



四川农业大学
SICHUAN AGRICULTURAL UNIVERSITY

专业硕士学位论文

用于裸鼠 MDA-MB-231 肿瘤显影 的 PD-L1 纳米抗体的研究

姓 名 卿榆娇

学 号 2021403172

指 导 教 师 李英伦 教授

校 外 导 师 李成洪 高级兽医师

重庆畜牧科学研究院

专业学位类别 兽医硕士

研 究 方 向 分子诊断方向

培养单位名称 四川农业大学动物医学院

2024 年 6 月

学位论文答辩委员会组成

姓名	职称	导师类型	工作单位	备注
贺常亮	教授	硕导	四川农业大学动物医学院	主席
邓阳	副高级	硕导	成都市畜禽遗传资源保护中心	成员
施飞	副教授	硕导	四川农业大学动物医学院	成员
叶刚	副教授	硕导	四川农业大学动物医学院	成员
赵玲	副教授	硕导	四川农业大学动物医学院	成员
苟丽萍	讲师	非导师	四川农业大学动物医学院	秘书
答辩地点：成都校区 8-205			答辩时间：2024 年 05 月 05 日	

分类号 S859.7
UDC 636

密 级 公开
学校代码 10626

四川农业大学

专业硕士学位论文

用于裸鼠 MDA-MB-231 肿瘤显影 的 PD-L1 纳米抗体的研究

姓 名 卿榆娇
学 号 2021403172
指 导 教 师 李英伦 教授
校 外 导 师 李成洪 高级兽医师
重庆畜牧科学研究院
专业学位类别 兽医硕士
研 究 方 向 分子诊断方向
培养单位名称 四川农业大学动物医学院

2024 年 6 月

A Thesis Submitted to Sichuan Agricultural University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Master of Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine

Study of PD-L1 nanobodies for MDA-MB- 231 tumor development in nude mice

by

Yujiao Qing

Supervised by

Yinglun Li Professor

Majored in

Veterinary Medicine

December, 2023

College of Veterinary Medicine

Chengdu, Sichuan

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 犬乳腺癌概述.....	2
1.3 人乳腺癌概述.....	2
1.4 PD-L1 在 TNBC 的表达情况.....	3
1.5 PD-L1 常用检测手段.....	4
1.6 传统抗体与纳米抗体.....	5
1.7 荧光染料.....	7
1.8 荧光成像.....	9
1.9 常用数据库.....	9
1.9.1 TCGA 数据库.....	9
1.9.2 GTEx 数据库.....	10
1.9.3 CCLE 数据库.....	10
1.9.4 Uniprot 数据库.....	10
1.10 目的和意义.....	11
第二章 PD-L1 重组抗体的制备.....	12
2.1 材料与方法.....	12
2.1.1 主要生物材料.....	12
2.1.2 主要仪器.....	12
2.1.3 主要试剂.....	14
2.1.4 溶液配制.....	15
2.1.5 肿瘤细胞株.....	17
2.1.6 试验方法.....	17
2.1.7 统计与分析.....	23
2.2 结果与分析.....	24
2.2.1 以 PD-L1 为靶点筛选骆驼免疫库.....	24
2.2.2 PD-L1 重组纳米抗体的表达.....	27
2.2.3 纳米抗体亲和力 FACS 验证.....	30
2.3 讨论.....	33
2.4 结论.....	34
第三章 PD-L1 在裸鼠体内成像研究.....	35
3.1 材料与方法.....	35
3.1.1 试验动物与材料.....	35
3.1.2 试验方法.....	35

3.1.3 统计与分析.....	36
3.2 结果与分析.....	36
3.2.1 小鼠活体不同染料成像.....	36
3.2.2 小鼠活体 800 NHS 酯单染料成像.....	38
3.2.3 小鼠活体荧光成像实验.....	39
3.3 讨论.....	44
3.4 结论.....	45
第四章 结论与创新点	46
4.1 结论.....	46
4.1.1 成功构建重组质粒.....	46
4.1.2 体外重组 PD-L1 抗体验证.....	46
4.1.3 体内重组 PD-L1 抗体验证.....	46
4.2 创新点.....	47
参考文献.....	48

摘要

目的：乳腺癌是人与犬共同高发的一类重要肿瘤性疾病。在所有的恶性肿瘤中，乳腺癌的发病率已经跃居女性肿瘤首位，雌犬的乳腺肿瘤发病率也位于前二，且无品种差异，而目前常规的人类医学和宠物医学检测手段都存在一定的缺陷，因此本实验旨在构建出能与 MDA-MB-231 肿瘤细胞特异性结合的 PD-L1 纳米抗体，通过与荧光染料耦连，作为小动物活体成像试剂，在活体成像中使肿瘤显影。**方法：**基于目前已有的纳米抗体库，获得具有高亲和力的 Unique 序列，扩增 VHH 片段，插入到 pVHH-hIgG1 Fc 表达质粒中，构建 VHH-hIgG1 Fc 抗体重组表达质粒，使用 HEK293F 细胞真核瞬转表达重组抗体，SDS-PAGE 胶检测表达的 PD-L1 纳米抗体的分子量大小和纯度，流式细胞术验证抗体的亲和力，最后通过小动物活体成像系统，对 PD-L1 纳米抗体的特异性和准确性进行小鼠体内验证。**结果：**构建的 10 个抗体产量均在 20-100mg/L，SDS-PAGE 胶验证蛋白纯度>95%，在还原条件下蛋白质的迁移率为 35-50kDa；经流式细胞术验证，都与 PD-L1 中高表达的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 有较强结合，随抗体浓度提高，细胞阳性率也呈现出上升趋势，在抗体浓度为 50 μ g/mL 时，其中 9 个抗体的阳性率>80%；小鼠活体成像实验表明，使用 DyLight™ 800 NHS Ester 这个荧光染料标记抗体，对抗体活性没有影响，经小鼠尾静脉给药后，在体内只会与 MDA-MB-231 皮下瘤结合，与主要脏器（肝脏、心脏、脾脏、双肺、双肾）几乎没有非特异性结合，适合作为首选荧光染料。**结论：**本实验最终验证的 4 个 PD-L1 纳米抗体与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有高亲和力，耦连荧光染料后在小动物活体成像系统中能够使该肿瘤显影。可以认为这 4 个纳米抗体对 PD-L1 中高表达的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有较高的灵敏度和特异性，能准确地检测和定位肿瘤病灶。

关键词：MDA-MB-231；PD-L1；纳米抗体；肿瘤显影

Abstract

OBJECTIVE: Breast cancer is an important group of neoplastic diseases that are highly prevalent in both humans and dogs. Among all malignant tumours, the incidence of breast cancer has jumped to the first place of female tumours, and the incidence of mammary tumours in female dogs is also located in the top two, and there is no difference between breeds, and there are certain deficiencies in the current conventional means of detection in both human medicine and pet medicine, so this experiment aims to construct a PD-L1 nanoantibody that can specifically bind with the MDA-MB-231 tumour cell specific binding PD-L1 nanoantibodies, which can be used as small animal in vivo imaging reagents by coupling with fluorescent dyes to visualize tumours in in vivo imaging. **METHODS:** Based on the currently available nanoantibody libraries, Unique sequences with high affinity were obtained, the VHH fragment was amplified and inserted into the pVHH-hIgG1 Fc expression plasmid to construct the recombinant expression plasmid of the VHH-hIgG1 Fc antibody, the recombinant antibody was expressed using eukaryotic transient expression of HEK293F cells, the expressed PD-L1 nanoantibody was detected by SDS-PAGE gel molecular weight size and purity, flow cytometry to verify the affinity of the antibody, and finally in vivo mouse validation of the specificity and accuracy of the PD-L1 nanoantibody by a small animal in vivo imaging system. **RESULTS:** The yields of the 10 constructed antibodies were all in the range of 20-100mg/L, and the SDS-PAGE gels verified that the protein purity was >95%, Protein mobility under reducing conditions was 35-50 kDa; as verified by flow cytometry, all of them showed strong binding to MDA-MB-231, which is highly expressed in human breast cancer cells in PD-L1, and the cell positivity rate positively increased with the increase of antibody concentration, and 9 of them showed >80% positivity rate at the concentration of antibody of 50 µg /mL, the positivity rate of nine of the antibodies was >80%; in mouse live imaging experiments, it was shown that four antibodies labelled with Thermo Fisher's product DyLight™ 800 NHS Ester were able to bind exclusively to MDA-MB-231 subcutaneous tumours in nude mice and showed little or no non-specific binding to the major organs (liver, heart, spleen, both lungs, both kidneys), making them suitable for use as the preferred fluorescent dye. **CONCLUSION:** The four PD-L1

nanoantibodies finally validated in this experiment have high affinity for human breast cancer cell MDA-MB-231, and coupled with fluorescent dyes were able to visualise this tumour in a small animal in vivo imaging system. It can be concluded that these four nanoantibodies have high sensitivity and specificity for human breast cancer cell MDA-MB-231, which is highly expressed in PD-L1, and can accurately detect and localise the tumour foci.

Keywords: MDA-MB-231; PD-L1; Nanobodies; Tumour Visualisation

缩略语表

缩略语	英文全称	中文全称
PD-L1	Programmed cell death-ligand-1	细胞程序性死亡-配体 1
PD-1	Programmed death-1	细胞程序性死亡受体 1
TNBC	triple-negative breast cancer	三阴性乳腺癌
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2	人表皮生长因子受体-2
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes	肿瘤浸润淋巴细胞
ICIs	Immune checkpoint inhibitors	免疫检查点抑制剂
ORR	Overall response rate	客观缓解率
pCR	Pathologic complete Response	完全缓解率
PFS	Progression-free survival	无进展生存期
OS	Overall survival	总生存
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
TMB	Tumor Mutational Burden	肿瘤突变负荷
GFP	Green Fluorescent Protein	绿色荧光蛋白
RFP	Red Fluorescent Protein	红色荧光蛋白
TCGA	The Cancer Genome Atlas	癌症基因组图谱
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸缓冲盐溶液
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
CMT	canine mammary tumor	犬乳腺肿瘤
CMC	canine mammary carcinoma	犬乳腺癌
Ab	Antibody	抗体
Fab	Fragment of antigen binding	抗原结合段
Fc	Fragment crystallizable	抗体结晶段
ScFv	Single-Chain Fragment Variable	单链可变区片段
HCAbs	Heavy-chain antibodies	重链抗体
SdAb	Single-domain antibodies	单域抗体

第一章 绪论

1.1 研究背景

细胞程序性死亡-配体 1 (Programmed cell death-ligand-1, PD-L1) 也叫作表面抗原分化簇 274 (Cluster of Differentiation 274, CD274) 或 B7 同源体 (B7 Homolog 1, B7-H1), 是一种分子量大小为 40KDa 的跨膜糖蛋白^[1]。PD-L1 主要在肿瘤细胞、T 细胞、NK 细胞等细胞膜表面表达, 和 PD-1 一样都是肿瘤抑制性分子, 其功能与免疫系统的抑制相关^[2]。细胞程序性死亡受体 1 (Programmed death-1, PD-1) 也称为表面抗原分化簇 279 (cluster of differentiation 279, CD279), 是一种细胞表面受体, 主要在 CD4+和 CD8+T 细胞以及活化 B 细胞中表达^[3]。PD-1 与 PD-L1 相结合后, 会引起 T 细胞发生凋亡, 并诱导 T 细胞逐渐失去效应功能, 向抑制 T 细胞分化^[4]。在 PD-L1 与 PD-1 相互作用后, 会导致肿瘤细胞产生免疫逃逸机制, 使得肿瘤细胞能够逃避机体免疫系统的识别和攻击^[5]。系统性红斑狼疮这类自身免疫性疾病与先天性 PD-L1 表达缺失有关^[6], 而后天性的 PD-L1 表达改变, 则和肿瘤免疫逃逸机制相关。

恶性肿瘤已经成为威胁人类生命和健康主要疾病。在过去几十年中发病率及死亡率持续上升^[7]。据国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer,IARC) 统计显示, 2020 年度全球预计将新增约 1929 万例癌症病例, 以及 995 万例新增死亡病例, 其中, 肺癌在全球范围内成为癌症致死率最高的疾病, 据估计其导致的癌症死亡人数约占总数的 18%^[8], 而在这所有预计新增的癌症病例中, 女性乳腺癌现已超越肺癌成为全球发病率最高的恶性肿瘤之一, 其发病例数高达 226.1 万, 所占比例为 11.7%, 位居榜首^[9-10]。与此同时, 通过对比美国的相关统计数据可以发现, 我国女性患乳腺癌的平均年龄在 49.1 岁, 显现出明显的年轻化趋势^[11]。在全球范围内, 女性最常见的癌症类型就是乳腺癌, 我国女性乳腺癌的发病率正处于逐年攀升的状态, 在所有的恶性肿瘤中, 乳腺癌的发病率已经跃居女性肿瘤首位, 每年有超过 30 万名新增患者; 而女性肿瘤死亡率依次为肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌^[12]。

1.2 犬乳腺癌概述

乳腺癌是指乳腺上皮细胞由于遭受各类致癌因子影响而导致其正常增殖过程被扰乱,进而引发乳房部位出现肿块、乳头异常分泌物以及腋窝淋巴结肿大等临床症状,若进展至晚期阶段还会涉及到诸多器官发生转移现象,严重威胁生命健康^[13]。犬乳腺肿瘤 (canine mammary tumor, CMT) 是兽医临床最常见的肿瘤之一^[14],占雌性犬发病率 50%-70%,其中犬乳腺癌 (canine mammary carcinoma, CMC) 占 CMT 的 50%^[15]。雄性犬的乳腺肿瘤发病率仅为 0-2.7%^[16]。犬有五对乳腺,平行躯体纵轴,于腹中线两侧依次分布。发病部位从胸部到腹部呈递增趋势,最常发生部位为最后一对乳腺^[17]。犬发病原因通常是由自身因素和外界因素两方面共同作用的^[18],内因主要包括:犬的性别、年龄、品种、生育情况、绝育情况、自身免疫与饮食情况等,外因主要包括:药物、寄生虫、病毒、机械性刺激等。

犬乳腺癌的诊断主要有以下手段:临床检查、病史调查、实验室检查、影像学检查、病理学检查、分子生物学检查等^[19]。但这些诊断手段目前都存在一定的缺陷^[20]:实验室血常规和血生化检查无法特异性检测乳腺癌肿瘤标志物;X射线、B超、CT、核磁共振这些影像学检查无法显示微小的钙化点;病理组织切片检查只能反映取样时病变部位的状态,无法检测肿瘤细胞转移情况;分子生物学诊断用于检测遗传物质和蛋白质的改变,需要找到可靠的肿瘤标志物。在宠物临床上,手术切除肿瘤依然是最常规的治疗方式,但当肿瘤体积过大或其他因素干扰无法进行手术时,只能使用化学疗法或免疫治疗来控制癌症进程。犬乳腺癌与人乳腺癌在肿瘤分子变化和临床特征有极高的相似度^[21],如发病率、激素相关性、肿瘤大小与形态、临床表现以及组织学和分子异质性,可作为人乳腺癌研究的理想动物模型^[22]。

1.3 人乳腺癌概述

人医临床针对常规乳腺癌的主要治疗手段依然是外科手术,此外,还需辅以适当的放射性疗法、化学疗法、内分泌疗法、靶向药物治疗以及多种治疗方式相互融合的综合性治疗方案,能有效降低乳腺癌的复发率与死亡率^[23]。虽然上述疗法能

够取得良好的治疗效果,但无可否认的是,这些疗法伴随着一定程度的毒性和副作用,会产生严重的耐药问题,并且诊疗成本颇高^[24]。而三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC) 约占所有乳腺癌新发病例的 24%^[25], 是一类外科术后具有更高的复发率、更高的转移风险及较差预后的乳腺癌。TNBC 的孕激素受体(Progesterone Receptor, PR)、雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)与人表皮生长因子受体-2(Human Epidermal Growth Factor Receptor-2, HER-2)表达皆呈现出阴性状态^[26], 因此造成了常见的内分泌治疗及针对 HER2 的分子靶向药物治疗对 TNBC 患者无效,并且患者易对化疗耐受^[27],免疫治疗和靶向治疗药物也相对较少^[28],预后不佳,目前临床尚无良好的治疗方法^[29]。

1.4 PD-L1 在 TNBC 的表达情况

肿瘤免疫逃逸是肿瘤生存的重要策略,产生免疫逃逸的机制有很多种,包括调节免疫系统中的免疫细胞,免疫抑制细胞因子和趋化因子,以及下调免疫功能的“免疫检查点”通路的途径^[30]。肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor infiltrating lymphocytes, TILs)会表达程序性死亡受体 1(PD-1)^[31],同时,肿瘤细胞也会在自身细胞膜表面表达程序性死亡配体 1(PD-L1),这种特殊的配体与 TILs 上的 PD-1 分子相互结合,发挥了负反馈免疫调节效应的作用,抑制了 TILs 的活化活性,从而使得肿瘤细胞借助免疫逃逸策略而存活。在 TNBC 患者体内,PD-L1 的表达水平呈现出显著性的超越其他分子亚型乳腺癌的趋势^[32],在大部分种类的人类癌症中,PD-L1 表达比率的平均值仅为 0.7%,但是在 TNBC 中,这一比例上升到了 2.0%^[33]。考虑到上述因素,抗 PD-1/PD-L1 的免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors, ICIs)在 TNBC 治疗领域备受关注,已然成为充满巨大潜在潜能的研究热点之一^[34]。

目前临床验证 ICIs 效能的研究证据表明: 1. ICIs 单药因为肿瘤微环境的复杂性在非选择患者中治疗有效率偏低,默沙东 KEYNOTE-119 的研究显示:对于转移性的 TNBC 患者来说,单药使用帕博利珠单抗的客观缓解率(Overall response rate, ORR)不足 5%,对比化疗的患者并没有获得生存期方便的益处,并且治疗成效与 PD-L1 的表达状态没有必然联系^[35]; 2. ICIs 进一步联合化疗手段可能有助于提升治疗收益,但由于各试验研究结果的差异性较大,还需要更多的数据加以明确。

KEYNOTE-522 研究发现在早期三阴乳腺癌患者中,帕博利珠单抗联用单纯新辅助化疗的患者在组织学方面的完全缓解率(Pathologic complete Response, pCR)明显优于安慰剂联合单纯新辅助化疗的相同人群,提示联合化疗策略的有效性,为高危早期 TNBC 的免疫治疗开创了新局面^[36];针对晚期 TNBC 解救治疗的 KEYNOTE-355 研究中提到:在转移性三阴性乳腺癌患者中,帕博利珠单抗联合化疗患者比安慰剂联合化疗患者在无进展生存期(Progression-free survival, PFS)方面有显著改善,并且没有观察到额外的不良反应,这表明了在标准化疗的基础上加入帕博利珠单抗具有一定的有效性^[37];KEYNOTE-35 研究结果与 Impassion130 试验基本一致,该试验显示在紫杉醇中加入阿替利珠单抗作为转移性 TNBC 的一线治疗,带来了 PFS 的显著延长;Impassion 031 研究发现,早期 TNBC 患者在接受阿替利珠单抗与化疗协同治疗后,pCR 的提升幅度十分可观,且治疗整体安全可靠^[38];而 Impassion131 研究发现与单独使用紫杉醇相比,阿替利珠单抗与紫杉醇联合使用并不能改善 PFS 或总生存(Overall survival, OS)^[39],这无疑对阿替利珠单抗的临床应用提出了挑战。

1.5 PD-L1 常用检测手段

在患者接受免疫疗法之前,常规做法是采集组织样本并实施免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)检测,通过带显色剂标记的特异性抗体与细胞结合显色,对肿瘤细胞内 PD-L1 分子的表达水平进行定性定量的分析测定,并根据其结果来评估患者能否从抗 PD-L1 免疫疗法当中获益,以此筛选出适合使用 ICIs 治疗的癌症患者^[40-41]。有研究结果表明患者对免疫治疗的机体反应及副作用与其 IHC 检测结果存在着一定的对应关系,高表达 PD-L1 的患者预后更差,说明 PD-L1 水平能在一定程度上反映出患者预后趋势^[42],但是不同分型的癌症 PD-L1 的表达水平不尽相同^[43]。但是现侵入性的 IHC 检测只能呈现出取材时肿瘤局部样本组织中 PD-L1 的表达水平,无法展现出肿瘤整体 PD-L1 表达情况,以及可能存在的转移灶的 PD-L1 表达情况,也无法实现对整个机体中 PD-L1 表达状态的连续监测^[44]。有研究用 PD-L1 单克隆抗体 SP142、SP263、22C3、28-8 对 38 例非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)患者进行 IHC 检测,其中 19 例患者在四种检测抗体中被判定为阳性结果,5 例的患者判定为阴性,另外 14 例的患者的检测

结果则在 cut-off 值范围内上下波动^[45]。SP263、22C3 和 28-8 在肿瘤细胞中检测 PD-L1 表达一致性较好,而 SP142 在肿瘤中染色与其他三个抗体染色一致性较差。因此,目前 IHC 检测的抗体以及评判阳性的标准尚未形成共识,缺乏足够的前瞻性临床研究证据支持抗体间检测结果互用的可行性,未形成统一标准,也会导致 IHC 检测结果的差异^[46],继而导致能否精确预测病患治疗效果出现偏差。Muenst^[47]等人发现当 PD-L1 在细胞膜上表达时,OS 整体表现较为不佳;而 Li 等人则指出间质的 PD-L1 表达,反而能提高 TNBC 患者的远期生存率^[48]。由此可以看出,即便是运用同一种免疫组化检测方法,诊断试剂盒不同、判读人不同、判读标准不同、判读共识不同,均有可能造成最终结论不同,因此不能简单地将结论之间的分歧归结于免疫组化检测手段的半定量特质上。

在胃癌的免疫治疗中,PD-L1 作为生物标志物在临床现状、检测抗体、组织病理样本、检测过程和判读方面都有许多挑战。因此更多的研究都聚焦于探讨肿瘤突变负荷 (Tumor Mutational Burden, TMB) 这一备受关注的预测疗效标志物。徐瑞华教授领导的团队进行的针对 Her-2 阴性晚期胃癌免疫治疗单药一线治疗研究显示^[49],单药治疗有效,ORR 与二线和三线单药应用对比未看到明显提升。在此过程中,TMB 高的病人其达到了 33.3%,总生存期达到了 14.6 月,对比于 TMB 较低者的客观缓解率为 7.1%,总生存期 4.0 月,有显著提升。然而需要得到重视的是,尽管 TMB 具有潜力,但它同样存在着短板,与 IHC 一样无法精准预测病情,不同的检测平台和不同的阈值难以保证检测公司进行 panel 等效性验证,并且由于 TMB 测试方法较为繁琐且价格不菲,这一点仍需要在实际应用中加以考虑。

随着无创影像学技术的突飞猛进,分子影像已经逐步渗透到肿瘤基础研究和临床诊疗领域,成为不可或缺的重要工具。以 PD-L1 为靶点的成像不仅能清晰地反映出肿瘤转移灶处的 PD-L1 表达状况,同时还能够提供关于 PD-L1 在整个身体内的表达情况的全面资讯。这种非侵入式的检测方式不受肿瘤异质性的干扰,有望成为筛选对 PD-L1 免疫治疗敏感的个体的新型诊断手段^[50-51]。

1.6 传统抗体与纳米抗体

抗体 (Antibody, Ab) 是 B 淋巴细胞接受特定抗原刺激增殖分化为浆细胞后,分泌产生的糖蛋白,能够识别和中和外来物质,具有保护作用。

传统抗体主要由两条重链（Heavy chain, H）和两条轻链（Light chain, L）组成，通过二硫键链接，呈“Y”字型结构，分子大小在 150kDa 左右，图 1-1 为传统抗体 IgG 的示意图。IgG 主要分为抗原结合段（Fragment of antigen binding, Fab）和结晶段（(Fragment crystallizable, Fc），Fab 段由两个可变区（VH/VL）和两个恒定区（CL/CH1）构成，其中重链和轻链的可变区共同组成与抗原结合的部分，称为单链可变区片段（Single-Chain Fragment Variable, ScFv），能够对抗原进行特异性识别。Fc 段由 CH2 和 CH3 构成，与激活免疫应答有关。

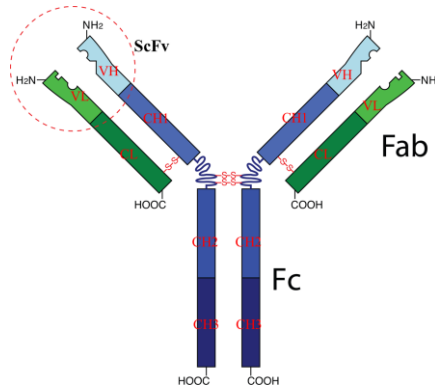


图 1-1 IgG 示意图

Fig 1-1 Schematic of IgG

1993 年，Hamers Casterman 等人^[52]在《Nature》杂志中首次报道了在骆驼血清中存在一种天然缺失轻链的抗体，该抗体只包含一个重链可变区及两个典型的恒定区 CH2 和 CH3，称为重链抗体（Heavy-chain antibodies, HCAs），分子量约 95 kDa，如图 1-2 所示。VHH 是最小的保留完整抗原结合力能力的片段，被称为单域抗体（Single-domain antibodies, SdAb），分子量为 12-15kDa。2003 年，驼类血清中产生的单域抗体被命名为“Nanobody”，即纳米抗体^[53]。

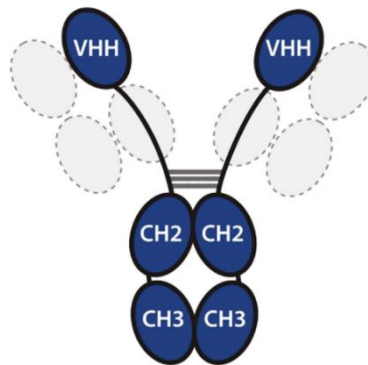


图 1-2 HCAs 示意图

Fig 1-2 Schematic of HCAs

与传统抗体相比，VHH 具有极强的稳定性，在极端条件下有良好的可逆特征^[54]，在 90℃ 高温下长时间处理后的 VHH 仍具有较高活性，能够恢复与抗原结合的能力，而传统抗体则出现了不可逆的高聚现象；VHH 具有高靶向性，VHH 的 CDR3 较长可形成凸型结构，能深入抗原内部从而识别隐藏的表位；VHH 只有一个重链可变区，结构简单，无翻译后修饰，可通过基因工程技术获得单一的基因编码；VHH 分子量小，与抗原结合的表位较少，因此免疫原性低；纳米抗体与人重链抗体的序列同源性很高，在 80% 以上，因此很适合改造为人源化抗体，降低 VHH 抗体作为治疗药物的免疫原性。由于纳米抗体的半衰期短，限制其临床应用，因此可将 VHH 抗体与抗血清白蛋白或抗体的 Fc 段融合表达以延长其在血液中的半衰期。

1.7 荧光染料

荧光染料，大多在其组成结构中包含有苯环或者杂环及共轭双键，是能够在吸收某种特定波长的电磁辐射之后，转化并发出另一种波长光线的物质^[55]。这种特性使其可以用于各种实际应用，包括生物医学实验中的癌症诊断和跟踪研究等。由于在激发状态下，染料所吸收的能量总是高于其随后释放的能量^[56]，这就意味着在激发到放出的过程中存在能量损耗，即当分子处在激发状态时，受激分子可能会通过振动弛豫消耗掉一定的能量，同时，溶剂分子以及与受激分子发生相互作用的分子都会导致一些能量损失，最终使得发光波长相对于入射波长短，这个现象被称作“Stockes 位移”^[57-58]。

荧光染料的定义为一种在获取能源（例如吸收紫外线或可见光能）后，能够将短波长的辐射转化为长波长的可见光进行反射的物质，从而展现出绚烂多彩的颜色效果^[59]。目前，荧光染料已经广泛的运用在诸多领域，其中常见的荧光染料就是荧光素类、菁染料、罗丹明类、香豆素类和氟硼二吡咯类染料等^[60]。

表 1-1 荧光染料的分类

Table 1-1 Classification of fluorescent dyes

种类	名称	分子质量	分子式	优点	缺点
Type	Name	Molecular weight	Molecular formula	Advantage	Drawbacks
	荧光素	332.3	C ₂₀ H ₁₂ O ₅	荧光染料光稳	荧光素类荧光染料

荧光素类 ^[61] Fluoresceins	Fluorescein			定性高、量子产率高、灵敏度高	的有机溶剂毒性导致生物系统破坏； 荧光素通常缺乏细胞膜的通透性，很难与细胞内物质非特异性结合
	异硫氰酸荧光素				
	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	389.4	C ₂₀ H ₁₁ O ₅ ·NCS		
	5-羧基荧光素				
菁类 ^[62] Cyanines	5-carboxy fluorescein	376.3	C ₂₁ H ₁₂ O		摩尔消光系数高、荧光量子产率高以及光稳定性高 ^[63]
	磺化三甲川花菁				
	Sulfo-cyanine 3, sulfo-CY3	630.7	C ₃₁ H ₃₈ N ₂ O ₈ S ₂		
	磺化五甲川花菁				
罗丹明类 ^[64] Rhodamines	Sulfo-cyanine 5, sulfo-CY5	656.8	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₈ S ₂		易发生构象变化，合成困难
	磺化七甲川花菁				
	Sulfo-cyanine 7, sulfo-CY7	682.8	C ₃₅ H ₄₂ N ₂ O ₈ S ₂		
	罗丹明 B Rhodamine B	479.01	C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃	灵敏性高、光稳定好、样品背景干扰小、荧光强度强、成本低	
香豆素类 ^[65] Coumarins	罗丹明 6G Rhodamine 6G	479.01	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₃ Cl		自身表现零荧光或非常弱的荧光、水溶性差、具有细胞毒性、易受背景荧光的干扰、合成成本高、合成路线复杂、污染环境
	香豆素				
	Coumarin	146.1	C ₉ H ₆ O ₂		
氟硼二吡咯类 ^[66] Boron-dipyrromethenes	氟硼二吡咯	191.9	C ₉ H ₇ BF ₂ N ₂	具有较高的荧光量子产率、光和化学稳定性都很好	亲脂性可能会导致与非目标细胞成分非特异性相互作用

1.8 荧光成像

荧光成像研究方法是采用荧光报告基因,例如绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)、红色荧光蛋白(Red Fluorescent Protein, RFP)或 Cyt 及 dyes 等荧光染料进行标记^[67],利用荧光蛋白或染料产生的荧光就可以形成体内的荧光光源,需要外界激发光源的激发才可以捕捉发光信号^[68-69]。传统的动物实验需要获取多个时间点的实验结果,通常实验方法是设置与时间点相同的平行组,然后在不同的时间点对实验动物进行安乐死取样,以便获取实验数据。但是实验动物个体原因、荧光染料注射的时间差都可能造成误差,因此相比之下,体内可见光成像技术能够通过同一组实验对象在不同时间点的机体代谢进行详尽的记录,追踪印记细胞及基因的移动及变换情况,这样得出的数据更为精确可靠^[70-71]。

荧光成像技术的成像原理与光学显微镜完全一致,活体荧光多重成像分析可以对小动物活体状态下的生物过程进行组织、细胞和分子水平的定性和定量研究,作为当前生命科学领域迅速发展并广泛应用的一种活体成像模式,其特点在于不存在电离辐射的过程、信号强度高、成像过程简单^[72]。同时该技术具备良好的成像性能,表现为反应速度快捷,敏感度较高,检测极限值低以及时空分辨率高等诸多方面^[73-74]。并且荧光成像技术能实现对活体组织和器官的解剖构造及其功能的可视化观测,只要保持荧光基团的稳定就能保证荧光标记的蛋白稳定发光,因此也能对肿瘤的复杂的病理生理微环境变化进行动态评估^[75]。综上,荧光成像技术有望在肿瘤的诊断以及手术引导等关键医疗领域发挥出更为重要的作用^[76]。

1.9 常用数据库

以下数据库为抗体构建过程中使用较多的数据库,包括构建前引物序列的设计,构建中位点插入,以及构建后抗体序列的比对。文中因保密未体现序列,仅列出使用数据库以供参考。

1.9.1 TCGA 数据库

癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)是 2006 年由美国的癌症研究所和人类基因组研究所联合一起开展研究癌症的项目。该数据库通过收集

和整理上万个患者的肿瘤样本信息，全面覆盖了各类人类癌症（包括细化的不同亚型）的详尽临床数据，同时也涵盖了基因组变异、mRNA 表达、miRNA 表达、甲基化等丰富数据，使得该数据库成为癌症科研领域不可或缺的数据宝库，对于推动全球范围内的癌症研究事业发展做出了突出贡献^[77]。

1.9.2 GTEx 数据库

基因型-组织表达（Genotype-Tissue Expression, GTEx）数据库汇集了近千名健康人类捐献者样本的转录组测序和基因型分析数据，其样本覆盖了众多不同组织器官部位。这是目前规模空前庞大的人类正常组织器官基因研究项目^[78]。该数据库为科研工作者深入探究人类不同组织特异性基因表达和调控提供了丰厚的遗传信息数据，有助于更深入地剖析人类基因表达水平与遗传变异间的相互作用^[79]。

1.9.3 CCLE 数据库

癌症细胞系百科全书（The Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE）数据库囊括了诸如结肠癌、肝癌、肺癌、胃癌等多种肿瘤的人类癌细胞系，总计超过上千株。此外，还包括基因表达、体细胞突变、甲基化谱、蛋白质表达谱、代谢谱、拷贝数等全方位多组学数据，这使得 CCLE 数据库成为了构建完善且系统的人癌细胞系研究平台的翘楚，为癌症研究及抗癌药物研发提供了极其重要的辅助^[80]。

1.9.4 Uniprot 数据库

Uniprot（Universal Protein）数据库是存储蛋白质序列、功能信息以及相关研究论文索引的权威数据库之一^[81-82]，整合了包括 EBI（European Bioinformatics Institute），SIB（the Swiss Institute of Bioinformatics），PIR（Protein Information Resource）三大数据库的资源，Uniprot 是全球基因研究学者必备的研究利器。EBI（European Bioinformatics Institute）^[83]：欧洲生物信息学研究所（EMBL-EBI）是欧洲生命科学旗舰实验室 EMBL 的一部分，该机构位于英国剑桥欣克斯顿惠康基因组校园内，已被公认为是全球基因组学领域的卓越代表。SIB（the Swiss Institute of Bioinformatics）^[84]：坐落于瑞士日内瓦的 SIB 负责维护 ExPASy（专家蛋白质分析系统）服务器，所有关于蛋白质组学工具和数据库的关键资源均由这里提供。PIR（Protein Information Resource）^[85]：PIR 自 1984 年由美国国家生物医学研究基金

会设立以来，始终致力于协助科研人员解读和理解蛋白质序列信息。

1.10 目的和意义

分子影像在肿瘤诊断方面具有重要意义。在细胞癌变的过程中，PD-L1 分子水平会发生变化，并且可以被靶向检测到，为早期肿瘤检测提供了依据^[86]；并且分子影像不需要进行侵入性操作就可以检测肿瘤的状态，对药物应答情况和治疗效果有很好的监测效果。但是目前大部分分子影像的探针并不会特异性识别恶性肿瘤细胞，而是根据肿瘤细胞不同的功能和内环境进行识别，如目前广泛应用的示踪剂¹⁸F-FDG 就是根据肿瘤细胞和正常细胞在糖摄取上的代谢差异而识别肿瘤的^[87]。

分子影像是指导肿瘤切除手术的重要方式。肿瘤切除主要依赖白光进行手术，这就对正常组织和异常组织的边界区分有限^[88]，若是术后存在较多残留的肿瘤细胞，会使得患者或者患犬预后差、术后生存期缩短。目前术中判断残留肿瘤细胞最常见的方式是组织活检，也存在结果不准确或等待时间较长的问题，因此发展了分子影像技术以期解决这些问题，如显微成像系统可以基于肿瘤组织内源性对比剂或者自发荧光来确定肿瘤边界^[89]。

但是更有应用前景的是外源光学成像技术，该技术使肿瘤细胞在使用较低浓度的荧光染料时可以被准确检测，而靶向性的探针能够增强对肿瘤细胞的特异性标记。针对肿瘤患者或患犬，早发现、早诊断、早治疗，术中安全完整切除肿瘤，术后预后好、生存质量提高，就是本文的意义所在。

第二章 PD-L1 重组抗体的制备

骆驼 PD-L1 免疫纳米抗体文库,是以 PD-L1 作为抗原,经过足够时长的免疫,采用骆驼血液中 PBMC 细胞为起始材料构建的。文库中序列多样性良好,结合成熟的噬菌体展示技术将纳米抗体体外展示,可以作为一种针对 PD-L1 的通用抗原筛选平台。本章在现有的骆驼免疫库中,进行筛选、重组、表达、验证,以期获得能与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有高亲和力的 PD-L1 抗体。

2.1 材料与方法

2.1.1 主要生物材料

表 2-1 实验主要生物材料

Table 2-1 Experimental primary biological material

材料名称	来源
HEK293F 细胞	ATCC 细胞库
人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞	ATCC 细胞库
骆驼免疫抗体库	成都盛世君联
5 α F' 菌	NEB
辅助噬菌体	NEB
大肠杆菌	实验室自有
质粒载体	金斯瑞

2.1.2 主要仪器

表 2-2 实验所用主要仪器

Table 2-2 Main instruments used in the experiment

仪器名称	生产厂家
-86°直立式超低温冰箱	海尔
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo
快速恒温水箱	上海一恒科学仪器有限公司

表 2-2 实验所用主要仪器续表

Table 2-2 Major Instruments Used in the Experiment Continued

仪器名称	生产厂家
CO ₂ 恒温振荡器	CRYSTAL
恒温摇床	CRYSTAL
倒置显微镜	上海光学仪器一厂
倒置荧光显微镜	Olympus
生物安全柜	Thermo
通风橱	Thermo
洁净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
纯水仪	四川优普超纯科技有限公司
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
台式离心机	Thermo
流式细胞仪	BACKMAN
电泳仪	天能
压力灭菌锅	致微（厦门）仪器有限公司
电子天平	赛多利斯
PH 计	奥豪斯仪器（常州）有限公司
移液器	Eppendorf
酶标仪	Thermo
PCR 仪	Applied biosystems®
微量分光光度计	杭州奥盛仪器有限公司
漩涡振荡仪	IKA® VORTEX GENIVS
磁力搅拌器	SCILOGEX
Zeba 离心式脱盐柱	Thermo
30kD 超滤管	Meck
细胞成像仪	life technologies™
细胞计数仪	invitrogen by thermo fisher scientific
超声波清洗机	深圳市洁盟清洗设备有限公司

2.1.3 主要试剂

表 2-3 实验所用主要试剂

Table 2-3 Main reagents used in the experiment

试剂名称	生产厂家
OPM-293 CD05 培养基	上海奥浦迈生物科技有限公司
OPM-CHO PFF05	上海奥浦迈生物科技有限公司
quickBlue 快速染胶液	北京博奥龙免疫技术有限公司
TEMED	sigma
无内毒素质粒小提中量试剂盒	TIANGEN
RPMI 1640	Gibco
PS	生工
0.25%胰蛋白酶	Gibco
FBS	Gibco
PBS	Biosharp
1.5M Tris-HCl	Solarbio
DMSO	Sigma
三乙胺	生工
IPTG	生工
无水乙醇	生工
DyLight™ 800 NHS 酯	Thermo
DMF	Thermo
4%多聚甲醛	生工
PVA	Sigma-ALDRICH
2YT	Starmetre
四环素	BBI
羧苄青霉素	BBI
卡那霉素	BBI
TWEEN 20	VWR

2.1.4 溶液配制

2.1.4.1 细胞完全培养基

取 50mL 规格一次性离心管，放置于细胞超净工作台管架上，用移液器将 RPMI1640 不完全培养基进行分装，单个离心管内装有 45mL 培养基，加入 5mL 胎牛血清和 0.5mL 青霉素-链霉素双抗混合溶液，混合均匀后密封避光储存于 4° C 冰箱内，即含 10% FBS + 1% PS 的细胞完全培养基。

2.1.4.2 细胞冻存液

根据待冻存细胞量配制细胞冻存液，全过程于细胞超净工作台内进行，并按 50%的 RPMI1640 培养基 + 10%的 DMSO + 40%的胎牛血清比例混合，现配现用。

2.1.4.3 电泳过程溶液配制

(1) 电泳缓冲液（1000mL 配方）

表 2-4 电泳缓冲液配制

Table 2-4 Electrophoresis buffer preparation

试剂	质量	终浓度
甘氨酸（Gly）	14.4g	192mM
Tris	3.0g	25mM
SDS	1.0g	0.1%

(2) 考马斯亮蓝染色液（1000mL 配方）

表 2-5 考马斯亮蓝染色液配制

Table 2-5 Preparation of Kaomas Brilliant Blue Staining Solution

试剂	质量
考马斯亮蓝 R250	1.0g
甲醇	450mL
冰醋酸	100mL

(3) 脱色液 (1000mL 配方)

表 2-6 脱色液配制

Table 2-6 Preparation of decolourising solution

试剂	质量
甲醇	100mL
冰醋酸	100mL

(4) 分离胶配置 (总体积为 10mL)

表 2-7 分离胶配制

Table 2-7 Separation Gel Preparation

胶浓度	6%	8%	10%	12%	15%
水	5.3mL	4.6mL	4.1mL	3.3mL	2.3mL
30% Acr/Bis	2.0mL	2.7mL	3.3mL	4.0mL	5.0mL
1.5M Tris (pH8.8)	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL
10% SDS	0.1mL	0.1mL	0.1mL	0.1mL	0.1mL
10% APS	0.1mL	0.1mL	0.1mL	0.1mL	0.1mL
TEMED	8μL	6μL	6μL	4μL	4μL

(5) 浓缩胶配置 (总体积为 4mL)

表 2-8 浓缩胶配制

Table 2-8 Concentrated Gel Preparation

胶浓度	5%
水	2.6mL
30% Acr/Bis	1.0mL
0.5M Tris (pH6.8)	1.3mL
10% SDS	50μL
10% APS	50μL
TEMED	4μL

(6) 不同浓度分离胶的最佳分离范围

表 2-9 不同浓度分离胶的最佳分离范围

Table 2-9 Optimal separation ranges for different concentrations of separating gels

分离胶浓度	最佳分子大小
6%	50~150kD
8%	30~90kD
10%	20~80kD
12%	12~60kD
15%	10~40kD

(7) 1× TEA 配制

分别称取 15.1g Tris, 94g 甘氨酸, 5g SDS 于 1L 烧杯中, 加入 800mL ddH₂O 搅拌溶解后, 定容至 1L, 配制为 5× running buffer, 使用前取 ddH₂O 按比例稀释为 1× 使用。

(8) SDS-PAGE loading buffer (还原)

250mM Tris-HCl(PH6.8), 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 5% β-巯基乙醇 配制为 5mL, 1mL 每支分装冻存于-20℃。

(9) SDS-PAGE loading buffer (非还原)

250mM Tris-HCl(PH6.8), 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 配制为 5 mL , 1 mL 分装冻存于-20℃。

2.1.5 肿瘤细胞株

本实验过程中所使用的 HEK293F 细胞和人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞均来自于 ATCC 细胞库。

2.1.6 试验方法

2.1.6.1 以 PD-L1 为靶点筛选骆驼免疫库

(1) 固相筛选骆驼免疫库

首先使用 PDL1-Fc 为抗原, 对骆驼免疫库进行第 1 轮固相筛选; 再用 PDL1-his 为抗原, 对第一轮筛选得到的骆驼免疫库单克隆进行第 2-3 轮固相筛选。

实验第一天,将目标抗原蛋白加入 96 孔板,每个蛋白包被 8 个孔,每个孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$, 包被过夜;实验第二天,去除 96 孔板里的包被液,每孔加入 200 μL 的封闭液,室温 (20-30 $^{\circ}\text{C}$) 下,在 3D 旋转振荡器上孵育 2 h;倒扣去除封闭液,每孔用 200 μL PT 清洗 4 次,往抗原孔和对照孔中加入 100 μL 的噬菌体抗体库(保证 OD260 的值为 2.0 抗体库),室温 (20-30 $^{\circ}\text{C}$) 下,在 3D 旋转振荡器上孵育 2 h;弃除抗体库液体,每孔加入 200 μL PT,清洗 8 次,拍干;向孔中加入 100 μL 100 mM HCL,室温 (20-30 $^{\circ}\text{C}$) 下,在 3D 旋转振荡器上孵育 5 min;与 HCl 反应 5 min 结束后,将抗原孔和对照孔的液体分别转移至提前准备的 EP 管里中和 PH,混匀;将获得的噬菌体加入到 1mL 含 NEB 5 α F' 菌的 EP 管中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm, 孵育 1 h;在 EP 管中加入 1×10^{10} 个/mL 辅助噬菌体, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm, 孵育 1 h;EP 管中取适量液体,使用 PBS 进行梯度倍数稀释,在含有 Carb 抗性和 Kan 抗性的 LB 固体双抗平板上进行滴度实验,完成滴板后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱过夜;实验第三天统计噬菌体富集程度。

(2) 细胞筛选骆驼免疫库

使用阴性细胞和阳性细胞对固相筛选中第 3 轮筛选得到的骆驼免疫库单克隆进行细胞筛选。

取两份 5×10^6 个阴性细胞, 300 g, 3 min 离心去除上清液,用 1 mL PT 重悬清洗并重复 2 次,各加 100 μL 抗体库混合 (OD260 值为 2.0),加入预冷的 PBS 补足 500 μL /管, 4 $^{\circ}\text{C}$, 翻转仪翻转孵育 2 h; 300 g, 3 min 离心取抗体库上清,将抗体库上清均分为 2 管,分别与 5×10^6 个阳性组和 5×10^6 个阴性组结合,加入预冷的 PBS 补足 500 μL /管, 4 $^{\circ}\text{C}$, 翻转孵育 2 h; 300 g, 3 min 离心去除上清液,用 1 mL PT 重悬清洗并重复 6 次,然后将细胞沉淀转移到一个新的 EP 管中,再用 PBS 清洗 2 次, 300 g, 3 min 离心去除上清,最后保留细胞沉淀;使用 1mL 的 NEB 5 α F' 菌重悬获得的细胞沉淀, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm, 摇床孵育 1 h;在 EP 管中加入 1×10^{10} 个/mL 辅助噬菌体, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm, 孵育 1 h;EP 管中取适量液体,使用 PBS 进行梯度倍数稀释,在含有 Carb 抗性和 Kan 抗性的 LB 固体双抗平板上进行滴度实验,完成滴板后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱过夜;实验第二天统计噬菌体富集程度。

(3) Phage ELISA

目的是为了检测噬菌体抗体与目的抗原的亲合力。

实验第一天,将目标抗原蛋白和对照蛋白加入 96 孔板,每个孔 100 μL , 4℃, 包被过夜; His 标签抗原设立空白对照板, 1%BSA 包被+1%PVA 封闭, 1%PVA 对照, 置于 4℃过夜; 向 96 孔深孔板加入 2YT/Carb/kan 溶液, 每孔 450-600 μL , 用枪头挑取富集单克隆, 置于 96 孔深孔板里, 挑取结束后, 封闭好深孔板上盖, 37℃, 220 rpm, 过夜培养; 实验第二天, 将 96 孔板倒扣去除蛋白上清, 每孔加入 200 μL 的 1%PVA 封闭液, 室温下, 在 3D 旋转振荡器上封闭 2 h; ELISA 板子去上清, 每孔用 200 μL PT 清洗 3 遍, 拍干残余液体; 将深孔板取出, 于酒精灯旁将 96 深孔板中的枪头挑取丢掉, 盖上深孔板上盖, 置于离心机内 4000 r/min, 离心 10 min; 取噬菌体上清, 每孔加入 50 μL , 室温 (20-30℃) 下, 在 3D 旋转振荡器上摇晃 2 h; 96 孔板每孔加入 HRP-M13 抗体 100 μL , 室温 (20-30℃) 下, 在 3D 旋转振荡器上摇晃 1 h; 清洗 96 孔板, 每孔用 PT 清洗 3 遍, 再用 PBS 清洗 3 遍, 拍干残余液体; 每孔加入 100 μL TMB, 观察显色, 37℃, 10 min; 每孔加入 1 M 磷酸 50 μL 终止, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值; 挑取阳性克隆 (目标抗原结合 OD450: 阴性抗原结合 OD450 ≥ 2 的克隆) 编号送测序。

2.1.6.2 PD-L1 重组抗体质粒提取与表达

(1) 质粒提取

使用 Tiangen 无内毒素质粒小提中量试剂盒 (货号: DP118-02) 提取质粒, 具体步骤参照试剂盒说明书。

(2) Expi293F 细胞复苏与传代

取一支 15mL 规格的离心管, 放置于细胞超净工作台管架上, 加入 9mL OPM-293 CD05 完全培养基备用; 将 Expi293F 细胞冻存管从液氮中取出, 用持针镊夹稳管帽, 立即转入 37℃ 水浴锅中, 轻微摇动, 待冻存冰晶融化至绿豆大时 (约 1-1.5 分钟), 取出冻存管, 用 75% 酒精喷洒消毒后, 擦拭干净转移至细胞超净工作台里; 将细胞悬液转移至复苏前准备的装有 9mL OPM-293 CD05 完全培养基的离心管中, 250 g, 3min 离心; 用吸引器吸去上清, 轻轻敲击离心管底, 然后加入 12mL OPM-293 CD05 完全培养基重悬细胞; 轻柔吹打混匀细胞悬液, 将所有细胞悬液转移至 50mL 无菌摇瓶中, 放入 37℃, 5% CO₂, 120rpm CO₂ 恒温振荡器中培养。

复苏细胞第二天, 计数细胞存活率及细胞密度, 细胞存活率 $\geq 90\%$, 直接传代,

传代浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ ；若细胞存活率 $< 90\%$ ，需离心换液，将全部细胞悬液用移液管转移至 15mL 离心管中，250 g，3min 离心，吸引器吸去上清，加入 12mL OPM-293 CD05 完全培养基重悬细胞，小心混匀细胞悬液，将所有细胞悬液转移至新的 50mL 无菌摇瓶中，放入 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ ，120rpm CO_2 恒温振荡器培养，隔天传代。之后均隔天传代。Expi293F 细胞正常接种浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ ，22-26h 增殖 1 倍。最好隔天进行一次传代培养。控制细胞浓度不超过 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。若要进行瞬转表达，需控制细胞于 3-30 代之间。

(3) Expi293F 细胞冻存

冻存前一天，取正常培养的 Expi293F 细胞，用 30mL OPM-293 CD05 完全培养基调整细胞密度为 $7 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 100mL 无菌摇瓶中，使冻存当天的细胞密度不超过 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ， 37°C ，120rpm， $5\% \text{CO}_2$ 培养。冻存当天，首先将程序降温盒提前 1h 放入 -20°C 冰箱；配制新的冻存液：取 4mL OPM-293 CD05 完全培养基于 15mL 离心管中，缓慢滴加 1mL DMSO。配制成含 20% DMSO 的 OPM-293 CD05 冻存液，放入 4°C 备用；用 10mL 移液管，小心吹打 Expi293F 细胞 5-7 次，用台盼蓝计数细胞浓度及存活率，细胞存活率需大于 94%。根据冻存需要取相应数量细胞悬液于 50mL 离心管中，250 g，3min 离心；用吸引器吸去上清，加入 OPM-293 CD05 完全培养基重悬细胞，使细胞密度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$ ，混匀，加入相同体积的 20% DMSO 的 OPM-293 CD05 冻存液，混匀。使细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，DMSO 含量为 10%；以 1mL/管将细胞悬液分装于冻存管中，将冻存管放于程序降温盒中；程序降温盒放置于 -80°C ，24h 后将细胞转移至液氮中长期保存。

(4) Expi293F 细胞转染

取 Expi293F 细胞，用台盼蓝计数，细胞活率在 94% 以上，调整细胞密度为 1.5×10^6 个/mL，50mL。将配制好的转染试剂-DNA 溶液加入准备的细胞中，细胞于 37°C ，120rpm， $5\% \text{CO}_2$ 环境中培养。

(5) 添加补料

转染当天记为第 0 天，分别于 day1（转染后 24h）、day3、day5 计数细胞浓度和存活率，并于 day1、day3、day5 加入表达总体积 5% 的 OPM-CHO PFF05 补料。

(6) 蛋白纯化

将转染后的细胞悬液转移至 50mL 离心管中，水平离心机 5000g，离心 10min，

取上清。将上清转入干净离心瓶中，加入等体积的 Protein A 平衡结合液颠倒混匀，然后加入处理好的 Protien A 树脂，置于震荡器上室温结合 2-3h。准备层析柱，将样品陆续加入，收集与 Protien A 树脂结合的蛋白，使未结合 Protien A 树脂的上清液从下端流出；待全部上清通过层析柱后，用 10mL 预冷的 Protien A 平衡液轻轻冲洗离心管 3 次，确保收集到所有蛋白；待所有上清都已经通过层析柱后，用 8mL 预冷的 Protien A 洗涤液冲洗树脂；加入 1mL 预冷 Protien A 洗脱液润洗树脂填料并收集到 15mL 一次性离心管中，再向树脂填料中加入 2mL 预冷 Protien A 洗脱液，于 4℃颠倒振荡 10min，重复三次，使得洗脱充分；收集流出的洗脱液，初测蛋白产量。

(7) 蛋白 Buffer 置换

将 Protein A 纯化的蛋白 PH 调整至中性附近，在生物安全柜中无菌操作将蛋白溶液移入已处理好的超滤管中，加入置换 buffer 将液体补足至超滤管最高刻度处，水平离心机 3000rpm，20-30min 离心；离心结束将超滤管移入生物安全柜，无菌操作收集滤液，再次加入置换液至刻度处，水平离心机 3000rpm，20-30min 离心；重复操作，确保置换倍数达到 500 倍；多次超滤置换后，最后一次离心，根据最开始添加蛋白总量，添加置换 buffer，控制蛋白浓度控制在>1mg/mL，无菌操作将超滤管膜上液体收集至 1.5mL EP 管中；检测蛋白浓度。

(8) 蛋白 SDS-PAGE 检测

定量取出所需验证的蛋白各两份，一份加入 Loading buffer (R)，一份加入 Loading buffer (NR)，PCR 仪 98℃处理 10min；将胶板固定好放置于电泳槽内，在电泳内槽加入全新 Running buffer 至满液，电泳外槽加入回收 Running buffer 到电泳槽中等位点，将梳子垂直缓慢拔出；将处理好的蛋白样品依次匀速点入孔内；点样完毕后，插上电源开始电泳，调整电压为 80V，压胶 30min，压胶至所有的样品在一条直线上即为压胶完成；分离胶浓度在 6-8%，调整电压为 100V，持续观察至预染液到分离胶底部，停止跑胶；电泳结束从电泳槽中将玻板取出，撬板放置于玻板缝隙间，轻轻撬开玻板，用撬板将胶轻轻切下，移入染胶盒进行染色；倒入染胶液，使胶完全浸泡于染胶液，放置于匀速摇床上，染色 1h；将染胶液倒出，加入 ddH₂O 洗涤掉多余染色液，再加入清水浸泡过夜。

2.1.6.3 对获得的 PD-L1 纳米抗体进行 FACS 验证

控制 MDA-MB-231 细胞融合度在 70%-80%，加入 2mL 0.25%胰蛋白酶消化液，使细胞全部浸润于 0.25%胰蛋白酶消化液中，消化 1-3min，于倒置显微镜下观察，待细胞间隙变大、细胞趋于圆形但未漂起时弃去胰酶，加入等体积的完全培养基（DMEM+10%FBS）终止胰酶反应，300 g、3min 离心去除胰酶，用 2mL 完全培养基重悬细胞并计数，按所需细胞总数取对应体积的细胞悬液于 15mL 一次性离心管中，加入 PBS 稀释至 10mL，300 g、3min 离心，重复洗涤 3 次。293F 阴性细胞、MDA-MB-231 阳性细胞均以 3×10^5 个细胞/Test，100 μ L/Test，分组于 96 孔 U 型板中，300 g、3min 离心，吸去上清，用含 10% FBS 的 PBS，封闭 30min，300 g、3min 离心，吸去上清，重复洗涤 2 次；待检测 PD-L1 抗体按 0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL 浓度，100 μ L/Test 稀释，4 $^{\circ}$ C，孵育 45min；200 μ L 每孔加入预冷含 1%FBS 的 PBS，300g、3min 离心洗涤 4 次，吸去上清；选择 Juckson 的 Fluorescein (FITC) AffiniPure Gost Anti-Alpaca IgG VHH domain 作为二抗，1:200 稀释，100 μ L/Test，4 $^{\circ}$ C孵育 45min；加入预冷含 1%FBS 的 PBS 200 μ L/Test，300g、3min 离心洗涤 5 次，吸去上清；加入 PBS 300 μ L/Test 重悬，转移到流式管中上机检测。

2.1.6.4 DyLight 800 NHS 酯荧光标记 PD-L1 纳米抗体

(1) 标记蛋白

取适量待标记蛋白于 1.5mL EP 管中，加入适量的 DyLight™ 800 NHS 酯。混合均匀后，避光室温孵育一小时。通过脱盐处理或使用透析法除去蛋白质中游离的 DyLight™ 800 NHS 酯染料，确保荧光标记的抗体中无非特异性结合。

表 2-10 DyLight NHS 酯染料的特性
Table 2-10 Properties of the DyLight NHS-Ester Dyes

DyLight Dye	Protein(mg/mL)	Molar-fold Excess	Protein(mg/mL)	Molar-fold Excess
350	<2-5	12.5-15	≥ 5	10
405	<2-5	10-12.5	≥ 5	7.5
488	<2-5	10-15	≥ 5	8
550	<5	10-15	≥ 5	8
594	<5	5-10	≥ 5	8

表 2-10 DyLight NHS 酯染料特性续表
Table 2-10 Properties of the DyLight NHS-Ester Dyes Continued

DyLight Dye	Protein(mg/mL)	Molar-fold Excess	Protein(mg/mL)	Molar-fold Excess
633	<5	10-12.5	≥5	7.5
650	<5	7	≥5	4
680	<5	5-8	≥5	6-7
755	<5	5-10	≥5	6-7
800	<5	5-8	≥5	6-7

DyLight™ 800 NHS 酯的使用量需要严格按照标记蛋白的浓度和摩尔质量来计算:

- ① Calculate amount (mg) of DyLight NHS Ester Dye to be added to the labeling reaction:

$$\frac{\text{amount of protein (mg)}}{\text{MW of protein}} \times 10 \times \text{MW of fluor} = \text{mg of fluor}$$

- 10 = Molar-fold excess of the NHS-ester dye to protein

- ② Calculate microliters of NHS-ester dye solution to add to the reaction:

$$\text{mg of fluor (calculation \#1)} \times \frac{100 \mu\text{L}}{1 \text{mg}} = \mu\text{L NHS-ester fluor solution at 10 mg/ml}$$

- 100μL = Solvent volume in which the 1mg of NHS-ester dye is dissolved.

- ③ Example Calculation:

For 1mL of a 2mg/mL solution of IgG (150,000 MW), 13.9μL of DyLight 800 NHS Ester (10mg/mL) will be used.

$$\frac{2 \text{ mg IgG}}{150,000 \text{ MW}} \times 10 \times 1040.06 = 0.139 \text{ mg of DyLight 800 NHS Ester}$$

$$0.139 \text{ mg of DyLight 800 NHSEster} \times \frac{100 \mu\text{L}}{1 \text{mg}} = 13.9 \mu\text{L of DyLight 800 NHSEster}$$

- (2) 标记蛋白 SDS-PAGE 检测

同第二章“2.1.6.2(8)”。

2.1.7 统计与分析

流式细胞仪器的数据采集及分析由 CytExpert 完成。

2.2 结果与分析

2.2.1 以 PD-L1 为靶点筛选骆驼免疫库

如图 2-1 到，进行三轮靶点 PD-L1 固相筛选骆驼免疫库，蛋白孔与 PVA 孔；进行一轮细胞筛选，结果如图 2-3 所示，阳性细胞 MDA-MB-231 孔与阴性细胞 HEK293F 孔菌落数数量之比大于 5；表示成功从骆驼免疫库中筛选获得了对 PD-L1 有亲和力的 phage 库。

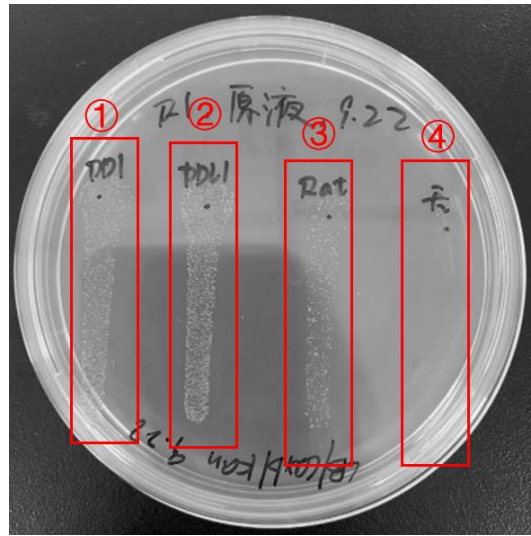


图 2-1 三轮靶点 PD-L1 固相筛选骆驼免疫库（第一轮）

Fig 2-1 Three rounds of target PD-L1 solid-phase screening camel immunobanks (first round)

（图注：图为第一轮固相筛选结果，①是以免疫后骆驼库 PD-1 为靶点，②是以免疫后骆驼库 PD-L1 为靶点，③是大鼠免疫库，④是骆驼天然抗体库；从这四种免疫库的富集程度来分析，可得出 PD-L1 靶点为阳性的结论。）

(Figure Note: The figure shows the first round of solid-phase screening results, ①Targeting PD-1 from the immunised camel library, ②Targeting PD-L1 from the immunised camel library, ③The rat immune library, ④The natural antibody library of the camel; analysing the degree of enrichment of these four immune libraries, it can be concluded that the PD-L1 target is positive.)

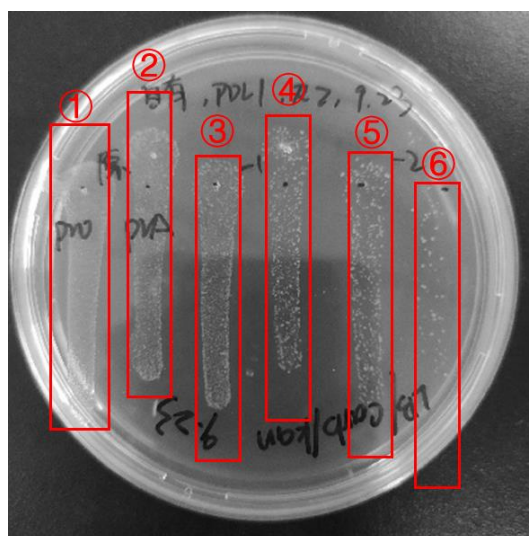


图 2-2 三轮靶点 PD-L1 固相筛选骆驼免疫库（第二轮）

Fig 2-2 Three rounds of target PD-L1 solid-phase screening camel immunobanks (second round)

（图注：图为第二轮固相筛选结果，以骆驼免疫库 PD-L1 为靶点继续进行筛选。①为蛋白孔，滴板浓度 1×10^{13} 个/mL，②为 PVA 孔，滴板浓度 1×10^{13} 个/mL，③为蛋白孔，滴板浓度 1×10^{12} 个/mL，④为 PVA 孔，滴板浓度 1×10^{12} 个/mL，⑤为蛋白孔，滴板浓度 1×10^{11} 个/mL，⑥为 PVA 孔，滴板浓度 1×10^{11} 个/mL；蛋白孔富集程度大于 PVA 孔。）

(Figure Note: The figure shows the second round of solid-phase screening results, which was continued with the camel immunobank PD-L1 as the target. (1)Protein wells, drop plate concentration 1×10^{13} /mL, (2) PVA wells, drop plate concentration 1×10^{13} /mL, (3)Protein wells, drop plate concentration 1×10^{12} /mL, (4)PVA wells, drop plate concentration 1×10^{12} /mL, (5)Protein wells, drop plate concentration 1×10^{11} /mL, (6)PVA wells, drop plate concentration 1×10^{11} /mL; Protein wells were enriched to a greater extent than PVA wells.)

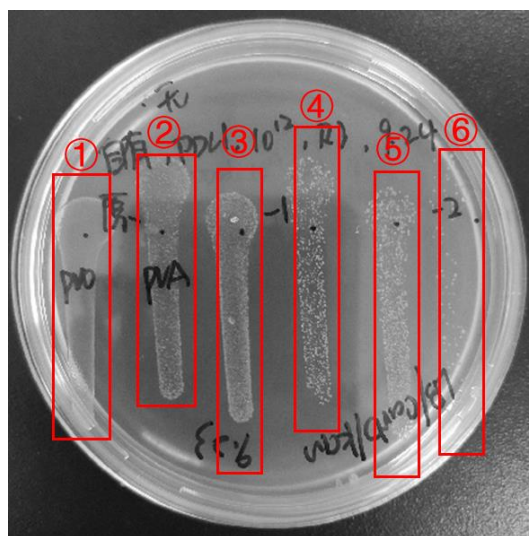


图 2-3 三轮靶点 PD-L1 固相筛选骆驼免疫库（第三轮）

Fig 2-3 Three rounds of target PD-L1 solid-phase screening camel immunobanks (third round)

(图注: 图为第三轮固相筛选结果, 以骆驼免疫库 PD-L1 为靶点继续进行筛选。①为蛋白孔, 滴板浓度 1×10^{13} 个/mL, ②为 PVA 孔, 滴板浓度 1×10^{13} 个/mL, ③为蛋白孔, 滴板浓度 1×10^{12} 个/mL, ④为 PVA 孔, 滴板浓度 1×10^{12} 个/mL, ⑤为蛋白孔, 滴板浓度 1×10^{11} 个/mL, ⑥为 PVA 孔, 滴板浓度 1×10^{11} 个/mL; 蛋白孔富集程度大于 PVA 孔。)

(Figure Note: The figure shows the second round of solid-phase screening results, which was continued with the camel immunobank PD-L1 as the target. (1)Protein wells, drop plate concentration 1×10^{13} /mL, (2) PVA wells, drop plate concentration 1×10^{13} /mL, (3)Protein wells, drop plate concentration 1×10^{12} /mL, (4)PVA wells, drop plate concentration 1×10^{12} /mL, (5)Protein wells, drop plate concentration 1×10^{11} /mL, (6)PVA wells, drop plate concentration 1×10^{11} /mL; Protein wells were enriched to a greater extent than PVA wells.)

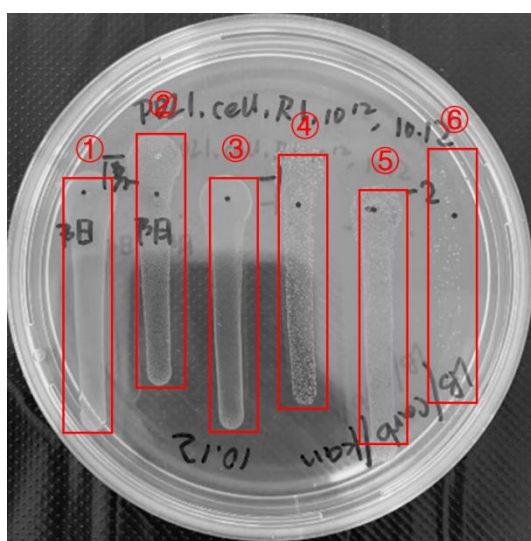


图 2-4 靶点 PD-L1 细胞筛选骆驼免疫库

Fig 2-4 Targeted PD-L1 Cell Screening Camel Immunobanks

(图注: 图为细胞筛选结果, 以骆驼免疫库 PD-L1 为靶点进行筛选。①为阳性细胞 MDA-MB-231, 滴板浓度 1×10^{13} 个/mL, ②为阴性细胞 HEK293F, 滴板浓度 1×10^{13} 个/mL, ③为阳性细胞 MDA-MB-231, 滴板浓度 1×10^{12} 个/mL, ④为阴性细胞 HEK293F, 滴板浓度 1×10^{12} 个/mL, ⑤为阳性细胞 MDA-MB-231, 滴板浓度 1×10^{11} 个/mL, ⑥为阴性细胞 HEK293F, 滴板浓度 1×10^{11} 个/mL; 阳性细胞 MDA-MB-231 孔富集程度明显大于阴性细胞 HEK293F 孔; 细胞 PD-L1 靶点有亲和力细胞 PD-L1 靶点有亲和力。)

(Figure Note: The figure shows the results of cell screening with the camel immunobank PD-L1 as the target. ①Positive cell MDA-MB-231, drop plate concentration 1×10^{13} /mL, ②Negative cell HEK293F, drop plate concentration 1×10^{13} /mL, ③Positive cell MDA-MB-231, drop plate concentration 1×10^{12} /mL, ④Negative cell HEK293F, drop plate concentration 1×10^{12} /mL, ⑤Positive cell MDA-MB-231, drop plate concentration 1×10^{11} /mL, ⑥Negative cell HEK293F, drop plate concentration 1×10^{11} /mL; positive cell MDA-MB-231 wells were significantly more enriched than negative cell HEK293F wells; cell PD-L1 targets had affinity cell PD-L1 targets had affinity)

随机挑选 96 个单克隆种入 96 孔板中，以 PD-L1 和 BSA 分别铺板 48 个孔，得到 Phage ELISA 结果如表 2-12 所示，表中红框数据为 96 孔板中显色程度较高的孔，表明该孔的单克隆与目的 PD-L1 抗原有一定的亲和力，阳性克隆送测序的结果因涉及保密内容，未进行展示。

表 2-11 Phage ELISA 结果
Table 2-11 Phage ELISA Results

PDL1 单克隆 OD450 数值						BSA（阴性）单克隆 OD450 数值					
0.700	0.251	0.908	1.541	0.607	0.261	0.231	0.103	0.236	0.471	0.159	0.107
0.731	0.169	0.900	0.703	0.489	0.487	0.175	0.121	0.112	0.219	0.104	0.223
0.681	0.607	0.334	0.830	1.957	0.711	0.163	0.169	0.184	0.214	0.169	0.364
0.683	0.314	0.759	0.720	0.514	0.599	0.176	0.105	0.187	0.178	0.111	0.253
0.717	0.589	0.698	0.515	1.597	0.615	0.213	0.202	0.165	0.105	0.601	0.307
0.559	0.629	0.707	0.618	1.392	0.564	0.172	0.201	0.189	0.182	0.571	0.314
0.264	0.798	0.739	0.126	0.618	0.611	0.181	0.204	0.172	0.129	0.184	0.336
1.532	0.863	1.399	0.591	1.079	0.797	0.768	0.325	0.754	0.215	0.405	0.363

2.2.2 PD-L1 重组纳米抗体的表达

将获得的 10 个 Unique 序列，扩增 VHH 片段，插入到 pVHH-hIgG1Fc 表达质粒载体中，构建 VHH-hIgG1 Fc 抗体重组表达质粒。图 2-5 为试剂盒提取质粒结果，10 个重组抗体的分子量均在 50-70kDa，符合携带 hFc 标签后的分子大小，质粒构建成功，可进行表达。

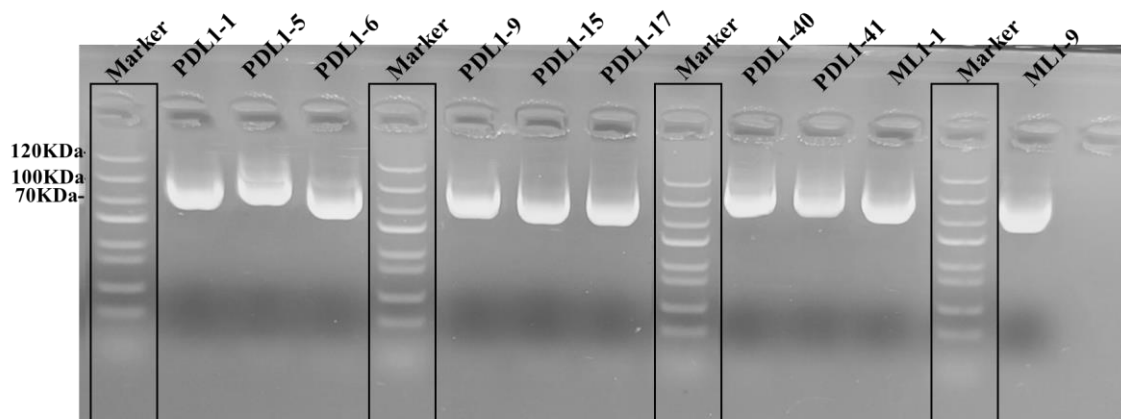


图 2-5 质粒提取结果

Fig 2-5 Plasmid extraction results

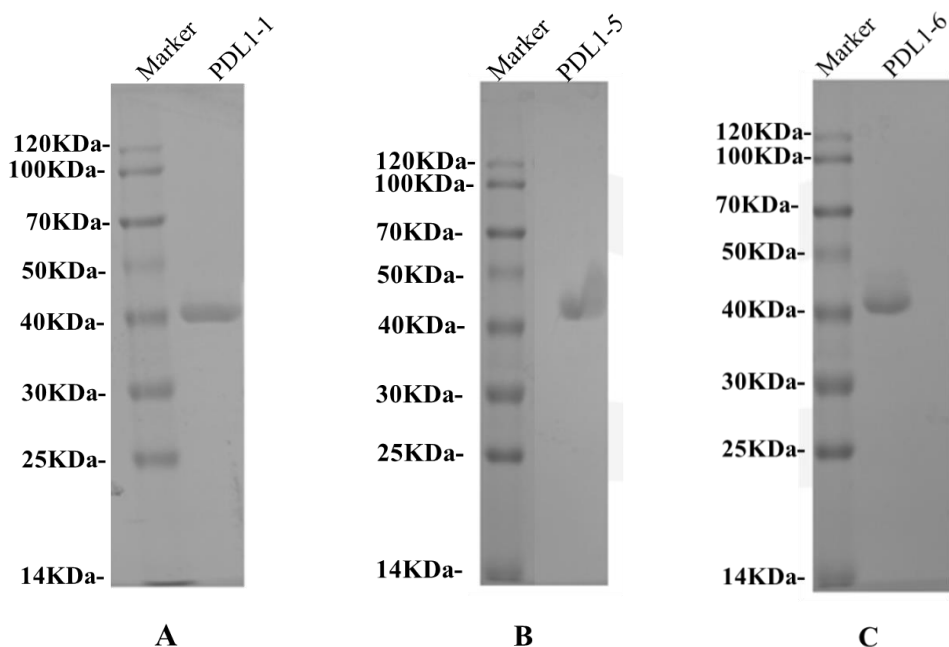
用 HEK293F 细胞真核瞬转表达重组抗体，表达结果如表 2-12 所示。

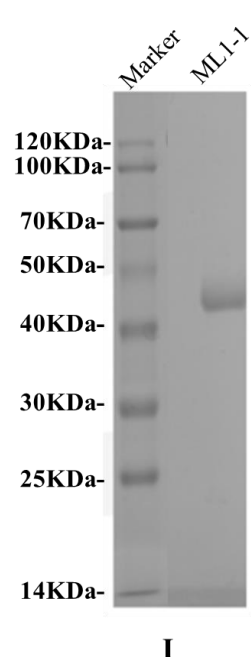
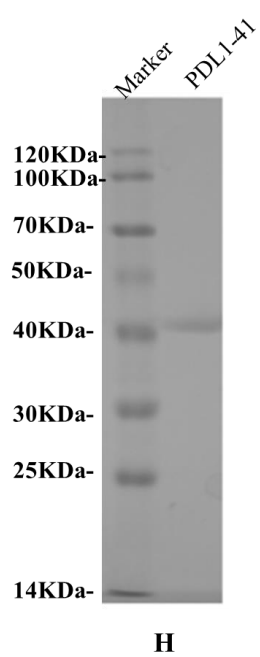
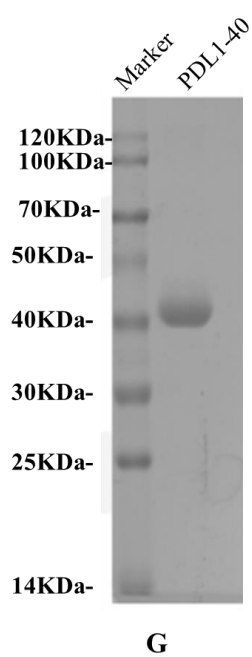
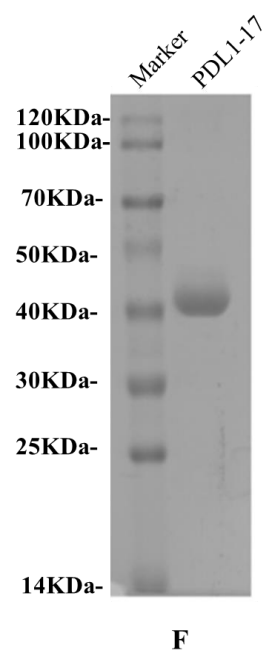
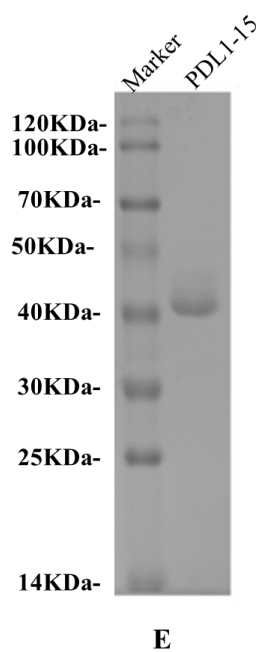
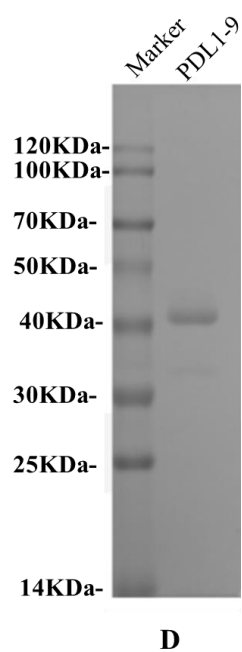
表 2-12 重组纳米抗体的表达产量

Table 2-12 Expression yields of recombinant nanobodies

抗体编号	结构	表达体系	表达体积 (mL)	产量 (mg)	保存 buffer
PDL1-1	VHH- hIgG1 Fc	HEK293F	50	2.58	50mM Tris-HCl 200mM NaCl PH8.0
PDL1-5			50	3	
PDL1-6			50	3.78	
PDL1-9			50	1.3	
PDL1-15			50	1.3	
PDL1-17			50	1.8	
PDL1-40			50	1	
PDL1-41			50	1	
ML1-1			50	3.2	
ML1-9			50	5.2	

将纯化所得的重组抗体经 SDS-PAGE 胶验证，鉴定蛋白纯度及大小，获得结果如图 2-6 所示，十个重组抗体计算分子量为 53.6 kDa-59.38kDa，由于糖基化作用，在还原条件下蛋白质的迁移率为 35-50kDa，与 Uniprot 预测几乎一致，且蛋白无杂带，纯度较高，可以进行亲和力验证：





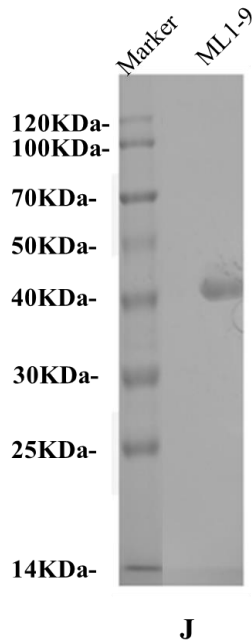


图 2-6 十个重组抗体 SDS-PAGE 凝胶图

Fig 2-6 SDS-PAGE gel plots of ten recombinant antibodies

(图注: 图 A: PDL1-1; 图 B: PDL1-5; 图 C: PDL1-6; 图 D: PDL1-9; 图 E: PDL1-15; 图 F: PDL1-17; 图 G: PDL1-40; 图 H: PDL1-41; 图 I: ML1-1; 图 J: ML1-9; 图中 10 个蛋白质的计算分子量为 53.6 kDa-59.38kDa, 由于糖基化作用, 在还原条件下蛋白质的迁移率为 35-50 kDa。)

(Figure Note: Figure A: PDL1-1; Figure B: PDL1-5; Figure C: PDL1-6; Figure D: PDL1-9; Figure E: PDL1-15; Figure F: PDL1-17; Figure G: PDL1-40; Figure H: PDL1-41; Figure I: ML1-1; Figure J: ML1-9; Calculated molecular weights of the 10 proteins in the figure are 53.6kDa-59.38kDa, and the mobility of the proteins under reducing conditions was 35-50kDa due to glycosylation.)

2.2.3 纳米抗体亲和力 FACS 验证

10 个重组表达纳米抗体, 用 FACS 验证纳米抗体与 PD-L1 中高表达的人肿瘤细胞 MDA-MB-231 的结合。纳米抗体使用量: 0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL 的纳米抗体 100 μ L/组。结果显示: 10 个纳米抗体均与 MDA-MB-231 细胞有较强结合, 1 μ g/组 (10 μ g/mL, 100 μ L/组) 时, 大部分抗体阳性率均 >80%。

表 2-13 重组纳米抗体与 MDA-MB-231 的 FACS 统计
Table 2-13 FACS statistics of recombinant nanobodies with MDA-MB-231

抗体浓度 (μg/mL)	阳性率 (%)									
	PDL1-1	PDL1-5	PDL1-6	PDL1-9	PDL1-15	PDL1-17	PDL1-40	PDL1-41	ML1-1	ML1-9
0.00	1.68	1.68	1.68	1.68	1.66	1.66	1.68	1.68	1.66	1.66
0.10	47.93	92.80	91.23	92.38	13.11	12.28	9.78	72.73	19.09	37.55
0.50	93.00	94.72	98.25	94.63	16.80	17.65	60.05	91.83	18.55	38.29
1.00	95.95	95.10	99.13	94.88	16.80	24.83	81.60	93.33	30.17	61.35
5.00	97.13	96.09	99.23	96.45	41.65	37.91	93.35	93.13	64.97	81.46
10.00	98.95	84.20	99.90	97.18	42.67	61.63	91.64	94.35	72.61	71.67
50.00	90.23	92.71	98.78	87.58	88.12	77.78	96.60	93.83	85.75	90.38

(注: 抗体浓度为 0μg/mL 时, 细胞阳性率为 1.66%-1.68%, 是因为单染二抗 human FITC 与 MDA-MB-231 细胞存在一定的非特异性结合, 但该非特异性结合不影响最终实验结果, 图 2-7 也因此未体现抗体浓度为 0 时的阳性率)

PD-L1 nanobody binding to MDA-MB-231

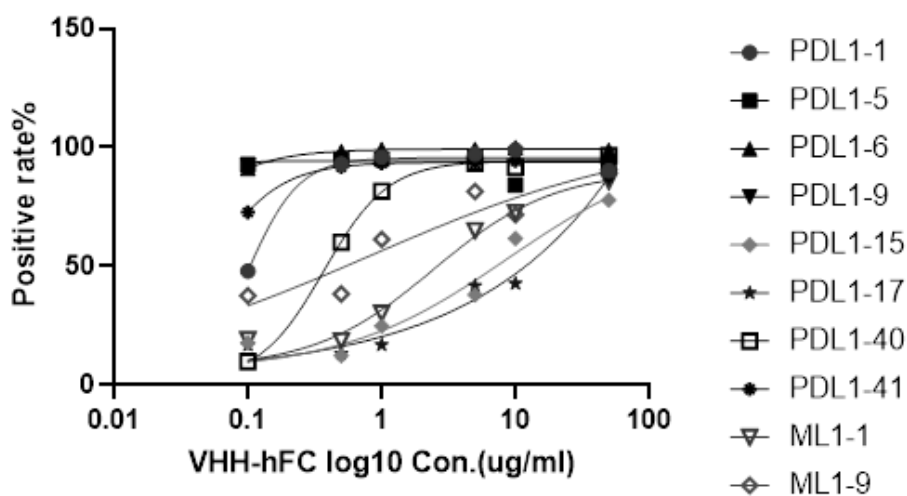


图 2-7 重组纳米抗体与 MDA-MB-231 的 FACS 汇总统计

Fig 2-7 FACS summary statistics for recombinant nanobodies with MDA-MB-231

选择在抗体浓度为 50μg/mL 时亲和力最低的 PDL1-17、ML1-1、PDL1-9 这三个抗体再次进行流式细胞术验证, 并提高抗体浓度, 获得结果表明当抗体浓度提升至 100μg/mL 时, 亲和力均能达到 90%以上, 具体结果如下:

表 2-14 三个重组纳米抗体与 MDA-MB-231 的 FACS 统计

Table 2-14 FACS statistics of three recombinant nanobodies with MDA-MB-231

抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	阳性率 (%)		
	PDL1-17	ML1-1	PDL1-9
0.00	1.66	1.66	1.66
0.10	13.05	12.28	76.31
0.50	16.80	21.49	89.12
1.00	27.56	24.83	88.36
5.00	41.65	45.00	90.39
10.00	42.92	61.63	92.16
50.00	89.16	77.78	95.12
100.00	99.69	91.36	94.27

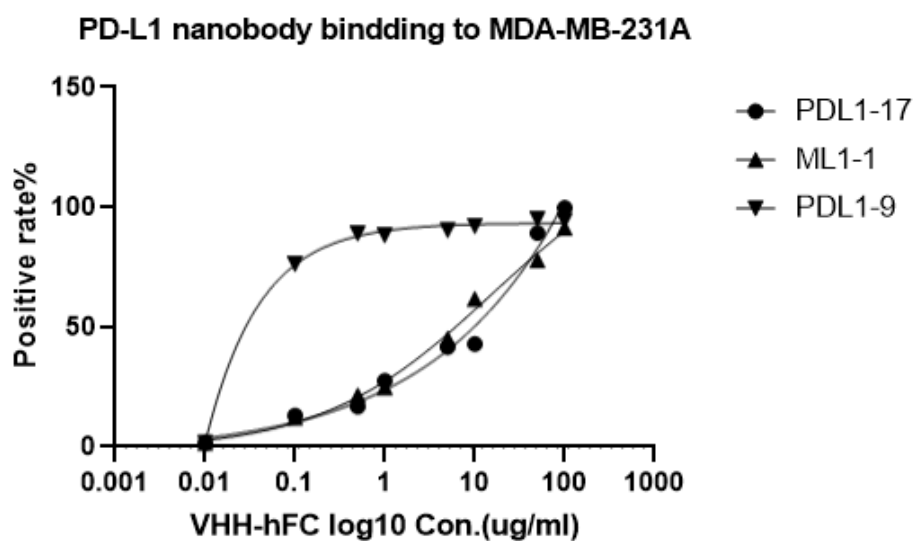


图 2-8 三个重组纳米抗体与 MDA-MB-231 的 FACS 汇总统计

Fig 2-8 FACS summary statistics for three recombinant nanobodies with MDA-MB-231

综合两次流式结果，可以得出获得的 10 个纳米抗体与三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 亲和力均比较高，可以进行后续实验。

2.3 讨论

单克隆抗体制备的方法有单个 B 淋巴细胞抗体制备技术、免疫血清提取法、人源抗体转基因小鼠、杂交瘤技术和噬菌体展示技术等，目前最主要的抗体发现技术依然是杂交瘤技术和噬菌体展示技术^[90]。

杂交瘤技术是在细胞融合技术的基础上，将具有分泌特异性抗体能力的致敏 B 细胞和具有无限繁殖能力的骨髓瘤细胞融合为杂交瘤细胞。在 HAT 选择培养基的作用下，只有 B 细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞才可存活和增殖，进而培养出所需要的单克隆抗体^[91]，是目前应用最广泛的单克隆生产技术。杂交瘤技术的基本流程主要包括抗原制备、动物免疫、细胞融合、杂交瘤克隆和亚克隆筛选、特异性抗体的表征和制备^[92]。

使用杂交瘤技术产生的抗体稳定，不需要进行分子改造，在筛选过程中很少出现活性降低和丢失的现象^[93]；但是该技术操作相对复杂，需要反复亚克隆，工作量大，细胞融合后产生的候选克隆数量少^[94]，即使采用电转技术，候选克隆最多可达 1×10^4 个，远不如抗体库 1×10^{10} 个的容量。

噬菌体展示技术是将外源编码后的多肽基因，通过基因工程技术，插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置^[95]，利用靶分子进行生物淘筛，洗去未特异性结合的噬菌体，再通过感染大肠杆菌进行扩增，经过 3-5 轮克隆富集，可以逐步提升特异性识别靶分子的噬菌体比例，最终获得能特异性识别靶分子的蛋白^[96]。噬菌体展示技术可以直接得到抗体基因，能进一步进行难制备的抗体、人源化抗体的构建；利用该技术可以筛选出能与某个抗体特异性结合的噬菌体，获得该抗体识别的抗原表位，进行抗原表位分析^[97]，为反应机制的研究、诊断试剂的开发、疫苗的制备提供基础依据。本文 PD-L1 纳米抗体的制备是基于目前已有的骆驼免疫库进行噬菌体展示技术开展的。

单域抗体也叫做纳米抗体，来自骆驼科单域抗体的重组单个可变结构域^[98]，通常容易在短暂免疫后获得，随后从外周血淋巴细胞中克隆基因库，并通过噬菌体展示技术筛选出需要的特异性蛋白质作为免疫原。

本实验对已有的骆驼免疫库进行了三轮固相筛选和一轮细胞筛选，经 phage ELISA 验证，获得了与目的靶点 PD-L1 有一定亲和力的单克隆，通过构建新的载

体和合适的酶切位点，插入片段获得相应质粒；质粒提取后，对 10 个重组 PD-L1 纳米抗体进行了真核瞬转表达，表达标签为 VHH-hIgG1 Fc。这 10 个重组抗体的产量为 20-100mg/L，SDS-PAGE 纯度>95%，符合经验数据。流式细胞术结果显示：10 个表达的重组纳米抗体，都能与 PD-L1 中高表达的人肿瘤细胞 MDA-MB-231 有较强结合，1 μ g/组（10 μ g/mL，100 μ L/组）时，大部分抗体阳性率均>80%。后续实验中，随机选择 4 个纳米抗体(PDL1-1、PDL1-5、PDL1-6、PDL1-17)进行小鼠活体成像实验。

2.4 结论

基于目前已有的骆驼免疫库，以 PD-L1 为靶点，使用噬菌体展示技术，制备了 10 个 PD-L1 重组纳米抗体，再通过流式细胞术，验证了实验中制备的 10 个重组纳米抗体与人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 有较高的亲和力，可作为后续实验中小鼠体内成像的受试物。

第三章 PD-L1 在裸鼠体内成像研究

第二章在现有骆驼免疫库中成功构建了与 MDA-MB-231 有高亲和力的 10 个 PD-L1 纳米抗体，并进行了体外验证，获得了较好的结果。本章中随机挑选了其中 4 个抗体进行荧光染料的偶连和小鼠体内验证。

3.1 材料与方法

3.1.1 试验动物与材料

3.1.1.1 试验动物

无特定病原体(specified pathogen-free, SPF)级雌性 Balb/c-nude 小鼠(6-8 周龄, 18-20g)，来自北京华阜康生物科技股份有限公司，动物合格证号：No.110322230100548668，实验许可证号：SCXK（京）2019-0008。动物使用流程符合 IACUC（实验动物伦理与使用委员会）制定的动物福利原则。

试验前小鼠需先适应环境至少 5 天，选择健康动物作为受试动物。适应期的主要检查内容：是否与订购时要求的质量指标一致、动物一般状态、动物体重是否达到试验要求的体重范围、以上检查不合格的动物不纳入本试验。

3.1.1.2 主要仪器

同第二章“2.1.2”。

3.1.1.3 主要试剂

同第二章“2.1.3”。

3.1.2 试验方法

3.1.2.1 动物模型构建

为建立皮下移植瘤动物模型，本研究选择的是 BALB/c 裸鼠，实验过程采用

肿瘤细胞接种法，取处于对数生长期并且细胞状态好的 MDA-MB-231 细胞，细胞收集的前一晚，更换新鲜培养基，细胞密度最好保持在 80%-90%。使用胰酶充分消化细胞，离心弃上清，再用预冷的生理盐水清洗 2 次，以达到去除细胞中血清的目的。根据细胞计数后的结果，使用生理盐水进行稀释，把细胞悬液的浓度调整为 5×10^7 个/ mL。细胞重悬后尽快在裸鼠皮下接种。每只裸鼠于右侧腋窝中后部注射 0.2mL，接种细胞量为 1×10^7 个。接种部位用酒精棉球消毒处理，接种前细胞悬液应充分吹散混匀，注射前应排去针内空气，贴皮肤进针，向前穿行约 1cm，以减少注射后漏液情况的发生。一般接种后 3 周左右可见皮下出现肿块，接种后定期观察并记录裸鼠的生长、生存状态以及成瘤情况，待肿瘤体积达 100mm^3 即视为模型建立成功，可用于下一步的体内实验。

3.1.2.2 小鼠荧光成像

按标准分组法选择 15 只 MDA-MB-231 细胞荷瘤裸鼠，经尾静脉给每只裸鼠分别注射由 DyLight™ 800 NHS 酯标记后的不同浓度 PD-L1 纳米抗体，于注射后 0h、2h、24h、72h 的不同时间点摄取裸鼠活体荧光成像图片，以观察 PD-L1 纳米抗体在小鼠体内的分布情况。最后一个时间点图片采集成功后，将裸鼠颈椎脱臼处死和解剖，再分别取裸鼠肝脏、心脏、脾脏、肺、双肾和肿瘤组织成像，观察 PD-L1 纳米抗体与主要脏器和肿瘤组织是否有特异性结合。

3.1.3 统计与分析

实验结果为 PerkinElmer IVIS® Lumina III 系统采集到的光学成像图，通过 Living Image Software 进行荧光成像分析。

3.2 结果与分析

3.2.1 小鼠活体不同染料成像

选择 PDL1-17 纳米抗体作为预实验抗体，该抗体在浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ 时，与三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 亲和力最低，当提高抗体浓度后，亲和力随之增加，能达到 99%以上，因此可以判定该抗体与 MDA-MB-231 细胞亲和力极高。

使用 Cy5 和 DyLight™ 800 NHS 酯分别对 PDL1-17 抗体进行标记，1 种荧光标记的抗体注射一只小鼠，给药剂量为 5mg/kg。结果如图 3-1、图 3-2 所示：Cy5 标记的抗体与小鼠主要脏器存在较多的非特异性结合；而 DyLight™ 800 NHS 标记的抗体与小鼠主要脏器无非特异性结合，只与接种的肿瘤结合。因此在实验中使用 DyLight™ 800 NHS 对抗体进行标记和活体成像实验。

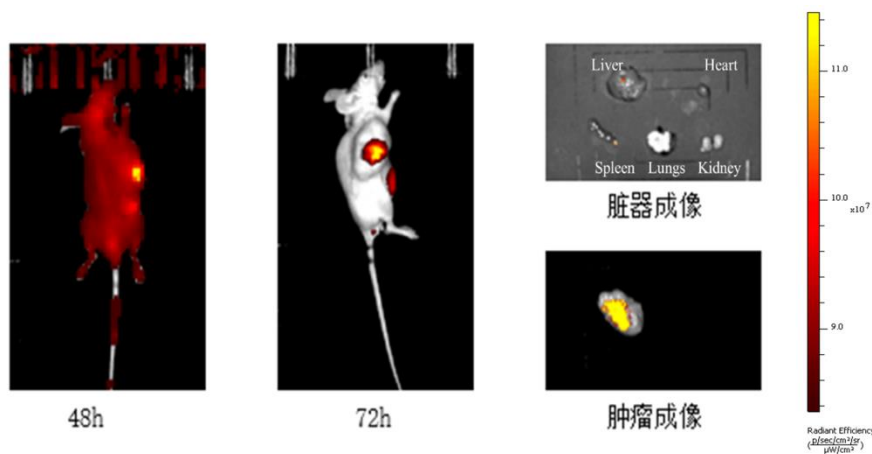


图 3-1 DyLight™ 800 NHS 染料实验

Fig 3-1 DyLight™ 800 NHS Ester Dye Experiment

（图注：使用 DyLight™ 800 NHS 标记 PDL1-17 注射后 48h 裸鼠全身分布，72h 仅肿瘤部位和腹腔有分布，脏器成像仅肝脏有极少量非特异性分布，肿瘤切面有较强荧光分布）

(Figure Note: Systemic distribution in nude mice 48h after injection with DyLight™ 800 NHS-labelled PDL1-17, 72h distribution only in the tumour site and peritoneal cavity, organ imaging with minimal non-specific distribution only in the liver, and strong fluorescent distribution in tumour sections)

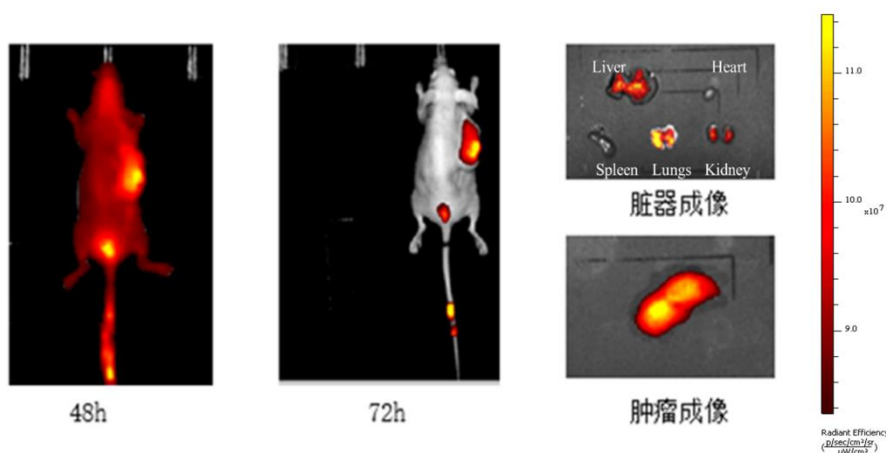


图 3-2 Cy5 染料实验

Fig 3-2 Cy5 Dye Experiment

（图注：使用 Cy5 标记 PDL1-17 注射后 48h 裸鼠全身分布，72h 肿瘤部位和尾部有分布，

脏器成像肝脏、双肺和双肾中均有大量非特异性分布，肿瘤切面有较强荧光分布)

(Figure Note: Systemic distribution in nude mice 48h after injection using Cy5-labelled PDL1-17, distribution in the tumour site and tail at 72h, large non-specific distributions in organs imaged liver, both lungs and both kidneys, and strong fluorescent distribution in tumour sections)

3.2.2 小鼠活体 800 NHS 酯单染料成像

仅使用 DyLight™ 800 NHS Ester 单染料进行小鼠活体成像实验，2 只小鼠，染料给药剂量为 1mg/kg、10mg/kg。成像结果表明：仅给药 DyLight™ 800 NHS Ester 染料后，染料在小鼠体内和肿瘤块内均无特异性结合，不论浓度，72h 内染料均被小鼠机体完全代谢。具体成像结果如图 3-3 和图 3-4 所示：

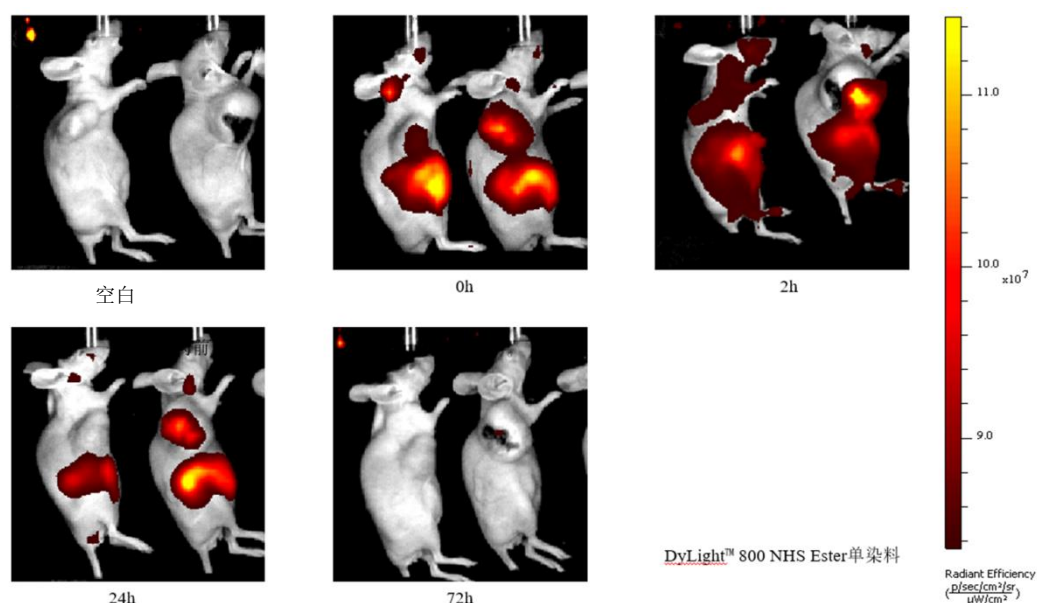


图 3-3 DyLight™ 800 NHS Ester 单染料实验

Fig 3-3 DyLight™ 800 NHS Ester Single Dye Experiment

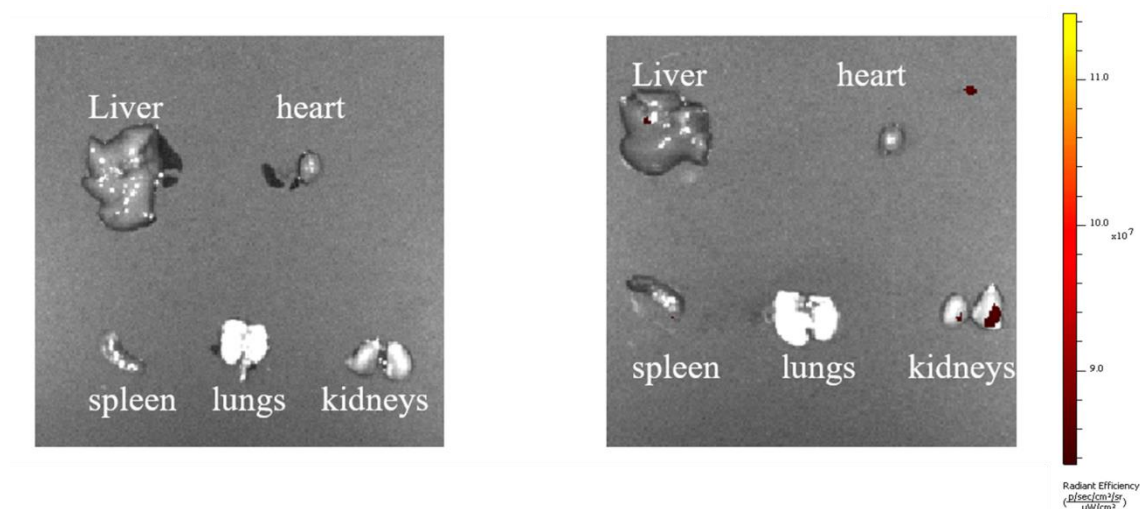


图 3-4 DyLight™ 800 NHS Ester 单染料离体脏器成像结果
Fig 3-4 DyLight™ 800 NHS Ester Single Dye ex vivo organ imaging results

3.2.3 小鼠活体荧光成像实验

使用 DyLight™ 800 NHS Ester 分别对 PDL1-1、PDL1-5、PDL1-6、PDL1-17 这 4 个抗体进行小鼠活体成像实验，每个实验组 3 只小鼠，从左至右给药剂量依次为 0.5mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg。成像结果表明：4 个纳米抗体都能与小鼠体内的 PD-L1 阳性肿瘤 MDA-MB-231 细胞特异性结合并在成像系统中显像，其中 PDL1-6、PDL1-17 与小鼠主要脏器非特异性结合相对较少。具体成像结果如图 3-5 到图 3-12 所示：

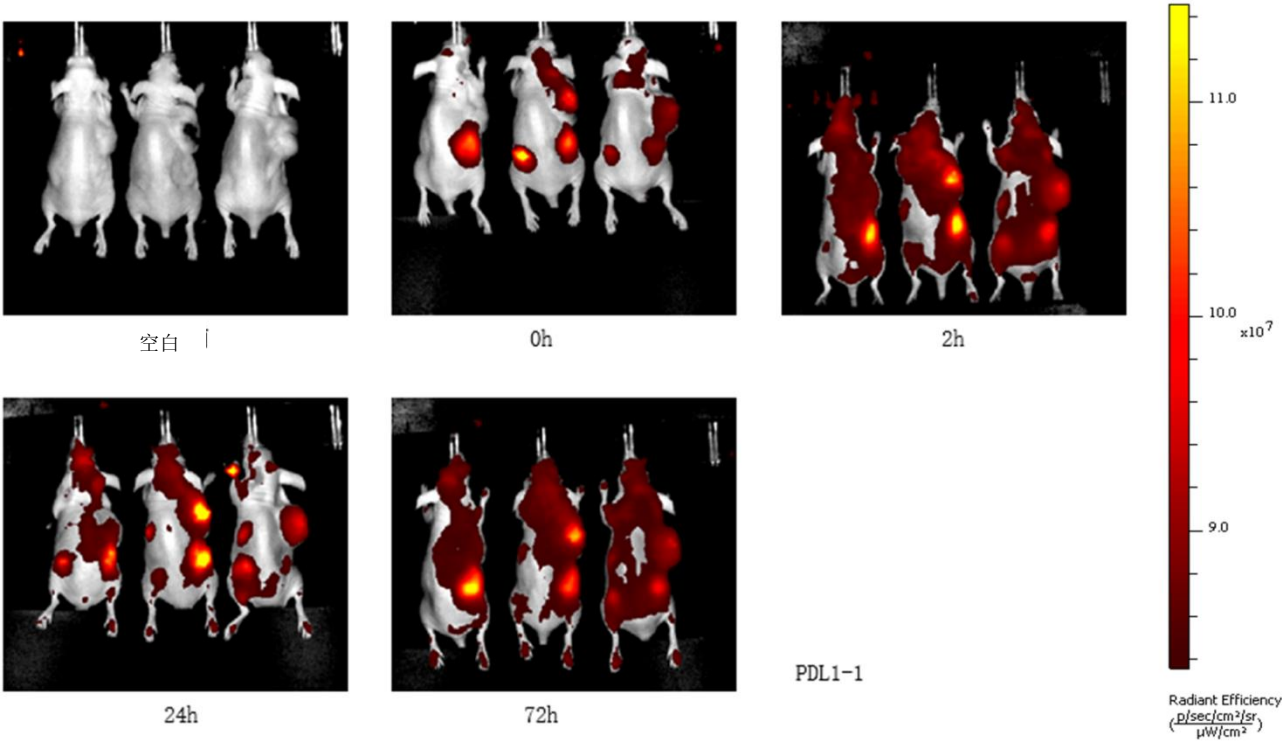


图 3-5 PDL1-1 活体成像结果
Fig 3-5 PDL1-1 live imaging results

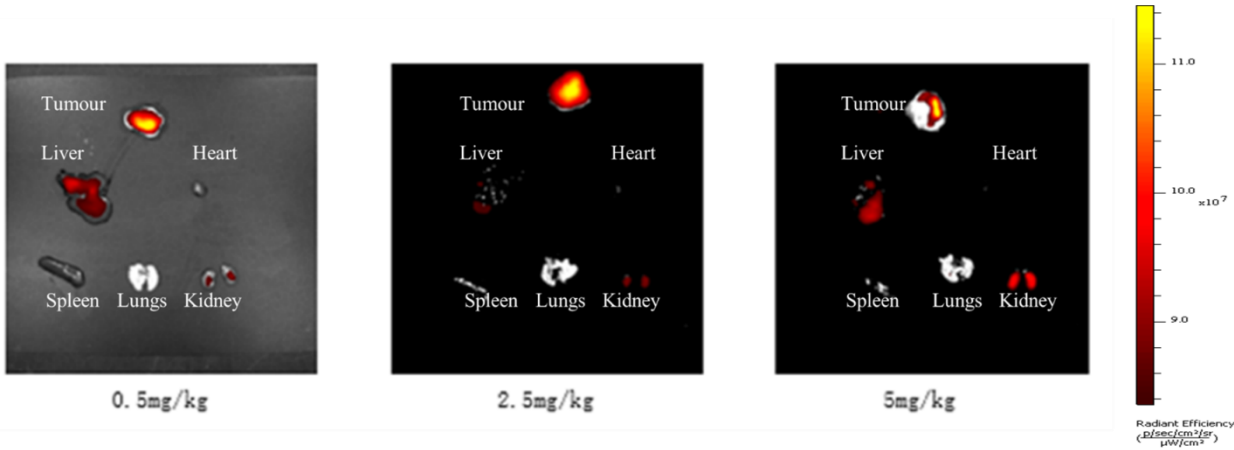


图 3-6 PDL1-1 离体肿瘤与脏器成像结果
Fig 3-6 PDL1-1 results of ex vivo tumour and organ imaging

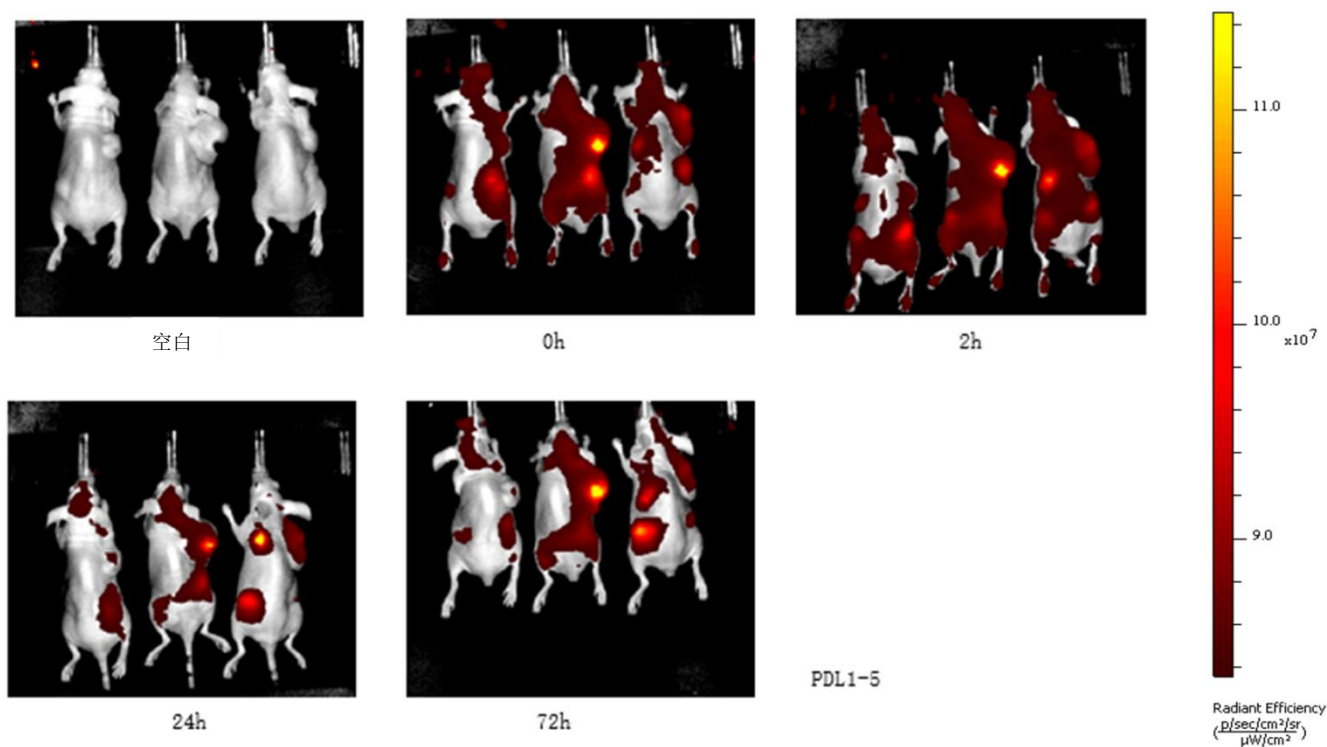


图 3-7 PDL1-5 活体成像结果
Fig 3-7 PDL1-5 live imaging results

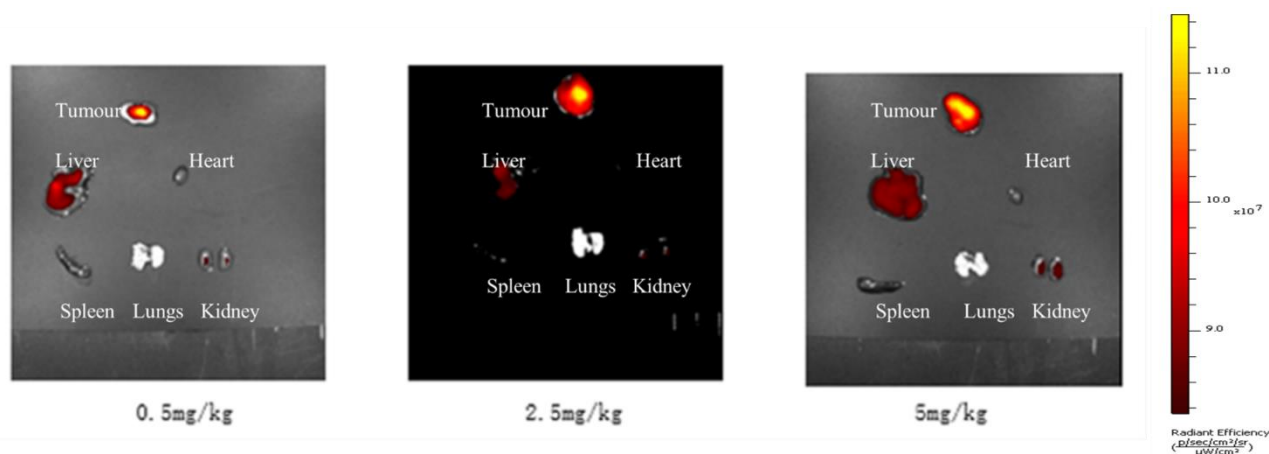


图 3-8 PDL1-5 离体肿瘤与脏器成像结果
Fig 3-8 PDL1-5 results of ex vivo tumour and organ imaging

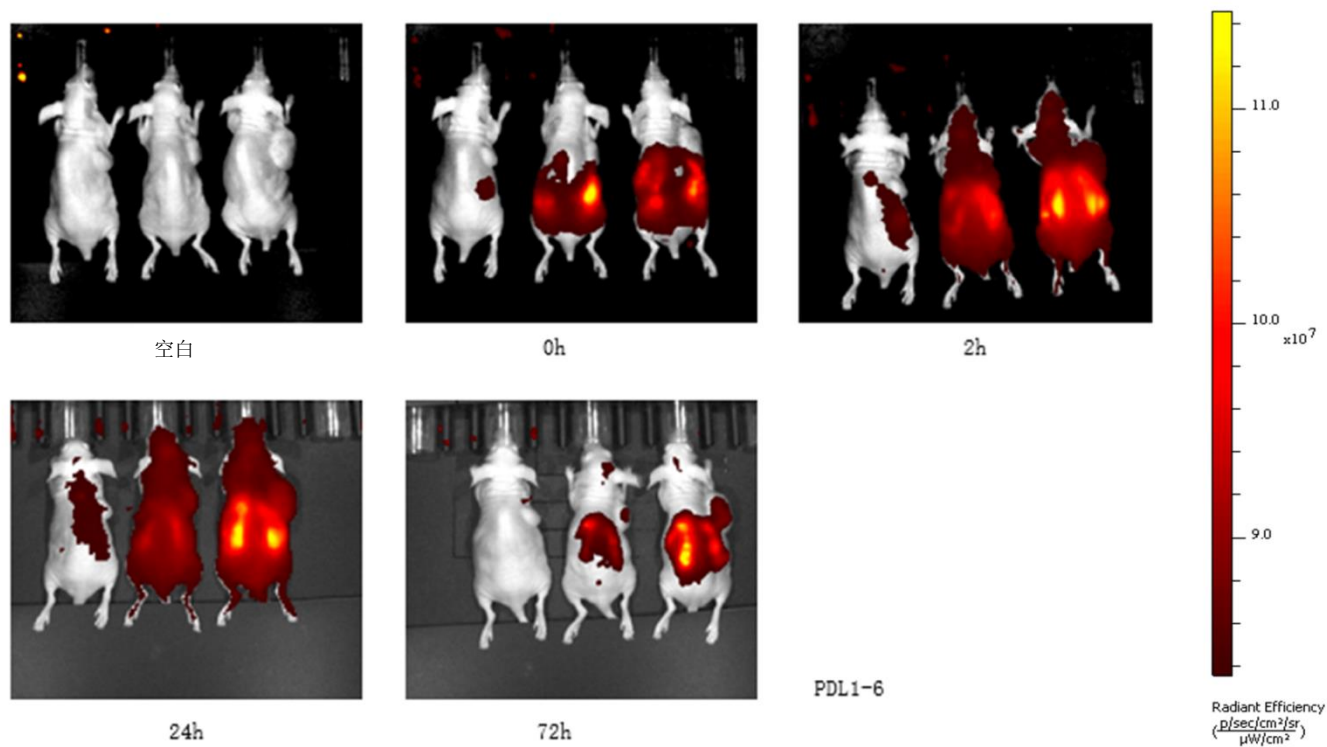


图 3-9 PDL1-6 活体成像结果
Fig 3-9 PDL1-6 live imaging results

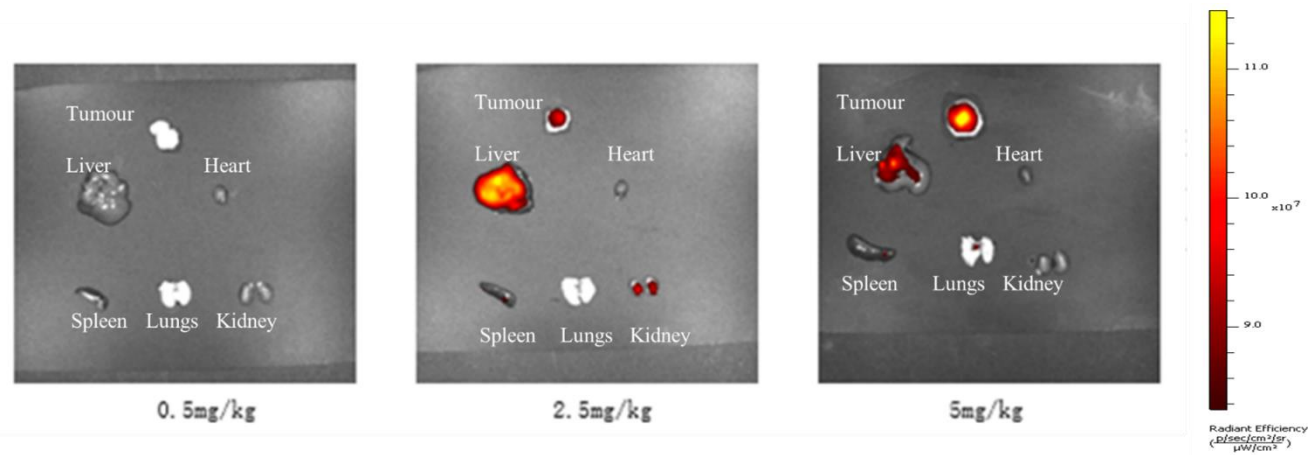


图 3-10 PDL1-6 离体肿瘤与脏器成像结果
Fig 3-10 PDL1-6 results of ex vivo tumour and organ imaging

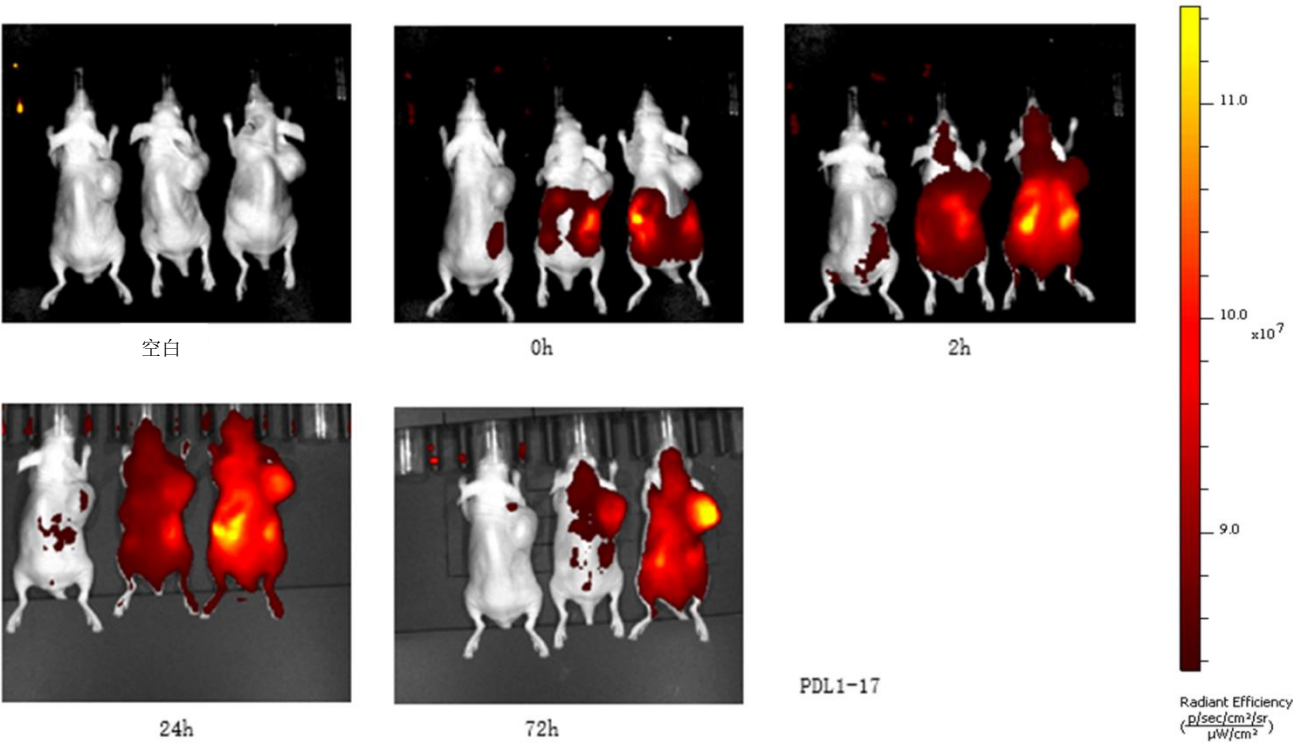


图 3-11 PDL1-17 活体成像结果
Fig 3-11 PDL1-17 live imaging results

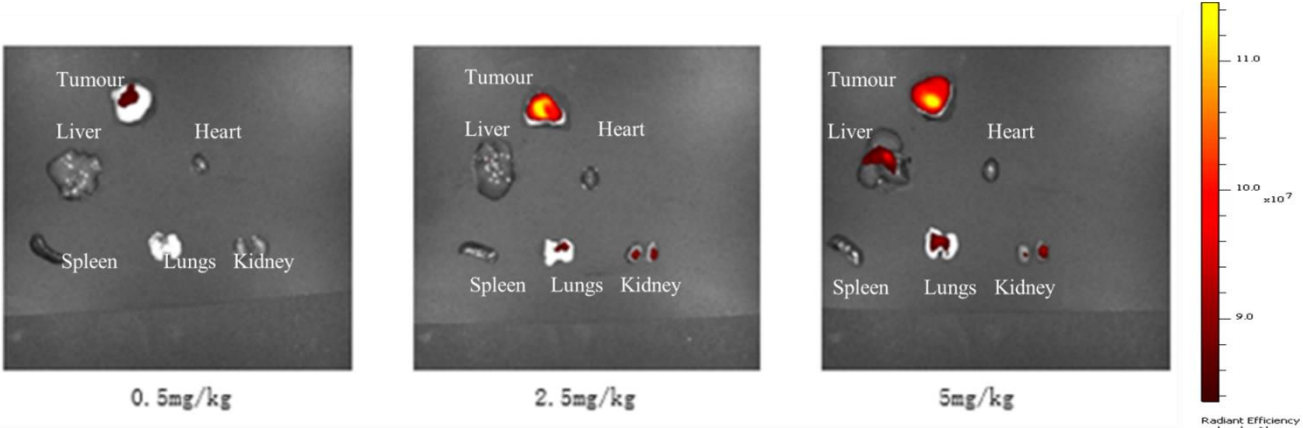


图 3-12 PDL1-17 离体肿瘤与脏器成像结果
Fig 3-12 PDL1-17 results of ex vivo tumour and organ imaging

3.3 讨论

目前应用广泛的生物活体成像技术主要有超声、X 射线断层成像(CT)、磁共振成像(MRI)、正电子发射型计算机断层成像(PET)和光学分子成像技术(OMI)。OMI(optical molecular imaging)是在蛋白质组学、基因组学和现代光学基础之上发展而来的新兴技术,能够非侵入、无损伤地进行组织功能成像,尤其适用于针对小动物的研究,具有灵敏度高,特异性好,操作简单,无放射性,实验成本低的优点,在抗肿瘤新药的药效学评价研究方面具有广阔的应用前景^[99-100]。根据发光原理不同,OMI 成像分为荧光和生物发光两种方式,分别针对不同目的的研究。荧光成像主要用于核酸及蛋白类小分子的检测,而生物发光通常用于活细胞的动态观测^[101]。在本部分实验中,应用了荧光成像作为检测手段。

本实验中的两个染料实验结果表明: Cy5 染料标记的抗体进行体内验证后,与小鼠主要脏器存在较多的非特异性结合;而 DyLight™ 800 NHS 染料标记的抗体进行体内验证,只与接种的 MDA-MB-231 肿瘤结合,与小鼠主要脏器几乎没有非特异性结合;且单独的染料进行体内验证,72h 内能被完全代谢出机体,与主要脏器几乎没有非特异性结合。因此在正式的小鼠活体荧光成像实验中只使用 DyLight™ 800 NHS 酯染料对抗体标记。

为了实现对 PD-L1 纳米抗体在动物组织中分布情况的实时监测,首先要用 DyLight™ 800 NHS 荧光染料对挑选出来的 PD-L1 纳米抗体进行标记。小鼠活体组织脏器对 700~900 nm 范围内近红外光谱吸收程度低^[102],几乎不会在成像过程中产生非特异性荧光,可以获得信噪比较高的图像^[103];该区段光谱波长较长^[104],具有良好的组织穿透性,可深入到动物表皮数厘米以下,在动物活体成像的研究中具有明显优势^[105]。DyLight™ 800 NHS 荧光染料是一种近红外荧光染料,对 770 nm 光波具有最大吸收,产生 794 nm 激发光,适合在本研究中使用。大量文献报道^[106-107],荧光探针对蛋白类物质的过度标记会对后者生物活性产生影响,因此在对 PD-L1 纳米抗体标记过程中,需要严格计算 DyLight™ 800 NHS 荧光染料的用量,将标记后蛋白分子的 F/P 比例控制在 1.5~2.0 之间,保证其维持原有活性。最终实验结果表明: 4 个使用 DyLight™ 800 NHS 酯标记的 PD-L1 纳米抗体都能与小鼠体内的 MDA-MB-231 肿瘤细胞特异性结合并清晰显像。

3.4结论

本实验制备的 PD-L1 纳米抗体偶连 DyLight™ 800 NHS 荧光染料后,通过小鼠尾静脉注射,能够在活体成像系统中,清晰地显示出 PD-L1 纳米抗体在小鼠体内的分布和代谢情况,且能与人乳腺癌肿瘤细胞 MDA-MB-231 特异性结合,进行肿瘤定位并显影;随着抗体浓度的提高,肿瘤荧光成像图光信号越强,说明制备的纳米抗体具有较高的灵敏度、特异性和准确性;在体内留存时间较短,能准确地检测和定位肿瘤病灶,提供更全面的肿瘤信息,从而为动物体内 MDA-MB-231 肿瘤的诊断和治疗提供指导,具有潜在的应用价值。

第四章 结论与创新点

4.1 结论

4.1.1 成功构建重组质粒

获得的 10 个 Unique 序列，对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有高亲和力，通过扩增 VHH 片段，插入到 pVHH-hIgG1Fc 表达质粒中，成功构建出携带 hIgG1 Fc 标签的 PD-L1 重组抗体表达质粒。

4.1.2 体外重组 PD-L1 抗体验证

使用 HEK293F 细胞真核瞬转表达重组抗体，构建的 10 个抗体产量均在 20-100mg/L，SDS-PAGE 胶验证蛋白纯度>95%，还原条件下的蛋白质迁移率为 35-50kDa，流式细胞术验证，都与 PD-L1 中高表达的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 有较强结合，随抗体浓度提高，细胞阳性率也逐步提高，在抗体浓度为 50 μ g/mL 时，其中 9 个抗体的阳性率>80%。

4.1.3 体内重组 PD-L1 抗体验证

通过小动物活体成像系统对 PD-L1 纳米抗体的特异性和准确性进行小鼠体内验证，表明，使用赛默飞的产品 DyLight™ 800 NHS Ester 标记的 4 个抗体能够只与裸鼠体内的 MDA-MB-231 皮下瘤结合，并且与主要脏器（肝脏、心脏、脾脏、双肺、双肾）几乎没有非特异性结合，适合作为首选荧光染料。

综上，本研究成功制备出针对 MDA-MB-231 肿瘤细胞的 PD-L1 纳米抗体，通过耦连 DyLight™ 800 NHS 酯染料作为荧光显影剂，可用于 MDA-MB-231 肿瘤的特异性小动物荧光活体成像。然而，本实验关于靶向 PD-L1 显影的研究仍存在诸多不足：第一，针对 PD-L1 高表达的阳性细胞株本实验中仅选择了 MDA-MB-231 一种细胞，未进行对 PD-L1 中表达和低表达细胞株的验证，为了进一步评估 PD-L1 荧光显影剂在不同肿瘤中的显像结果，研究 PD-L1 荧光显影剂的靶向性和特异

性，后续可以选择多种 PD-L1 表达水平不同的阳性肿瘤细胞进行验证；第二，未选择已上市的 PD-L1 单抗药物作为阳性对照组，后续可进行对比实验，设置上市药物作为阳性对照，验证本研究获得的纳米抗体的特异性；第三，还可以通过筛选构建新的 PD-L1 纳米抗体序列、扩大实验动物样本量的方式进一步完善实验；最后，可以选择多种不同的荧光染料，对 PD-L1 耦连荧光染料的结构进行优化，比较筛选出更适合用于动物体内显像的 PD-L1 荧光显影剂。这些都是后续值得深入研究和探讨的方面，并且对 PD-L1 诊断和治疗具有重要意义。

4.2 创新点

本实验针对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 研发的新型 PD-L1 纳米抗体显影剂，实现了对 Balb/c-nude 小鼠活体内乳腺癌皮下瘤靶向的显像，且在后续评估中，机体代谢快，在体内留存时间短，无其他不良影响，因此可以作为动物体内 MDA-MB-231 肿瘤早期筛查、定位诊断以及复发转移监测的无创性影像评估手段，还可以配合使用吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)，在动物的乳腺癌手术中，通过吲哚菁绿的荧光显影，在术中激发荧光，肿瘤负显影后会与正常组织之间的界限清晰，能精准定位肿瘤，确认肿瘤边缘，完整切除肿瘤后，再通过活体成像系统检测是否还有肿瘤残留，这对于乳腺癌动物临床治疗方案的制定以及预后有着重要的意义和应用价值。

PD-L1 纳米抗体通过耦连荧光染料，可对术后患者或患犬进行肿瘤标志物动态监测，以及时发现是否存在残留的肿瘤细胞，做到术后预后良好，提高人或宠物的生存质量。同时，在人乳腺癌的研究中，小鼠模型具有一定的局限性，缺乏自发性癌症固有的基本特征，所以在一些临床试验中，患有 CMC 的犬被用作动物模型进行发病机制、治疗方案、药物研发的研究，但犬乳腺癌尚缺乏有效、合理的分子标志物，亟需进行更多有计划的随机临床试验来开发犬特异性靶向治疗方法，从而找出治疗人类乳腺癌的新疗法，按照“同一健康”的原则，可将人类和兽医肿瘤学联合起来，进而有效解决动物和人类乳腺肿瘤治疗的难题。

参考文献

-
- [1] 董苑梅, 焦顺昌. PD-1/PD-L1 抑制剂疗效相关生物预测标记物的研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2018, 39(12): 1106-1109.
- [2] 高峰, 钱文霞, 冯一中. 非小细胞肺癌中 TIM-3、PD-1、PD-L1 的表达与临床意义[J]. 海南医学, 2019, 30(2): 154-158.
- [3] Pizarro C, Garcia-Diaz D F, Codner E, Salas-Perez F, Carrasco E, Perez-Bravo F. PD-L1 gene polymorphisms and low serum level of PD-L1 protein are associated to type 1 diabetes in Chile[J]. Diabetes Metab Res Rev. 2014, 30(8): 761-766.
- [4] Chen J, Jiang C C, Jin L, Zhang X D. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer[J]. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology. 2016, 27(3): 409-416.
- [5] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(2): 505-510.
- [6] Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor[J]. Immunity. 1999, 11(2): 141-151.
- [7] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [8] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 周彤, 张婧莹, 游伟程, 潘凯枫, 李文庆. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(02): 1-14.
- [9] Mahtani R, Kittaneh M, Kalinsky K, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. 中华医学杂志英文版, 2021, 134(07): 783-791.
- [10] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33.
- [11] 郭净洁, 王崇, 张维甲, 杜超, 李国林. 黄芩素与黄芩苷联合用药对口腔鳞癌细胞增殖、迁移的影响[J]. 口腔医学, 2020, 40(05): 393-398.
- [12] 张蒙, 崔永春, 王春平, 等. 1990-2019 年中国女性乳腺癌疾病负担及其危险因素变化趋势分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(7): 456-462.

- [13] 赫捷, 陈万青, 李霓, 等. 中国女性乳腺癌筛查与早诊早治指南[J]. 中国肿瘤, 2021, 30(3): 161-191.
- [14] 鲁成武, 阚德义, 刘云. 犬乳腺肿瘤的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2006, (05): 77-78.
- [15] Sleenckx N, De R H, Veldhuis Kroeze E J, et al. Canine mammary tumours, an overview[J]. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46(6): 1112-1131.
- [16] Bearss J J, Schulman F Y, Carter D. Histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs[J]. *Vet Pathol*, 2012, 49(4): 602-607.
- [17] 王彤光, 陈谊, 侯加法. 60 例犬乳腺肿瘤病例的临床调查与分析[J]. 上海农业学报, 2012, 28(03): 52-54.
- [18] 史兴山, 聂明达. 犬乳腺肿瘤的致病因素[J]. 养殖与饲料, 2018(09): 114-115.
- [19] 常宏建. 犬 271 例肿瘤流行病学分析及乳腺肿瘤血清/组织标记物的筛查[D]. 东北农业大学, 2018.
- [20] Jae-Hoon K. Mammary comedocarcinoma in a dog[J]. *Journal Veterinary Clinics*, 2013, 30(6): 486-489.
- [21] Maurizi A, Ciocca M, Giuliani C, et al. Role of Neural(N)-Cad-herin in breast cancer cell stemness and dormancy in the bone microenvironment[J]. *Cancers*, 2022, 14(5): 1317.
- [22] Cordeiro Y G, Mulder L M, van Zeijl R J M, et al. Proteomic analysis identifies FNDC1, A1BG, and antigen processing proteins associated with tumor heterogeneity and malignancy in a canine model of breast cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(23): 5901.
- [23] 曹欣华, 吕建鑫, 胡浩霖, 张亚男. 不同手术方式对早期乳腺癌患者的术后恢复及并发症的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2018, 37(01): 45-49.
- [24] 代晟, 杨冰, 刘澈, 李雷. NLR 和 SII 对 PD1/PDL1 抑制剂治疗晚期子宫内膜癌患者预后的预测价值[J]. 临床误诊误治, 2023, 36(03): 35-39.
- [25] Borri F, Granaglia A. Pathology of triple negative breast cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 72: 136-145.
- [26] Amir Hassan Zadeh, Qamar Alsabi, Jaime E. Ramirez-Vick, et al. Characterizing basal-like triple negative breast cancer using gene expression analysis: A data mining approach[J]. *Expert Systems With Applications*, 2020, 43: 600-608.
- [27] Lou LP. Local recurrence risk and survival analysis of breast cancer patients with T1-2 and one to three positive axillary lymph nodes without postmastectomy radiotherapy [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019.
- [28] Chen XK, Tian HQ. Therapeutic status and progress of triple negative breast cancer[J]. *West J Tradit Chin Med*, 2018, 31(11): 135-140.

- [29] Mahtani R, Kittaneh M, Kalinsky K, et al. Advances in therapeutic approaches for triple-negative breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2021, 21(5): 383-390.
- [30] CONTI N, TORRICELLI M, VOLTOLINI C, et al. Term histologic chorioamnionitis : a heterogeneous condition[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015, 188: 34-38.
- [31] CHENG Y, FU Y, WANG Y, et al. The m6A Methyltransferase METTL3 Is Functionally Implicated in DLBCL Development by Regulating m6A Modification in PEDF [J]. Front Genet, 2020, 11: 955.
- [32] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [33] ZHOU W, XIAN Q, WANG Q, et al. m6A Methyltransferase 3 Promotes the Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells through the m6A Modification of YAP1 [J]. J Oncol, 2021, 2021: 8875424.
- [34] LIN S, LIU J, JIANG W, et al. METTL3 Promotes the Proliferation and Mobility of Gastric Cancer Cells [J]. Open Med (Wars), 2019, 14: 25-31.
- [35] SCHMID P, CORTES J, PUSZTAI L, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer [J]. N Engl J Med, 2020, 382(9): 810-811.
- [36] WINER E P, LIPATOV O, IM S A, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-119): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2021, 22(4): 499-511.
- [37] CORTES J, CESCON D W, RUGO H S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial [J]. Lancet, 2020, 396(10265): 1817-1828.
- [38] MITTENDORF E A, ZHANG H, BARRIOS C H, et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with earlystage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. Lancet, 2020, 396(10257): 1090-1100.
- [39] MILES D, GLIGOROV J, ANDRE F, et al. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer[J]. Ann Oncol, 2021, 32(8): 994-1004.

- [40] 肖龙敏, 韩文健, 吴洪. CD155 表达水平对非小细胞肺癌 PD1 免疫疗法反应性的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(04): 486-489.
- [41] 刘书含. 纳米药物递送系统增强胶质母细胞瘤治疗疗效的研究[D]. 吉林大学, 2022.
- [42] Macek J, Jilkova Z, Aspord C, Decaens T. Predictive Factors for Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibition in the Field of Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Challenges[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(10): 154-158.
- [43] Heskamp S, Wierstra P J, Molkenboer-Kuenen J, et al. PD-L1 micro SPECT/CT imaging for longitudinal monitoring of PD-L1 expression in syngeneic and humanized mouse models for cancer[J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(1): 150-161.
- [44] Liu X, Guo C Y, Tou F F, et al. Association of PD-L1 expression status with the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors and overall survival in solid tumours: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Cancer, 2020, 147(1): 116-127.
- [45] Grigg C, Rizvi N A. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction[J]. J Immunother Cancer, 2016, 4(48): 56-62.
- [46] Hirsch F R, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC assay Comparison project[J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(2): 208-222.
- [47] Muenst S, Schaerli A R, Gao F, Daster S, Trella E, Droezer R A, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat. 2014, 146(1): 15-24.
- [48] Li X, Wetherill C S, Krishnamurti U, Yang J, Ma Y, Styblo T M, et al. Stromal PD-L1 Expression is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer[J]. American journal of clinical pathology. 2016, 146(4): 496-502.
- [49] Wang F, Wei X L, Wang F H, et al. Safety, efficacy and tumor mutational burden as a biomarker of overall survival benefit in chemo-refractory gastric cancer treated with toripalimab, a PD-1 antibody in phase I b/II clinical trial NCT02915432[J]. Ann Oncol, 2019, 30(9): 1479-1486.
- [50] Bensch F, van der Veen E L, Lub-de Hooge M N, et al. ⁸⁹Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer[J]. Nature Medicine, 2018, 24(12): 1852-1858.
- [51] Moroz A, Lee C-Y, Wang Y-h, et al. A Preclinical Assessment of ⁸⁹Zr atezolizumab Identifies a Requirement for Carrier Added Formulations Not Observed with ⁸⁹Zr-C4[J]. Bioconjugate Chemistry, 2018, 29(10): 3476-3482.

- [52] Hamers C C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [53] Arbabi G M. Camelid Single-Domain Antibodies: Promises and Challenges as Lifesaving Treatments[J]. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 23: 5009.
- [54] Vander Linden R H, Frenken L G, de Geus B, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies[J]. *Biochem Biophys Acta Gen Subj*, 1999, 1431: 37-46.
- [55] MAJEWSKI I J, KLUIJT I, CATS A, et al. An α -E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer [J]. *The Journal of pathology*, 2013, 229(4): 621-629.
- [56] WADHWAR, SONG S, LEE J S, et al. Gastric cancer-molecular and clinical dimensions [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(11): 643-655.
- [57] CHIA N Y, TAN P. Molecular classification of gastric cancer [J]. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2016, 27(5): 763-769.
- [58] CORTINOVIS D L, CANOVA S, ABBATE M, et al. Focus on Nivolumab in NSCLC [J]. *Frontiers in medicine*, 2016, 3(67): 35-37.
- [59] KATAOKA K, SHIRAISHI Y, TAKEDA Y, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers [J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 402-406.
- [60] BU L L, YU G T, WU L, et al. STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC[J]. *Journal of dental research*, 2017, 96(9): 1027-1034.
- [61] Li B H, Zhao M Y, Zhang F. Rational design of near-infrared-II organic molecular dyes for bioimaging and biosensing[J]. *ACS Materials Letters*, 2020, 2(8): 905-917.
- [62] Kvach M V, Ustinov A V, Stepanova I A, et al. A convenient synthesis of cyanine dyes: reagents for the labeling of biomolecules[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008, 2008(12): 2107-2117.
- [63] Ouyang J, Sun L H, Zeng F, et al. Rational design of stable heptamethine cyanines and development of a biomarker-activatable probe for detecting acute lung/kidney injuries via NIR-II fluorescence imaging[J]. *The Analyst*, 2022, 147(3): 410-416.
- [64] Saremi B, Bandi V, Kazemi S, et al. Exploring NIR azaBODIPY-based polarity sensitive probes with ON-and-OFF fluorescence switching in pluronic nanoparticles[J]. *Polymers*, 2020, 12(3): 540-541.
- [65] Panigrahi M, Dash S, Patel S, et al. Syntheses of cyanines: a review[J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(3): 781-805.

- [66] Ilina K, Henary M. Cyanine dyes containing quinoline moieties: history, synthesis, optical properties, and applications[J]. *Chemistry*, 2021, 27(13): 4230-4248.
- [67] Kamiya M, Asanuma D, Kuranaga E, et al. Beta-galactosidase fluorescence probe with improved cellular accumulation based on a spirocyclized rhodol scaffold[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(33): 12960-12963.
- [68] Kim E J, Kumar R, Sharma A, et al. In vivo imaging of beta-galactosidase stimulated activity in hepatocellular carcinoma using ligand-targeted fluorescent probe[J]. *Biomaterials*, 2017, 122: 83-90.
- [69] Li Y H, Sun Y, Li J C, et al. Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for in vivo nitroreductase imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(19): 6407-6416.
- [70] Kwon N, Hu Y, Yoon J. Fluorescent chemosensors for various analytes including reactive oxygen species, biothiol, metal ions, and toxic gases[J]. *Acs Omega*, 2018, 3(10): 13731-13751.
- [71] Prasad A. S. Discovery of human zinc deficiency: Its impact on human health and disease[J]. *Advances in Nutrition*, 2013, 4(2): 176-190.
- [72] MOUMBOCK A F A, LI J, TRAN H T T, et al. ePharmaLib: A versatile library of e-pharmacophores to address small-molecule(poly-) pharmacology[J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(7): 3659-3666.
- [73] LI C, GUAN X, ZHANG X, et al. NIR-II bioimaging of small molecule fluorophores: from basic research to clinical applications[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 216(26): 114-120.
- [74] HUANG J, PU K. Activatable molecular probes for second near-infrared fluorescence, chemiluminescence, and photoacoustic imaging[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(29): 11717-11731.
- [75] TIAN Y, LIU S, CAO W, et al. H₂O₂-activated NIR-II fluorescent probe with a large stokes shift for high-contrast imaging in drug-induced liver injury mice[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(32): 11321-11328.
- [76] QIN Z, REN T B, ZHOU H, et al. NIRII-HDs: a versatile platform for developing activatable NIR-II fluorogenic probes for reliable in vivo analyte sensing[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61(19): e202201541.
- [77] 朱成斌, 茅芯慧, 王珍. PD1 及 PDL1 在乳腺癌中的表达变化及其与患者临床病理参数和预后的关系[J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(18): 1957-1960.
- [78] BARKER W C, GARAVELLI J S, MCGARVEY P B, et al. The PIR-international protein sequence data base[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 39-43.

- [79] Puzzo Lidia, Bianco Maria Rita, Salvatorelli Lucia, Tinnirello Giordana, Occhiuzzi Federico, Latella Daniele, Allegra Eugenia. CD44, PDL1, and ATG7 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas with Tissue Microarray (TMA) Technique: Evaluation of the Potential Prognostic and Predictive Roles [J]. *Cancers*, 2023, 15(9): 541-543.
- [80] Zhang LiNa, Zhang Hong, Chen ShanYong, Liu YanZhao, Yang XiaoHua, Xiang FeiFan, Liu YanHong, Li Kun, Yu XiaoQi. γ -Glutamyltranspeptidase and pH based "AND" logic gate fluorescent probe for orthotopic breast tumor imaging[J]. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 2023, 12(4): 26-28.
- [81] Patel Grisma, Watts Lauren, Butler Charlotte, Shah Riyaz. 82-Secondary care resource utilisation in patients with high PDL1 and advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSq-NSCLC): a comparison of single agent pembrolizumab with combination chemotherapy + pembrolizumab[J]. *Lung Cancer*, 2023, 178(S1): 156-164.
- [82] BOUTET E, LIEBERHERR D, TOGNOLLI M, et al. UniProt-KB/Swiss- Prot[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 406: 89-112.
- [83] WANG Y, WANG Q, HUANG H, et al. A crowdsourcing open platform for literature curation in UniProt[J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(12): e3001464.
- [84] MACDOUGALL A, VOLYNKIN V, SAIDI R, et al. UniRule: a unified rule resource for automatic annotation in the UniProt Knowledgebase[J]. *Bioinformatics*, 2021, 36:22-23.
- [85] WESTBROOK J D, YOUNG J Y, SHAO C, et al. PDBx/mmCIF ecosystem: foundational semantic tools for structural biology[J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(11): 167599.
- [86] Weiner L M, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(5): 317-327.
- [87] Zhou J, Hu L, Yu Z, Zheng J, Yang D, Bouvet M, Hoffman R M. Marker expression in circulating cancer cells of pancreatic cancer patients[J]. *Surg Res*, 2011, 171(2): 631-636.
- [88] Kircher M F, Hricak H, Larson S M. Molecular imaging for personalized cancer care[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(2): 182-195.
- [89] Kaushal S, McElroy M K, Luiken G A, Talamini M A, Moossa A R, Hoffman R M, Bouvet M. Fluorophore-conjugated anti-CEA antibody for the intraoperative imaging of pancreatic and colorectal cancer[J]. *Gastrointest Surg*, 2008, 12(11): 1938-1950.
- [90] 洪梦佳, 任清榆, 金佳珂, 唐玲, 王师北, 刘立, 吕正兵. 单域抗体的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2018, 25(06): 556-560.
- [91] 李丽, 杨顺利, 张辛铭, 蔡建平, 薛慧文, 尹双辉. 双价猪流行性腹泻病毒特异性双峰驼源单域抗体的重组表达和特征分析[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(07): 1052-1060.

- [92] HOLZLOHNER P, HANACK K. Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology[J]. J Vis Exp, 2017, 2(119): 1-7.
- [93] SHAPIRO E, BIEZUNER T, LINNARSSON S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science[J]. Nature Reviews Genetics, 2013, 14(9): 618-630.
- [94] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [95] MCCAFFERTY J, GRIFFITHS A D, WINTER G, CHISWELL D J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. Nature, 1990, 348(6301): 552-554.
- [96] SHADIDI M, SORENSEN D, DYBWAD A, FURSET G, SIOUD M. Mucosal vaccination with phage-displayed tumour antigens identified through proteomics-based strategy inhibits the growth and metastasis of 4T1 breast adenocarcinoma[J]. International Journal of Oncology, 2008, 32(1): 241-247.
- [97] 侯伟. 噬菌体展示系统的构建及其在疾病防控领域应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(5):1688-1696.
- [98] Holliger P, Hudson P J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(2): 1126-1136.
- [99] Leblond F, Davis S C, Valdes P A, et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications[J]. Photochem Photobiol B, 2010, 98(1): 77-94.
- [100] Hilderbrand S A, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging[J]. Curr Opin Chem Biol, 2010, 14(1): 71-79.
- [101] Hamann P R, Hinman L M, Beyer C F, et al. A calicheamicin conjugate with a fully humanized anti-MUC1 antibody shows potent antitumor effects in breast and ovarian tumor xenografts. Bioconjug Chem, 2005, 16(2): 354-360.
- [102] Dana H, Sun Y, Mohar B, et al. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments[J]. Nat Methods, 2019, 16(7): 649-657.
- [103] Cui S, Yao S Q, Wu C X, et al. Electroacupuncture involved in motor cortex and hypoglossal neural control to improve voluntary swallowing of poststroke dysphagia mice[J]. Neural Plast, 2020, 2020: 8857543.
- [104] 宗伟健. 微型双光子显微镜及自由活动小鼠神经成像[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [105] Liang S X, Lin Y J, Lin B B, et al. Resting-state functional magnetic resonance imaging analysis of brain functional activity in rats with ischemic stroke treated by electro-acupuncture[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26(9): 1953-1959.

-
- [106] Yajuan YE, Wei YT, Jia J, et al. Efficacy of needling Baihui (GV20), Neiguan (PC6), Shenmen (HT7) and Taichong (LR3) on cerebral cortical blood oxygen level in rats with insomnia[J]. J Tradit Chin Med, 2023, 43(3): 523-532.
- [107] Jiang YM, Lin YS, Tan YH, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebrovascular impairment in Alzheimer's disease mice via melatonin signaling[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(3): 917-931.