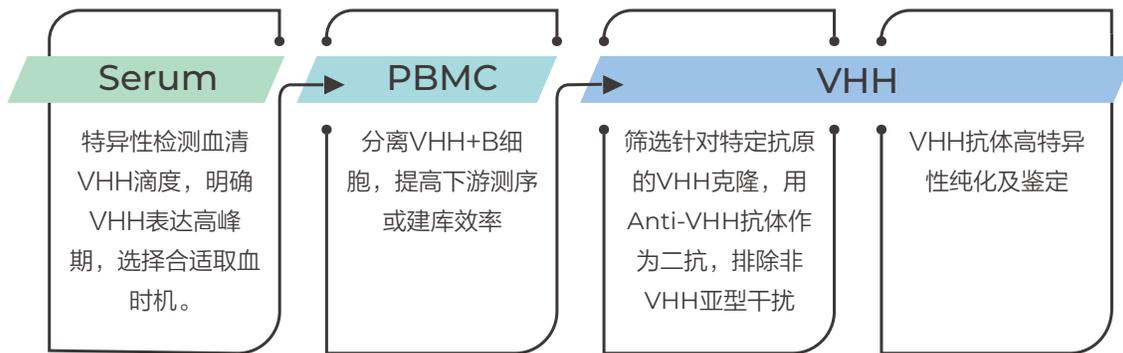
VHH具有许多独特的特性，例如体积小、结构稳定、溶解度高以及可接近传统抗体无法到达的隐藏表位等。尽管VHH的分子量很小（约 15 kDa），但其能够以高特异性和高亲和力结合目标抗原。因此，VHH是很有前景的新一代治疗和免疫诊断工具。例如可开发基于VHH的抗体药物、CAR-T 细胞疗法、靶向递送载体以及分子影像工具等。

Anti-VHH抗体

Anti-VHH抗体可特异识别驼科 IgG2 和 IgG3 上 VHH 结构域。其可通过不依赖tag的方式检测目的VHH，有效降低因tag的引入而为后期VHH药物开发带来的潜在风险。Anti-VHH抗体在VHH抗体发现、人源化VHH抗体优化、细胞疗法及VHH药物开发中发挥了重要作用。

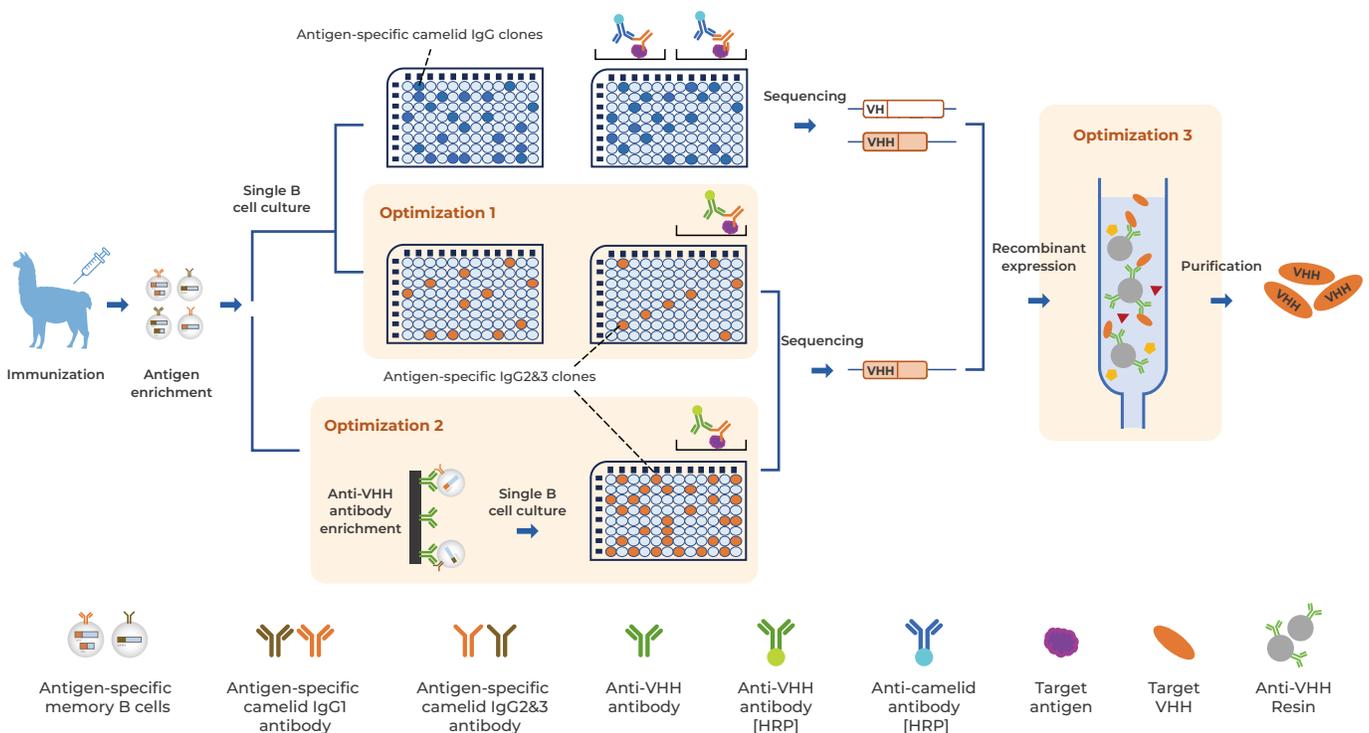
Anti-VHH抗体在VHH抗体发现中的应用

VHH 抗体发现技术主要包括噬菌体展示技术和 B 细胞克隆技术。驼科动物中传统双链抗体 IgG1 的存在会对 VHH 抗体的筛选造成干扰，一定程度上降低了 VHH 抗体发现的效率。而 Anti-VHH 抗体可以高特异性地富集 VHH+ 细胞和检测 VHH 抗体的表达，因此可以有效助力 VHH 抗体的发现。

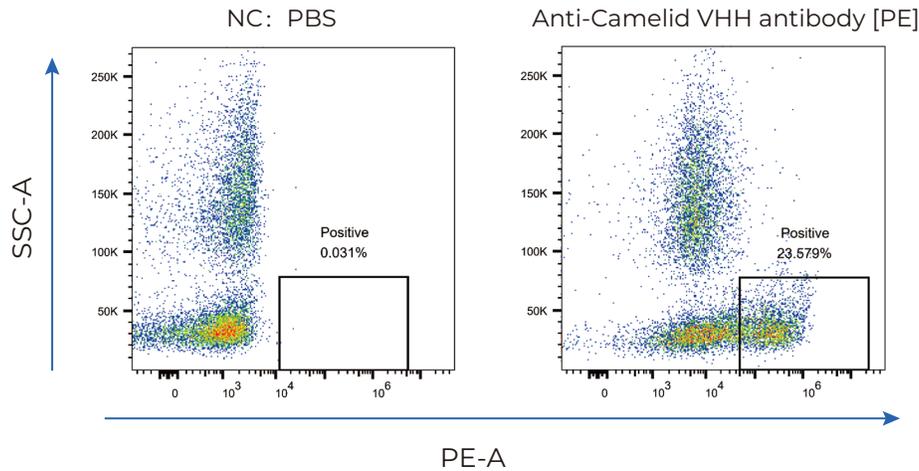


案例1. 驼科B细胞克隆技术优化

在使用 B 细胞克隆技术筛选 VHH 抗体时需要考虑非 VHH 序列的干扰，目前主要是通过额外的铺板和测序以提高获得目标 VHH 序列的概率。而 Anti-VHH 抗体则可以通过富集 VHH+B 细胞优化这一过程。通过该抗体富集得到的 B 细胞均只分泌 VHH 抗体，因此可以极大地降低铺板工作量，节约成本，并提高筛选到目标 VHH 的效率。此外，Anti-VHH 抗体还可作为阳性克隆筛选阶段的检测抗体，以确保得到的阳性克隆均为 VHH 亚型。



案例数据 — 分选表达VHH的PBMC

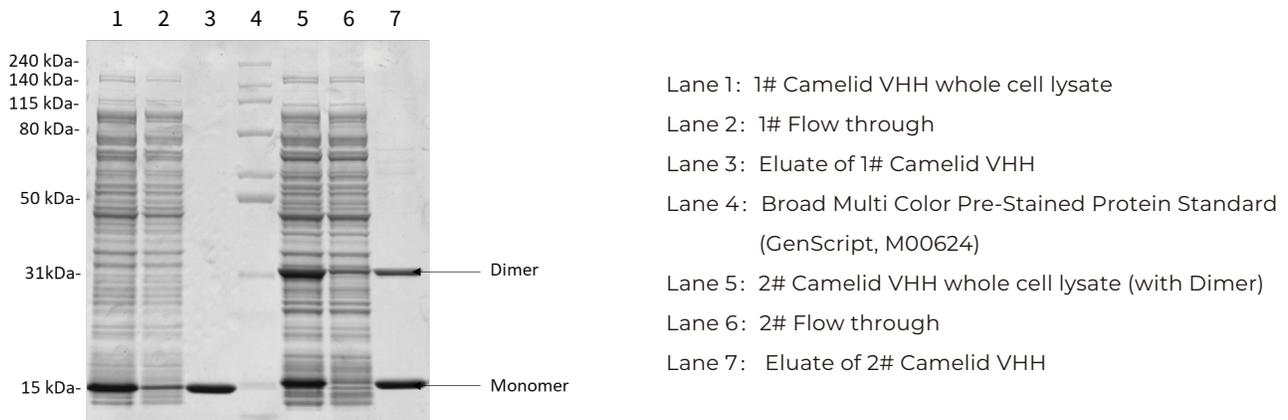


FACS分选非免疫骆驼中VHH+PBMCs。抗体采用2 μ g MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail [PE] (GenScript, A02018)。结果如图所示，VHH+PBMC的数量约为23.579%，与理论值一致。表明A02018对VHH+PBMC具有较高的特异性，可用于VHH+PBMC的分选。

案例2. VHH抗体高特异性纯化

VHH的纯化可通过亲和层析进行，但是目前常用的手段是通过引入Fc或His等标签，并使用Protein A或Ni柱等纯化。然而该方案引入的tag为后期VHH药物的开发带来了潜在的风险。Anti-VHH 抗体原料是高纯度VHH获取的良好工具。基于Anti-VHH 抗体原料开发的纯化介质，可以简单、高效地以不依赖tag的方式纯化VHH，是VHH药物临床前研究的理想工具。

案例数据 — Anti-Camelid VHH Resin纯化驼科VHH



使用MonoRab™ Anti-Camelid VHH Affinity Resin (GenScript, L00905) 从*E. coli*裂解液中纯化驼科VHH#1 和VHH#2蛋白。结果显示该产品可以高特异性地纯化单体和二聚体的驼科VHH。

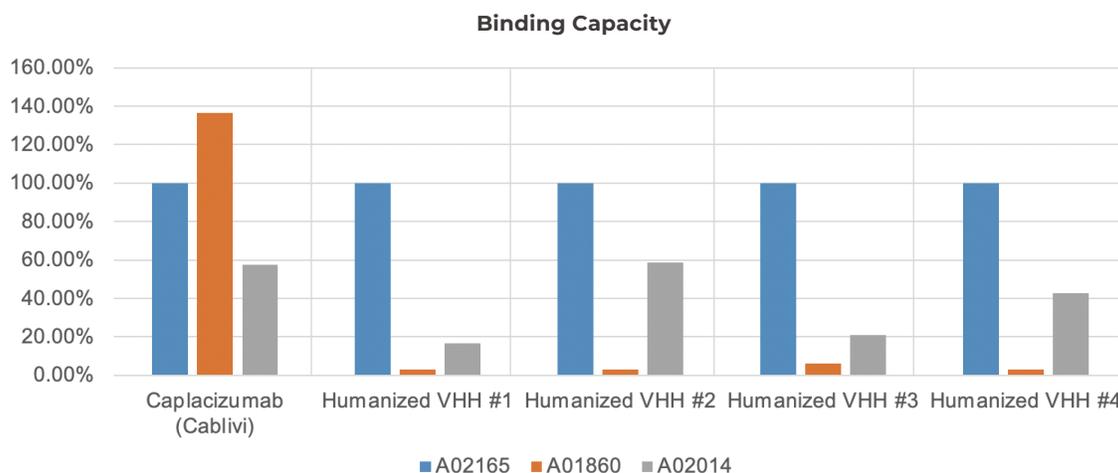
Anti-VHH抗体在人源化VHH抗体优化中的应用

驼科 VHH 序列中较长的 CDR3 区以及非经典的二硫键，可能引起构象表位导致的免疫原性。此外，VHH 的 CDR 和 FR 区的高水平体细胞超突变也限制了 VHH 与人类 IGHV3 序列的同源性。因此，在开发 VHH 药物时出于药效及安全性考虑，会对驼科 VHH 进行人源化改造。

案例1. 人源化VHH抗体的检测

VHH 抗体的人源化改造可能会导致原本 Anti-Camelid VHH Abs 无法较好地识别。且为了避免引入更多风险因素，制药企业会避免在 VHH 上添加标签蛋白，这为 VHH 的检测及纯化带来了许多障碍。而 Anti-Humanized VHH Antibody 可以有效地识别各种不同序列的人源化 VHH。

案例数据 — Anti-Humanized VHH Antibody的通用性

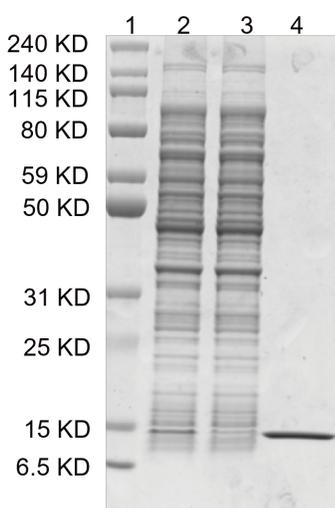


比较 MonoRab™ Rabbit Anti-Humanized VHH Antibody, mAb (GenScript, A02165)、MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Antibody, mAb (GenScript, A01860) 和 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 对人源化 VHH 的结合能力。其中 A02165 对人源化 VHHs 结合效果最好，可用于人源化 VHH 的检测和筛选。

案例2. 人源化VHH高特异性亲和纯化

人源化 VHH 抗体的纯化是 VHH 药物开发的重要一环，此前尚未有有效的亲和纯化方法能通过不依赖标签的方式纯化人源化 VHH。常用的 Protein A 虽然可以较好地纯化传统双链抗体，但是对 VHH 纯化的适用性并不是很好。以 Anti-Humanized VHH Antibody 作为配基的 Anti-Humanized VHH Resin，可以从常用的蛋白质表达系统（如细菌、酵母和哺乳动物细胞）中高特异性地纯化人源化 VHH，尤其适用于 Tag-free 及不含 Fc 的人源化 VHH 单价及多价抗体的纯化。

案例数据 — Anti-Humanized VHH Resin 纯化人源化VHH



Lane 1: Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard (GenScript, M00624)

Lane 2: Whole cell lysate

Lane 3: Flow through

Lane 4: Eluate of target Humanized VHH single domain antibody-1

使用 MonoRab™ Anti-Humanized VHH Affinity Resin FF (GenScript, L00951) 从 *E. coli* 裂解液中纯化人源化 VHH#1 蛋白。结果显示该产品可以高特异性地纯化人源化 VHH。

Anti-VHH抗体在细胞疗法及VHH药物开发中的应用

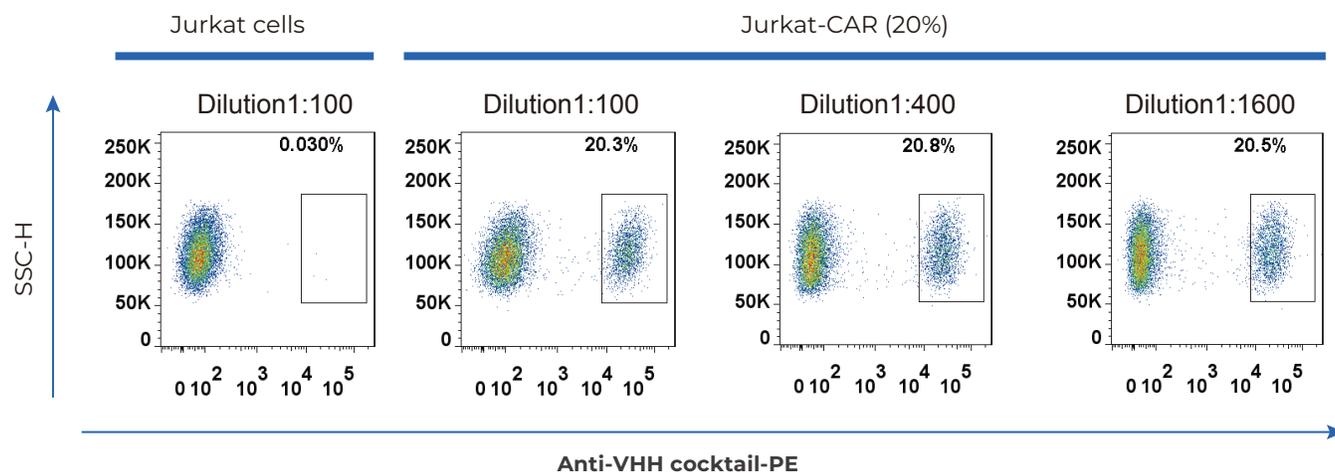
对于基于VHH的CAR-T细胞治疗，CAR的阳性率作为CAR-T细胞产品活性的关键特征，检测CAR+细胞的数量和比例不可或缺。此外，为了优化CAR-T细胞在实体瘤中的治疗效果，检测其在组织中的分布至关重要。对于VHH形式的抗体药物开发，检测VHH在体内的代谢尤为关键。因此，有效的VHH检测手段可以较快推动VHH相关药物的开发。

案例1. 基于VHH的CAR-T细胞表征

基于scFv的CAR-T细胞的表征手段，主要包括针对抗原结合位点（如CD19抗原）、重轻链（如抗Fab抗体或Protein L）、以及linker（如抗G4S linker）的检测。但是对基于纳米抗体的CAR-T细胞表征，由于缺乏linker以及轻链，则主要是针对抗原结合位点检测或是通过Anti-VHH抗体。而针对抗原结合位点的检测手段需要定制化，成本较高，工艺复杂。因此使用Anti-VHH抗体进行CAR-T细胞的表征具有更高的适用性。

GenScript Anti-VHH抗体对胞外域为VHH的CAR-T细胞表现出超高特异性，能够准确检测出样品中VHH CAR-T细胞的数量。

案例数据 — FACS检测CAR-T细胞

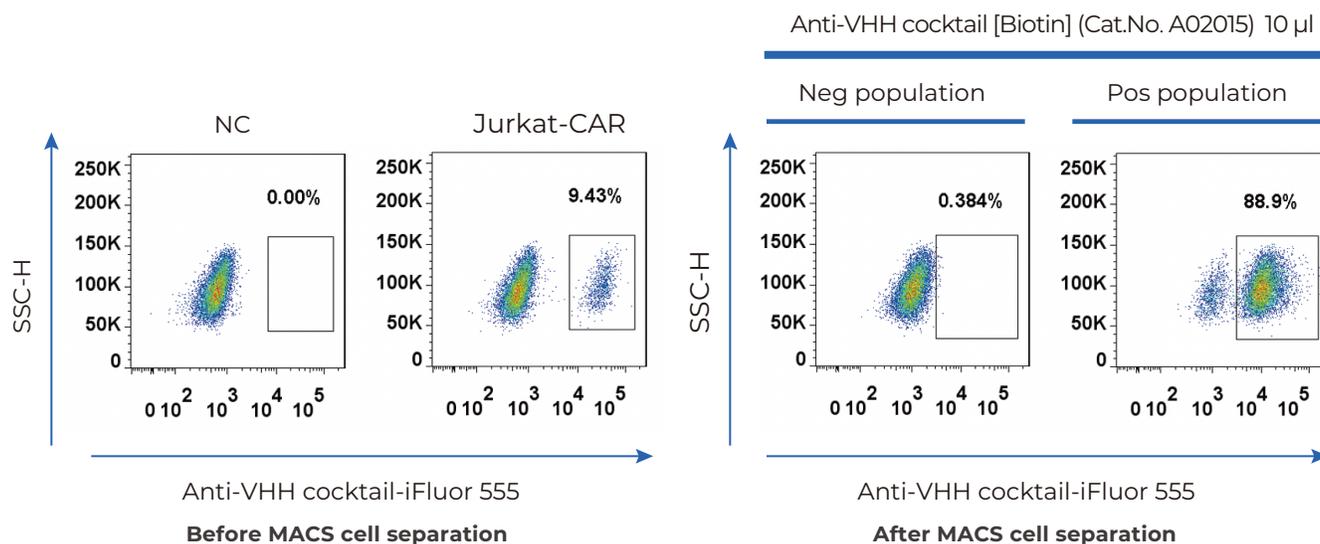


FACS检测不同稀释比例的MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail [PE] (GenScript, A02018) 对Jurkat细胞（包含20%基于VHH的Jurkat-CAR细胞）的结合活性。结果显示A02018特异性结合基于VHH的Jurkat-CAR细胞，可用于CAR-T细胞的确认和检测。

案例2. 基于VHH的CAR-T细胞富集

GenScript 的 Anti-VHH 抗体也可结合磁珠分选法 (MACS) 用于 VHH CAR-T 细胞的分选和富集。

案例数据 — 磁珠法富集CAR-T细胞



FACS检测MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail [Biotin] (GenScript, A02015) 和anti-Biotin磁珠 (Miltenyi) 通过MACS技术对基于VHH的CAR-T细胞的分选效果。

其中naive T细胞作为阴性对照，FACS分析的检测抗体采用MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail [iFluor 555] (GenScript, A02020)。如图所示，在使用MACS细胞分离后，阳性CAR-T细胞的比例从10%提高到90%，表明A02015是CAR-T细胞MACS分离的理想工具。

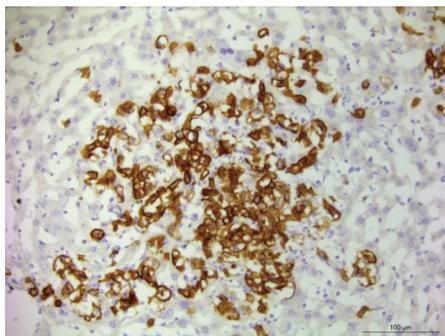
案例3. 基于VHH的CAR-T细胞定位

虽然 CAR-T 细胞疗法在治疗某些类型的癌症方面取得了成功，例如晚期白血病，但其在治疗实体瘤方面的疗效仍然有限。主要原因是 CAR-T 细胞无法通过实体瘤的物理屏障。为了优化 CAR-T 细胞以获得更大的疗效，检测 CAR-T 细胞在组织中的分布非常重要。此外，CAR-T 细胞的分布为预测可能的不良反应提供了必要的信息。

GenScript MonoRab™ Anti-Camelid VHH Cocktail 可特异性结合浸润在 NCG 小鼠脾脏和 PDX 小鼠肝脏中的 VHH 转导 CAR-T 细胞，通过免疫荧光和免疫组化分析可检测组织中 CAR-T 细胞的分布。

案例数据 — IHC检测CAR-T细胞定位

VHH-CART infiltrated liver



免疫组化分析浸润在PDX小鼠肝组织中的转导VHH的CAR-T细胞。一抗使用1 μg/mL的MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014)，二抗使用2.5 μg/mL的生物素标记的Anti-Rabbit IgG (H+L)，最终的信号扩增使用ABC（亲和素-生物素复合物）试剂盒，使用苏木精进行复染。结果显示浸润在肝组织的转导VHH的CAR-T细胞的细胞膜或细胞质上可以观察到阳性信号。

案例数据 — IF检测CAR-T细胞定位

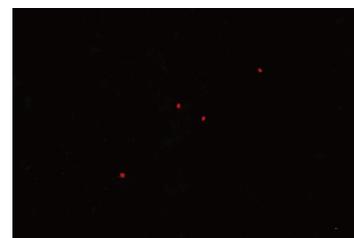
200X

APC hCD45

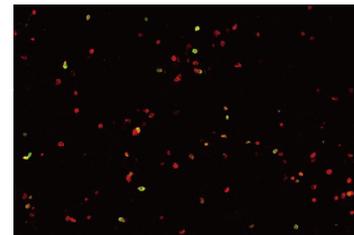
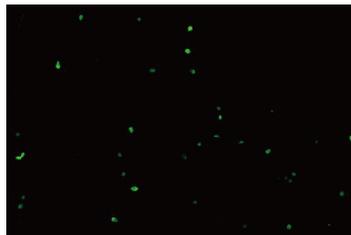
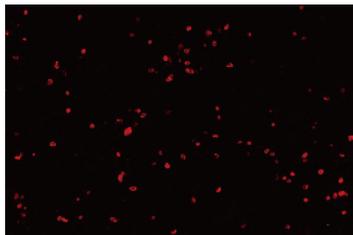
A02014

Merge(hCD45+A02014)

Untransduced T cell-infiltrated NCG mice spleen



VHH-CART-infiltrated NCG mice spleen

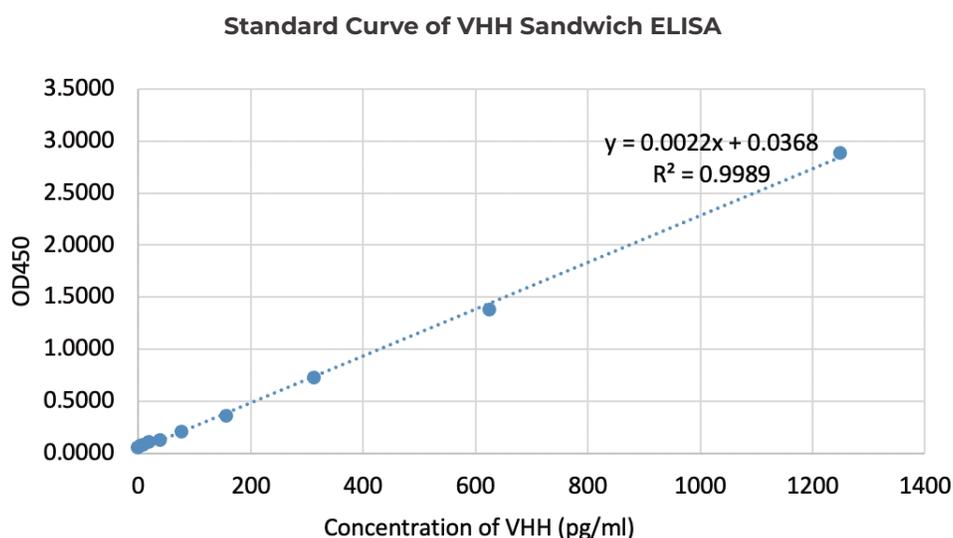


免疫荧光分析浸润在NCG小鼠脾组织中的转导VHH的CAR-T细胞。一抗使用0.5 μg/mL的MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014)，二抗使用4 μg/mL的Anti-Rabbit IgG (H+L) [Alexa Fluor 488] (绿色)。0.5 μg/mL APC标记的hCD45单抗用于检测所有注射的T细胞（红色）。共聚焦图像显示浸润在NCG小鼠脾组织中转导VHH的CAR-T细胞的细胞质中表现出阳性信号。未转导的浸润T细胞表现出阴性信号。

案例4. VHH药物的药代动力学检测

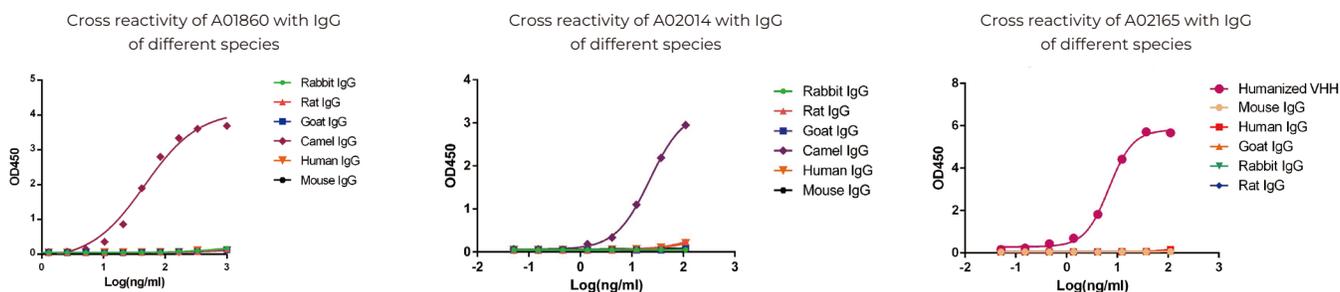
在临床前早期阶段的一些筛选性 PK 研究中，考虑到节约时间、成本以及抗独特型抗体短时间内难以获得等因素，通常使用 anti-human IgG Fc 抗体检测非人种属的 PK 样品。但由于纳米抗体缺乏 Fc 片段，该方案在纳米抗体的 PK 检测上并不适用。GenScript 的 Anti-VHH 抗体已被验证对人、兔、鼠、羊等多种物种的 IgG 不存在交叉反应，因此除了临床早期阶段用于筛选纳米抗体的 PK 研究外，还可以在在一定程度上取代抗独特型抗体检测纳米抗体药物在人体的代谢。

案例数据 — Sandwich ELISA法检测VHH



VHH夹心ELISA的标准曲线。使用MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH (GenScript, A01860) 和MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail [HRP] (GenScript, A02016) 分别作为捕获抗体和检测抗体，灵敏度最高可达39 pg/mL。

案例数据 — Anti-VHH抗体与其他物种无交叉性



MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH (GenScript, A01860) 与 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 特异性结合骆驼科IgG。MonoRab™ Rabbit Anti-Humanized VHH Antibody, mAb (GenScript, A02165) 特异性结合VHH。并且三种Anti-VHH抗体对小鼠、大鼠、兔、山羊和人IgG没有交叉性，可用于不同种属血样的检测。

产品选择指导

金斯瑞的 Anti-VHH 抗体产品包含两组高特异性单克隆抗体和一组广谱检测单克隆鸡尾酒抗体。广泛的产品选择可满足驼科和人源化 VHH 的检测需求。此外，还有多种偶联物及衍生产品可供选择，以满足您对实验设计不同要求。

Anti-VHH抗体及衍生产品列表

Product Type	Species Specificity	Antibodies								Related Products	
		Unconjugated	Conjugated						Resin	Plate	
			HRP	Biotin	iFluor 488	iFluor 555	iFluor 647	PE			FITC
Anti-Camelid VHH, mAb	Llama, Camel, Alpaca	A01860	A01861	A01995	A01862	A01863	A01994			L00905	
Anti-Humanized VHH, mAb	Humanized, Llama, Camel, Alpaca	A02165	A02167	A02166	A02168	A02169	A02170			L00951	
Anti-Camelid VHH, mAb Cocktail	Llama, Camel, Alpaca	A02014	A02016	A02015	A02021	A02020	A02019	A02018	A02017		L00946
Application											
Flow cytometry		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Western blot / Dot blot		✓	✓	✓							
ELISA		✓	✓	✓							✓
Immunohistochemistry		✓	✓	✓							
Immunofluorescence		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Cell sorting		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Purification										✓	

同型对照

Product	Unconjugated	iFluor 488	iFluor 555	iFluor 647	PE
MonoRab™ Rabbit IgG Control (Whole Molecule), mAb	A02022	A02028	A02027	A02026	A02025

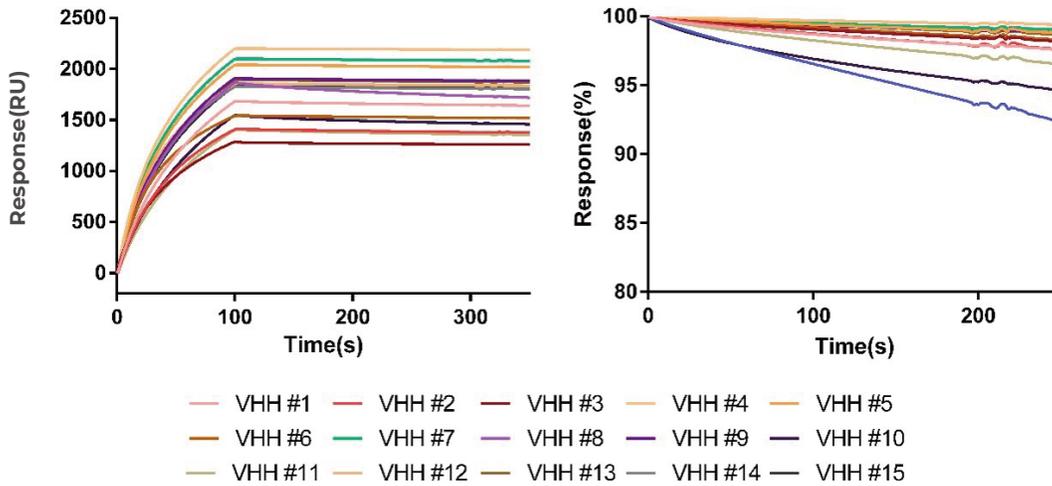
Anti-VHH抗体系列性能总结

Antibody	Anti-Camelid VHH, mAb	Anti-Humanized VHH, mAb	Anti-Camelid VHH, mAb Cocktail
Products	A01860, A01861, A01995, A01862, A01863, A01994, L00905	A02165, A02167, A02166, A02168, A02169, A02170, L00951	A02014, A02016, A02015, A02021, A02020, A02019, A02018, A02017, L00946
Binding compatibility	★	★	★★
Affinity to certain VHH	★★	★★	★
Specificity to Humanized VHH	★	★★	★
Specificity to Camelid VHH	★★	★	★
VHH Discovery	★	★	★★
Detection and analysis of certain VHH	★★	★★	★★

产品性能

MonoRab™技术保证高亲和力 $K_d \approx 10^{-11}M$

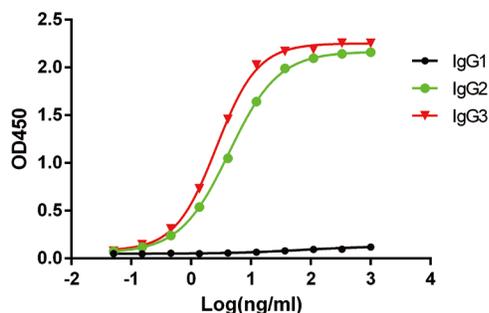
The Affinity of A02014



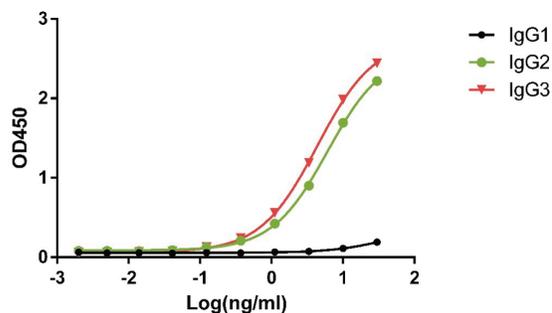
Biacore 结果显示 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 与 15 种随机序列的 VHHs 具有较高的亲和力。

亚型特异性—仅结合重链抗体

ELISA binding of A01860 with different subclasses camelid IgG



ELISA binding of A02014 with different subclasses camelid IgG



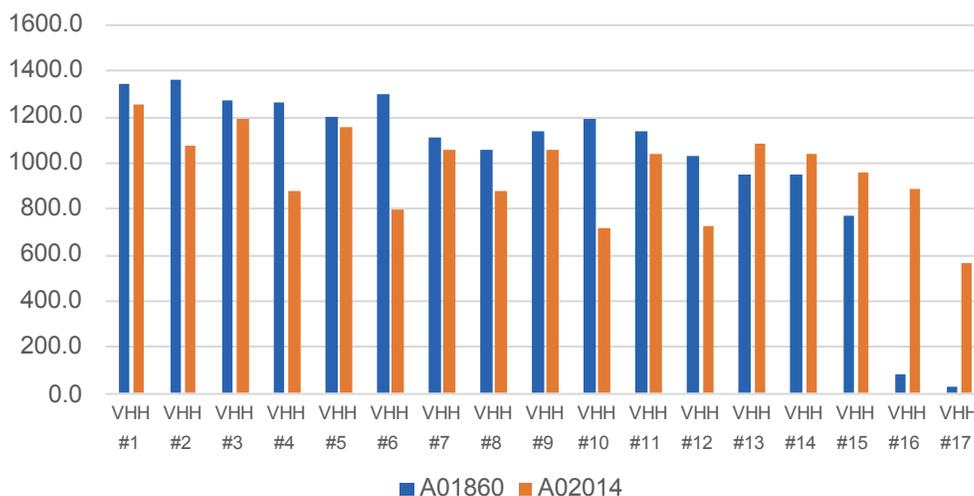
MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH (GenScript, A01860) 和 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 特异性结合驼科重链抗体 (IgG2&3) 的可变区, 而不识别具有传统抗体结构的IgG1亚型。

高通用性

Binding Compatibility with Camelid VHHs

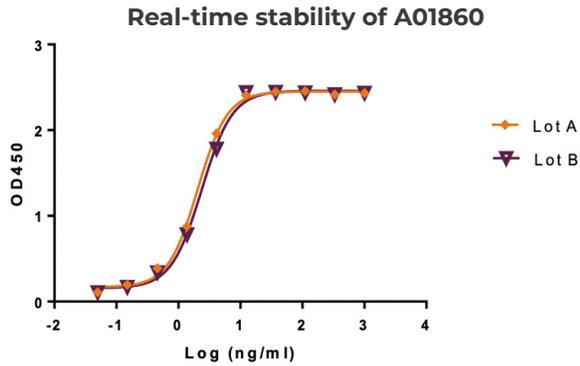
Anti-VHH: ★★ ★

Anti-VHH cocktail: ★★ ★★ ★

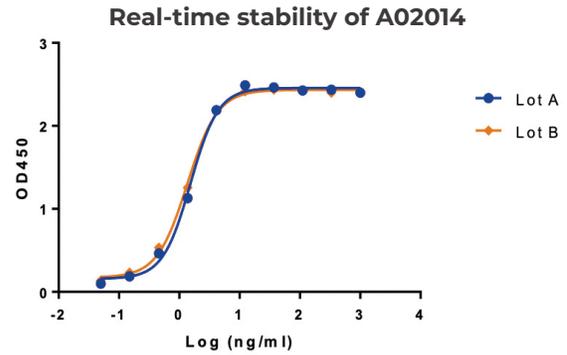


比较MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Antibody, mAb (GenScript, A01860) 和 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 对驼科VHH的结合能力。其中A02014对驼科VHHs结合的通用性较好, 可用于VHH的筛选。

高稳定性



- Lot A was produced in 2018
- Lot B was produced in 2020

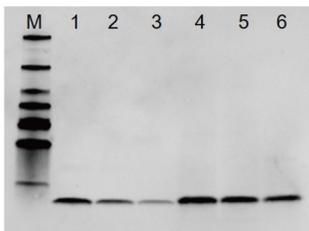


- Lot A was produced in 2019
- Lot B was produced in 2021

MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH (GenScript, A01860) 和 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 至少能在两年内保持稳定。

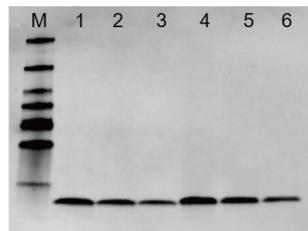
高灵敏度

Western Blot of A01860 with VHHs



VHH #1 (ng):	100	50	25	-	-	-
VHH #2 (ng):	-	-	-	100	50	25

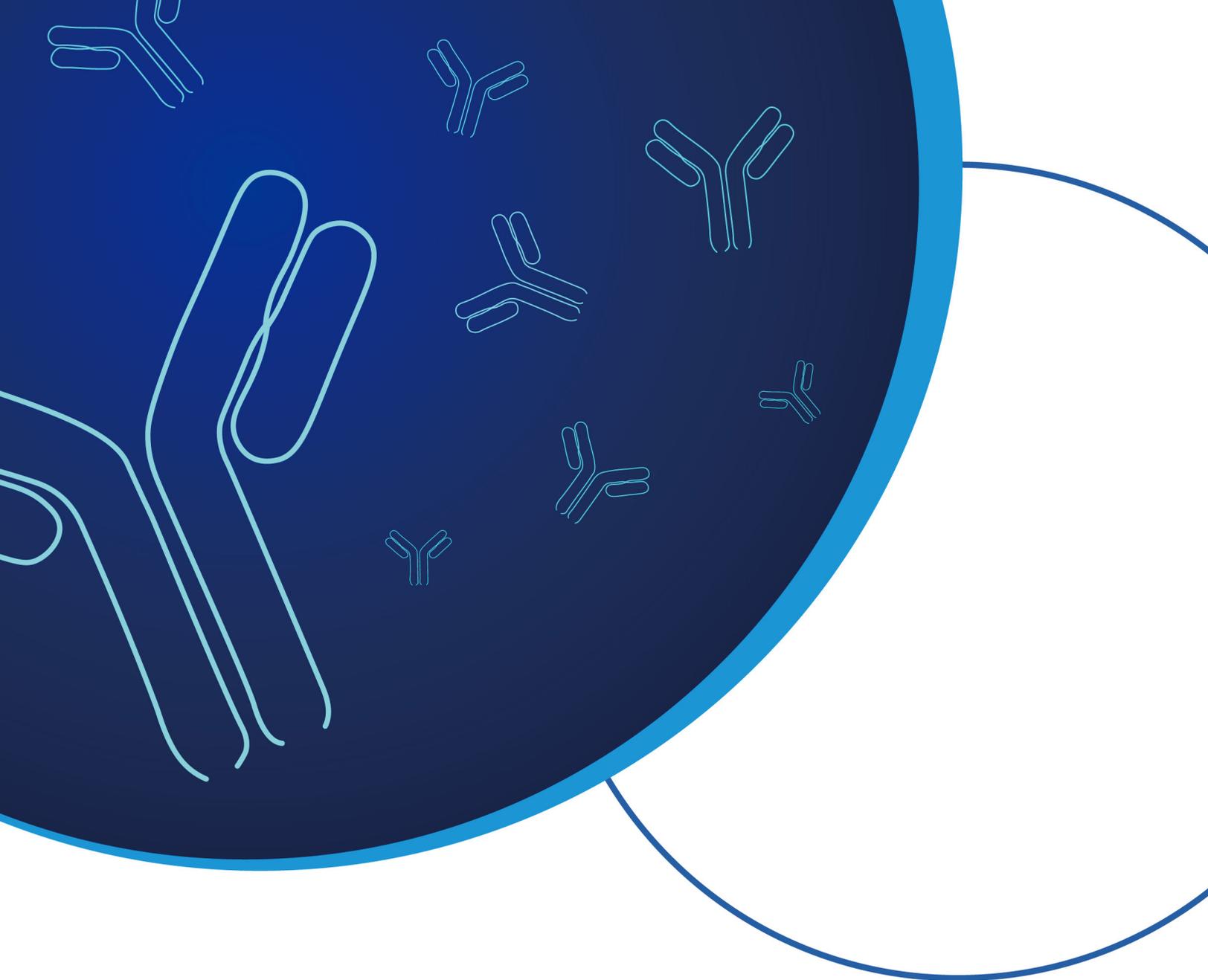
Western Blot of A02014 with VHHs



VHH #1 (ng):	100	50	25	-	-	-
VHH #2 (ng):	-	-	-	100	50	25

Lane 1: VHH #1 100 ng
 Lane 2: VHH #1 50 ng
 Lane 3: VHH #1 25 ng
 Lane 4: VHH #2 100 ng
 Lane 5: VHH #2 50 ng
 Lane 6: VHH #2 25 ng

WB结果显示MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH (GenScript, A01860) 和 MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail (GenScript, A02014) 两种抗体对VHH具有较高的灵敏度。



Contact Us

地址：江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号
邮编：211100
传真：025-58897288-5815
电话：400-025-8686-5810 025-58897288-5810
Email: product@genscript.com.cn



请扫描上方二维码
关注视频号



关注金斯瑞产品
开启实验新旅程