



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116640210 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 25

(21) 申请号 202310391232.3

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.12

A61K 39/395 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

地址 266101 山东省青岛市崂山区松岭路189号

G01N 33/68 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(72) 发明人 古一 刘文帅 年锐 刘金燕 郭杨

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

专利代理师 王志坤

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

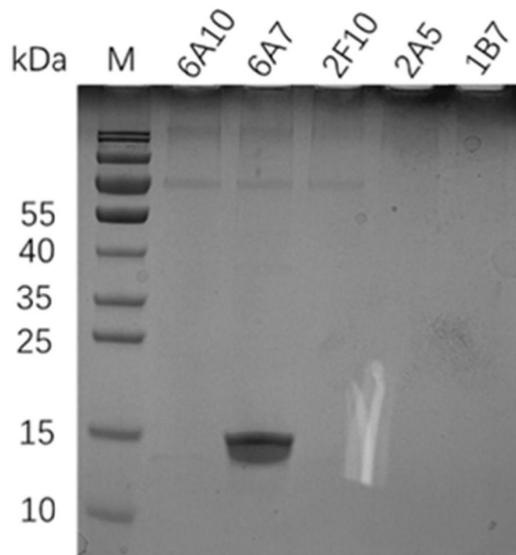
权利要求书1页 说明书9页  
序列表(电子公布) 附图3页

## (54) 发明名称

一种抗人源  $\beta$ -NGF 纳米抗体及其应用

## (57) 摘要

本发明公开了一种抗人源  $\beta$ -NGF (h  $\beta$ -NGF) 的纳米抗体, 纳米抗体6A7对h  $\beta$ -NGF抗原具有特异的识别和结合能力, 该纳米抗体亲和力可达到  $9.493E-09$ , 显示出本发明提供的纳米抗体具有高度特异的结合活性。特别的, 本发明提供的纳米抗体6A7能够明显抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖和迁移。



1. 一种抗人源 $\beta$ -NGF (h $\beta$ -NGF) 的纳米抗体, 其特征在于, 所述纳米抗体包含如SEQ ID NO.1所示的CDR1区域、如SEQ ID NO.2所示的CDR2区域以及如SEQ ID NO.3所示的CDR3区域。

2. 如权利要求1所述的纳米抗体, 其特征在于, 所述纳米抗体的可变区氨基酸序列如下:

(1) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列;

(2) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列进行增加、缺失或替换其中一个或几个氨基酸后, 仍发挥相似生理活性的氨基酸序列;

优选的, 所述纳米抗体还包括对上述(1)或(2)中所述氨基酸序列进行修饰后的衍生多肽, 所述修饰方式包括但不限于官能团修饰或添加聚乙二醇、链霉亲和素、生物素、放射性同位素、荧光剂分子标记; 进一步的, 所述官能团修饰包括采用亲水性基团对FR区域进行修饰或对FR区域的疏水性残基进行替换。

3. 权利要求1~2任一项所述的纳米抗体的核酸物质, 其特征在于, 所述核酸物质包括由于密码子简并性能够翻译得到上述纳米抗体的编码核酸, 所述编码核酸不限于DNA或RNA, 优选的, 所述编码核酸为DNA, 包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA; 所述DNA可以为单链或双链的, 可以为编码链或非编码链。

4. 如权利要求3所述的核酸物质, 其特征在于, 所述纳米抗体的核酸如SEQ ID NO.5所示。

5. 一种载体, 其特征在于, 所述载体含有编码权利要求1~2任一项所述的纳米抗体的核酸物质; 优选的所述载体为表达载体, 所述表达载体包括但不限于细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体; 进一步优选的, 所述表达载体为细菌质粒或酵母质粒。

6. 一种宿主细胞, 其特征在于, 所述宿主细胞包含权利要求3~4任一项所述的核酸物质和/或权利要求5所述的载体;

优选的, 所述宿主细胞为植物细胞或微生物细胞; 进一步的, 所述宿主细胞为微生物细胞, 更进一步的, 所述宿主细胞为大肠杆菌。

7. 权利要求1~2任一项所述的纳米抗体在制备靶向h $\beta$ -NGF药物中的应用。

8. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包含权利要求1~2任一项所述的纳米抗体。

9. 如权利要求8所述的药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物还包含药学上可接受的赋形剂, 优选地, 所述药学上可接受的赋形剂包括以下中的一种或多种: 药学上可接受的溶剂、分散剂、附加剂、塑形剂。

10. 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包含权利要求1~2任一项所述的纳米抗体; 优选的, 所述试剂盒还包括用于对 $\beta$ -NGF抗体反应进行检测的检测试剂、阴性对照、阳性对照。

## 一种抗人源 $\beta$ -NGF纳米抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学或生物制药技术领域,具体涉及一种抗人源 $\beta$ -NGF纳米抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 神经生长因子(NGF)已被证实是一种具有营养神经元、保护神经和促进神经再生等多重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子。临床上已将其开发用于治疗某些神经系统疾病的治疗,例如青光眼和阿尔茨海默病。不仅如此,NGF还可以通过影响免疫细胞的活性从而调节免疫系统功能;抑制某些肿瘤的有丝分裂,使其促良性分化;促进创伤组织的修复及伤口愈合,因此其靶向治疗肿瘤的潜力也逐渐被挖掘出来。NGF具有三个亚单位,分别为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ,其中活性区为 $\beta$ 亚单位,其结构是由118个氨基酸组成的单链通过非共价键结合的二聚体。

[0004] 目前临床使用的NGF多为小鼠基因表达的产物,即小鼠NGF(mNGF),其在国内已被用于治疗人类变性疾病和神经损伤。然而人源NGF(hNGF)的生物学活性要显著高于鼠源NGF,其主要原因可能为成熟mNGF和hNGF之间的氨基酸序列一致性程度仅为90%。虽然NGF的生物效应没有被证实具有明显的种间差异,但是对人类患者施用mNGF可能会诱导免疫对这种外源蛋白的反应。同时,由于序列之间的差异,以mNGF为抗原筛选所得的抗体,其在结合并中和hNGF活性能力上也都有一定的差距。目前人源NGF的生产多采用重组或转基因的方法,但是由于NGF结构的特殊性,重组人NGF很难具有多功能的生物学活性。2017年,一种重组人神经生长因子Cenergermin被欧盟批准作为眼药水治疗成人中度或重度神经营养性角膜炎,但是由于其产量极低,因此造价极高,限制了其临床上的推广及应用。而将人源NGF通过转基因的方法在小鼠体内进行表达,由于其外源基因在小鼠基因组中是随机整合,其表达水平十分不稳定,且最终会同时获得人源NGF和鼠源NGF,其大小形态十分相似,因此很难纯化出纯度较高的人源NGF。

[0005] 在羊驼外周血液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(VHH)和两个常规的CH2与CH3区,但却不像人工改造的单链抗体片段(scFv)那样容易相互沾粘,甚至聚集成块。更重要的是单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性,是已知的可结合目标抗原的最小单位,VHH晶体为2.5nm,长4nm,分子量只有15kDa,此也被称作纳米抗体(Nanobody,Nb)。相对于常规的四链抗体的scFv而言,纳米抗体在亲和力方面与其对应的scFv相当,但在可溶性、稳定性、对聚集的抗性、可重折叠性、表达产率以及DNA操作、文库构建和3-D结构测定的容易性方面超越scFv。且纳米抗体由于分子较小,可穿透血脑屏障、稳定性高,可通过雾化方式给药,不仅提高了给药的便利性,同时也拓宽了药物的应用场景。

## 发明内容

[0006] 为了克服上述问题,本发明提供了一种抗人源 $\beta$ -NGF纳米抗体及其应用。

[0007] 本发明的第一个方面,提供了一种抗人源 $\beta$ -NGF(h $\beta$ -NGF)的纳米抗体,所述纳米抗体包含如SEQ ID NO.1所示的CDR1区域、如SEQ ID NO.2所示的CDR2区域以及如SEQ ID NO.3所示的CDR3区域。

[0008] 优选的,所述纳米抗体的可变区氨基酸序列如下:

[0009] (1)SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列;

[0010] (2)SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列进行增加、缺失或替换其中一个或几个氨基酸后,仍发挥相似生理活性的氨基酸序列。

[0011] 在本发明中筛选得到具有该可变区序列的纳米抗体的一个优选实施例为纳米抗体6A7,所述6A7的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,其中第1-25位氨基酸序列为FR1,第26-33位氨基酸序列为CDR1(如SEQ ID NO.1所示),第34-50位氨基酸序列为FR2,第51-58位氨基酸序列为CDR2(如SEQ ID NO.2所示),第59-96位氨基酸序列为FR3,第97-109位氨基酸序列为CDR3(如SEQ ID NO.3所示),第110-120位氨基酸序列为FR4。

[0012] 优选的,所述纳米抗体还包括对上述(1)或(2)中所述氨基酸序列进行修饰后的衍生多肽,所述修饰方式包括但不限于官能团修饰或添加聚乙二醇、链霉亲和素、生物素、放射性同位素、荧光剂等分子标记;进一步的,所述官能团修饰包括采用亲水性基团对FR区域进行修饰或对FR区域的疏水性残基进行替换。

[0013] 本发明的第二方面,提供上述抗人源 $\beta$ -NGF纳米抗体的核酸物质,所述核酸物质包括由于密码子简并性能够翻译得到上述纳米抗体的编码核酸,所述编码核酸不限于DNA或RNA。

[0014] 优选的,所述编码核酸为DNA,包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA;所述DNA可以为单链或双链的,可以为编码链或非编码链。

[0015] 在一种或多种实施方式中,所述纳米抗体的核酸如SEQ ID NO.5所示。

[0016] 本发明的第三方面,提供一种载体,含有编码上述任一所述的纳米抗体的核酸物质。优选的所述载体为表达载体,所述表达载体包括但不限于细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体;

[0017] 进一步优选的,所述表达载体为细菌质粒或酵母质粒。

[0018] 本发明的第四方面,提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含第二方面所述核酸物质和/或第三方面所述载体。

[0019] 优选的,所述宿主细胞为植物细胞或微生物细胞;进一步的,所述宿主细胞为微生物细胞,更进一步的,采用大肠杆菌作为宿主细胞。

[0020] 本发明的第五方面,提供上述纳米抗体在制备靶向h $\beta$ -NGF药物中的应用。

[0021] 本发明的第六方面,提供一种药物组合物,所述药物组合物包含上述纳米抗体。优选地,所述药物组合物还包含药学上可接受的赋形剂,优选地,所述药学上可接受的赋形剂包括以下中的一种或多种:药学上可接受的溶剂、分散剂、附加剂、塑形剂等。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的载体介质中。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括但不限于:瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0022] 本发明的第七方面,提供一种试剂盒,所述试剂盒包含上述纳米抗体,优选的,所

述试剂盒还包括用于对 $\beta$ -NGF抗体反应进行检测的检测试剂、阴性对照、阳性对照。

[0023] 本发明提供的纳米抗体6A7对h $\beta$ -NGF抗原具有特异的识别和结合能力,该纳米抗体亲和力可达到 $9.493E-09$ ,显示出本发明提供的纳米抗体具有高度特异的结合活性。特别的,本发明提供的纳米抗体6A7能够明显抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖和迁移。

### 附图说明

[0024] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0025] 图1为抗原包被量的优化;

[0026] 图2为纳米抗体氨基酸序列比对图;

[0027] 图3为SDS-PAGE分析五株纳米抗体表达及纯化情况;

[0028] 图4为SPR分析纳米抗体与抗原的亲和力;

[0029] 图5为MCF-7细胞增殖活性和NGF分泌量检测,其中A为将MCF-7细胞分别在0% FBS和10% FBS情况下分别培养24h、48h和72h后,采用CCK8对细胞增殖情况进行检测结果图;B为分别在培养24h、48h和72h后收集0% FBS和10% FBS培养下MCF-7细胞上清,采用商品化NGF检测试剂盒对上清中NGF含量进行检测检测结果图;

[0030] 图6为纳米抗体6A7抑制MCF-7细胞增殖作用,其中A为将不同浓度的6A7抗体与MCF-7细胞在无血清情况下孵育72h后,利用CCK8对细胞增值情况进行验证结果图;B为将浓度为5nM的6A7抗体与MCF-7细胞分别孵育24h、48h和72h后,采用CCK8试剂对细胞增殖情况进行检测结果图;

[0031] 图7为纳米抗体6A7抑制MCF-7细胞迁移作用,其中A为将细胞融合为单细胞层后认为制造划痕,添加终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米抗体后细胞划痕愈合速度明显降低,左侧纵列为空白对照,右侧纵列为实验组;B为通过Image J分析划痕距离对6A7抑制MCF-7细胞迁移进行评价结果图。

### 具体实施方式

[0032] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0033] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0034] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0035] 实施例1纳米抗体的筛选与表达

[0036] 1.1M13噬菌体扩增

[0037] 取复苏的菌液接种至YT-AG培养基中, $37^{\circ}\text{C}$  200rpm培养到培养物 $\text{OD}_{600}=0.5$ 。取出10mL菌液加入 $4\times 10^{10}$ VCSM13, $37^{\circ}\text{C}$ 静止感染30min。4000rpm,常温离心10min,去净上清。用2

×YT-AK (含氨苄青霉素和卡那霉素) 培养基重悬菌体, 37℃ 200rpm 培养过夜。离心取上清 40mL 于管中, 加入 10mL PEG/NaCl (20%/2.5M) 溶液充分混合, 离心弃上清, 沉淀用 1mL 冰 PBS 洗涤离心, 取上清 250μL 预冷的 PEG/NaCl, 充分混匀并洗涤重悬。

[0038] 测定噬菌体滴度: 将 TG1 培养至  $OD_{600}=0.4$ , 用 LB 培养基梯度稀释噬菌体, 取倍比稀释的噬菌体 TG1 培养物混合培养, 次日观察培养板中噬菌斑形成情况, 对噬菌斑数在 30-300 的稀释梯度平板进行计数并按照下列公式计算噬菌体滴度 (pfu)。

[0039] 噬菌体滴度 (pfu/mL) = 稀释倍数 × 噬菌斑数目 × 100

[0040] 1.2 纳米抗体的噬菌体展示

[0041] 取 1mL 纳米抗体半合成文库的菌液分别接种至 2 个 10mL 的 2×YT-AG 培养基中, 37℃, 200rpm 培养至  $OD_{600}=0.5$ , 每管加入  $4 \times 10^{10}$  pfu 辅助噬菌体, 37℃ 静止侵染 30min; 4000rpm 常温离心 10min, 弃上清后加入 3mL 的 2×YT-AK 培养基重悬, 最后加入到 100mL 的 2YT-AK 培养液中, 37℃, 200rpm 培养过夜。次日对展示噬菌体进行浓缩及沉淀, 并测定滴度。

[0042] 展示噬菌体滴度 (cfu/mL) = 稀释倍数 × 菌落数 × 100 × 2

[0043] 1.3 液相淘选展示特异性噬菌体

[0044] 本实施例中所有 EP 管, 均预先加满含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液, 室温静置 10min, 对管壁进行封闭处理, 以减少管壁对微量蛋白的吸附影响筛选结果。

[0045] 1.3.1 β-NGF 蛋白生物素化标记

[0046] 使用博奥龙生物素标记试剂盒对 β-NGF 蛋白进行生物素标记, 以用于后续抗体的筛选。将待标记蛋白 (蛋白量在 0.3-1mg) 置于超滤管内, 加入适量体积的标记缓冲液将体积调整至 500μL, 离心机 12000g 离心 10min, 加入对应量的游离生物素, 并通过标记缓冲液将超滤管内体积调整至 500μL, 轻轻吹打混匀后, 37℃ 培养箱中避光孵育 30min。12000g 离心 10min 后, 使用标记缓冲液重新将体积补充至 500μL, 轻轻吹打混匀后 12000g 离心 10min, 反复洗涤 6-8 次后, 收集超滤管内样品, 分装后 -20℃ 保存。

[0047] 1.3.2 磁珠封闭

[0048] 吸取 150μL 10mg/mL 的链霉亲和素标记磁珠和 850μL TBST 溶液 (含有 0.1% Tween20 的 TBS 缓冲液) 加入 2mL 离心管内, 旋转混匀, 将离心管放置在磁性支架上静置 2min, 用移液器将离心管内上清移去, 重复洗涤三次。将洗涤后的磁珠重悬于 1.5mL 含有 1% BSA 的 TBS 缓冲液中, 室温旋转封闭 1h。

[0049] 1.3.3 确定磁珠/抗原包被条件

[0050] 取 2mL 封闭后磁珠, 分别装入 4 个 2mL 离心管内, 放置在磁性支架上静置 2min, 弃上清后每管用 50μL TBS 重悬, 向 3 个管内加入 3μg、6μg、10μg 生物素化后 β-NGF 蛋白, 最后一管加入 5μL TBS。室温下旋转混合器孵育 1h。磁性支架上静置 2min, 将上清转移至新的 1.5mL 离心管内, 对应标记。磁珠用 1mL TBS 重悬沉淀, 洗涤 3 次。最后用 50μL TBS 重悬沉淀, 将孵育后上清和最后沉淀通过 SDS-PAGE 鉴定磁珠/抗原包被条件 (图 1: M 为蛋白 Marker, 1 为 3μg NGF 蛋白条带, 2 为 3μg NGF 蛋白与磁珠孵育后上清条带, 3 为 6μg NGF 蛋白条带, 4 为 6μg NGF 蛋白与磁珠孵育后上清条带, 5 为 10μg NGF 蛋白条带, 6 为 10μg NGF 蛋白与磁珠孵育后条带)。结果显示当抗原孵育量为 6μg 时, 孵育后上清中在 β-NGF 条带处有极微弱条带, 因此我们确定第一轮筛选的抗原包被量为 5μg。

[0051] 1.3.4 包被磁珠

[0052] 取500 $\mu$ L封闭后的磁珠与2nmol的游离生物素混合,另取500 $\mu$ L磁珠,加入5 $\mu$ g bio- $\beta$ -NGF蛋白,利用上述方法进行包被,最后分别使用50 $\mu$ L 1% BSA的TBS缓冲液重悬与游离生物素(Bio-beads)或bio- $\beta$ -NGF ( $\beta$ -NGF-beads)孵育后磁珠。

[0053] 1.3.5负筛选

[0054] 取20 $\mu$ L生物素包被磁珠 (Bio-beads) 与1.1mL抗体库混合 (将CDR3区8aa、12aa、和16aa三种文库所得沉淀噬菌体混合在一起),4 $^{\circ}$ C条件下在旋转混合器孵育过夜,上清液 (Input) 转移至新的离心管内,取10 $\mu$ L上清液用于后续滴度测定。剩余磁珠加入20 $\mu$ L TBS放置于4 $^{\circ}$ C保存(0管),用于后续和实验组、对照组一起洗涤、洗脱和滴度测定。

[0055] 1.3.6阳性噬菌体第一轮淘选

[0056] 将上述复筛后上清液 (Input) 分别转移至2个1.5mL离心管内,A管1.5mL,B管100 $\mu$ L (加入900 $\mu$ L 1%Tween20的PBS缓冲液)。向A管内加入50 $\mu$ L $\beta$ -NGF包被磁珠 ( $\beta$ -NGF-beads),向B管内加入5 $\mu$ L生物素包被磁珠 (Bio-beads),在旋转混合器上室温孵育1h。磁性支架分离磁珠,弃去上清液(加甘油-20 $^{\circ}$ C冻存)。用含0.05%Tween20的TBST溶液洗涤磁珠10次(A管、B管、0管),离心管内加入甘氨酸溶液(0.2M,pH8.0)洗涤磁珠,在旋转混合器上室温孵育15min(A管和0管加入1mL甘氨酸溶液,B管加入100 $\mu$ L甘氨酸溶液),磁性支架吸附磁珠后,取上清并立即加入Tris-HCl溶液(1M,pH9.1,A管和0管加入150 $\mu$ L,B管加入15 $\mu$ L),混合均匀防止局部碱性过高造成噬菌体死亡。最终洗脱下来的噬菌体(output A/B/0)经0.22 $\mu$ m无菌滤膜在超净工作台中过滤,进行滴度测定。

[0057] 1.3.7次级库制备及次级淘选

[0058] 培养新鲜的TG1,37 $^{\circ}$ C、200rpm,震荡培养4-5h,至OD<sub>600nm</sub>=0.5左右。取23个2mL无菌离心管,每管加入200 $\mu$ L新鲜制备的TG1菌液,其中22管每管各加入50 $\mu$ L实验组洗脱液 (output A),另外一管加入50 $\mu$ L无菌PBS作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C培养箱中静置30min。每2管感染后的TG1细胞混合,均匀的涂布在2YT-AG(含终浓度100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素)固体平板(150mm);同时将阴性对照均匀涂布在2YT-AG固体平板(90mm),37 $^{\circ}$ C培养箱中倒置培养过夜。次日若阴性对照平板未长菌则表明实验组扩增库无污染。用细胞刮刀轻轻刮取实验组涂布的固定平板,使用10mL 2YT-AG培养基中,即为次级库,加入甘油使甘油终浓度为20%,标记后-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。按照第一轮的筛选方法对次级库进行第二轮筛选,其中第二轮筛选 $\beta$ -NGF包被量减少为3 $\mu$ g,洗涤次数提高至15次;第三轮筛选 $\beta$ -NGF包被量减少为1.5 $\mu$ g,洗涤次数提高至20次;第三轮筛选包被量不变,洗涤次数提高至30次。

[0059] 1.4 Phage ELISA筛选阳性克隆

[0060] 从上述过夜培养的96孔细胞培养板中分别取50 $\mu$ L菌液接种于无菌96孔深孔培养板内(每孔含有200 $\mu$ L 2YT-A液体培养基),对应标记。将96孔深孔培养板于37 $^{\circ}$ C、200rpm培养3h至OD<sub>600nm</sub>至0.5。每孔加入10 $\mu$ L浓度为10<sup>11</sup>PFU/mL的辅助噬菌体。37 $^{\circ}$ C培养箱中静置培养30min。配置优化2YT-AK培养基(终浓度为100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素和70 $\mu$ g/mL卡那霉素),向96孔深孔板内每孔加入0.7mL优化培养基,反复吹打混匀后,37 $^{\circ}$ C、200rpm摇床内过夜培养(至少15h)。次日将96孔深孔培养板进行离心,4800rpm离心10min,取500 $\mu$ L上清至新的无菌96孔细胞培养板内,4 $^{\circ}$ C保存。

[0061] 利用包被缓冲液CBS将抗原 $\beta$ -NGF浓度调整为5 $\mu$ g/mL,按照每孔100 $\mu$ L接入酶标板内,封板膜密封后,4 $^{\circ}$ C静置过夜(15h)。次日弃上清,每孔加入300 $\mu$ L封闭液(含1% BSA的

PBS溶液),封板膜密封37℃培养箱中静置封闭1h。弃上清后每孔加入300μL清洗液(含0.5% Tween20的PBS溶液),于水平摇床上以50rpm室温孵育5min,弃上清于吸水纸上拍打3-5次使孔内残余液体除净,重复5次。每板1-10列,每孔加入100μL上一步所得上清。每板第11列的A-D孔作为阳性对照,每孔加入100μL anti-β-NGF抗体。每板第12列作为阴性对照,A-D孔加入100μL培养的TG1菌离心后上清,E-H孔加入100μL辅助噬菌体(109PFU/孔)。封板膜密封37℃培养箱中静置孵育1h。使用清洗液清洗5次。阳性对照孔加入anti-Rabbit Fc-HRP,其余孔加入anti-M13-HRP。封板膜密封37℃培养箱中静置孵育1h。使用清洗液清洗5次。每孔加入100μLTMB溶液,室温避光孵育10-15min。每孔加入100μL硫酸终止液(2M),酶标仪于450nm处进行读数。阳性对照孔读值/阴性对照孔读值 $\geq 2$ 时判定实验结果可信。实验组与阴性对照孔比值大于等于2.1判定为阳性孔。所有阳性单克隆菌株送青岛擎科公司进行测序。共获得五株阳性克隆,分别为1B7、2A5、2F10、6A10和6A7。序列对比图见图2。

#### [0062] 1.5纳米抗体的诱导表达

[0063] 挑选结果阳性的克隆,将含有纳米抗体核酸的原始菌株TG1甘油菌,按照1:1000比例接种于5mL新鲜的LB-A培养基,37℃200rpm过夜培养。次日,使用Plasmid mini kit (OMEGA)按照说明书提取质粒。经验证后将上述质粒1μL转化于100μL感受态细胞中,轻轻混匀,在冰上放置30min,42℃水浴热激90s,冰浴冷却3min。向离心管加入600μL LB培养基,37℃振荡培养60min。取上清100μL,用三角涂布器涂布在LB-A平板上,37℃倒置培养过夜。

[0064] 挑取上述单克隆菌落于LB-A培养基中,37℃振荡培养过夜。次日,取该菌液按照1:100比例加入100mL新鲜LB-A培养基,37℃振荡培养3h至菌液 $OD_{600nm} = 0.8$ 左右,加入终浓度为1mM IPTG,30℃诱导过夜。第三日,8000rpm,离心10min收集菌体,加入1.5mL的预冷TES缓冲液重悬沉淀。冰浴2min后,轻柔振荡30s,重复此循环6次。加3.0mL TES/4(将TES用水稀释4倍),轻柔振荡30s后,冰浴静置2min,同样重复振荡和静置步骤共6次。9000rpm,4℃离心10min,收集约4.5mL的上清(周质提取物)。

#### [0065] 1.6纳米抗体的纯化和鉴定

[0066] 将IMAC Sepharose (GE公司)重悬后,取2mL加入到重力柱内,静置30min,使sepharose自然沉降于重力柱底部,流出保存缓冲液。加入2倍柱体积的硫酸镍溶液(0.1M),按照约8s/滴的流速流出硫酸镍溶液;加入10倍柱体积的平衡缓冲液平衡并洗涤sepharose,流速维持不变;将样品使用平衡缓冲液2倍稀释后,加入重力柱中,调节流速为6s/滴,收集穿透液;加入10倍柱体积洗涤缓冲液洗涤sepharose,维持流速不变,收集洗涤液;加入3倍柱体积的洗脱缓冲液,流速维持在6s/滴,收集含有目的蛋白的洗脱液;最后依次加入10倍柱体积的平衡缓冲液、10倍柱体积的纯水和10倍柱体积的20%乙醇洗涤sepharose,并最终保留4mL的20%乙醇来保存柱子。上述收集的样品分别进行SDS-PAGE检测(图3:M为Thermo fisher蛋白Marker,货号26616;其余泳道为纯化后的纳米抗体)。结果图显示,只有6A7表达出来,其余四株抗体均未表达或者表达量极低。

[0067] 用Vector NTI软件对6A7的氨基酸序列进行抗体重链分析,以确定可变区的框架区(Framework Regions,FR)和互补决定区(Complementary Determining Regions,CDR)。

[0068] 本发明筛选到的一个优选实施方案的纳米抗体被命名为“6A7”。通过DNA测序,所述纳米抗体6A7重链核酸序列为SEQ ID NO.5所示,可变区氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示,其中第1-25位氨基酸序列为FR1,第26-33位氨基酸序列为CDR1(如SEQ ID NO.1所示),第

34-50位氨基酸序列为FR2,第51-58位氨基酸序列为CDR2(如SEQ ID NO.2所示),第59-96位氨基酸序列为FR3,第97-109位氨基酸序列为CDR3(如SEQ ID NO.3所示),第110-120位氨基酸序列为FR4。

[0069] 实施例2纳米抗体与抗原的亲合活性测定

[0070] 2.1芯片抗原偶联

[0071] 将hβ-NGF用不同pH的醋酸钠缓冲液(pH5.5,pH5.0,pH4.5,pH4.0)配制成50μg/mL的工作液,同时准备50mM的NaOH再生溶液,利用Biacore T100蛋白相互作用分析系统仪器中的模板方法对不同pH条件的抗原与芯片(GE公司)表面之间的静电结合进行分析,以信号增加的量达到5倍RL为标准,选择合适的最偏中性的pH体系并根据需要调整抗原浓度作为偶联时的条件。按照仪器中自带的模板方法对芯片进行偶联:其中1通道选择空白偶联模式,2通道选择Target偶联模式,目标设置为设计好的理论偶联量,偶联过程大概耗时60min。

[0072] 2.2分析物浓度设置条件探索及再生条件优化

[0073] 采取手动进样模式,选择1,2通道2-1模式进样,流速设置为30μL/min。进样条件均为120s,30μL/min。再生条件均为30s,30μL/min。首先持续空走运行缓冲液直至所有基线均稳定。准备浓度跨度较大的纳米抗体溶液,以运行缓冲液配置,建议设置200μg/mL,150μg/mL,100μg/mL,50μg/mL,20μg/mL,10μg/mL,2μg/mL。准备再生溶液,选择谷氨酸盐酸体系四个pH梯度的再生溶液:1.5,2.0,2.5,3.0。手动进样200μg/mL分析物样品,观察2通道,从最偏中性pH的再生缓冲液进行再生,直至2通道再生后的响应线回到与基线同一高度。再手动进样一次200μg/mL分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量,用上一步中最后使响应线回到基线的再生溶液进行再生后,再次收手动进样200μg/mL分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量与刚才的结合量数值对比,若偏差小于5%,即认为此pH的再生溶液为最佳的再生溶液,若再次进样的结合量偏低,则继续以更低pH的再生缓冲液进行实验。以选择的最佳再生溶液,作为每次进样后的芯片表面再生试剂。分别进样上面设置的分析物浓度样品,并对每个浓度的结合量进行分析,最终确定亲和力测试所需的浓度梯度。

[0074] 2.3亲和力测试

[0075] 按优化好的样品浓度梯度,再生溶液,使用仪器自带的模板方法(其中设置进样条件为60s,30μL/min;解离时间:600s;再生条件:30s,30μL/min)对纳米抗体及抗原之间的亲和力进行测试。随时观察2-1通道的信号情况。亲和力测试过程大概耗时200min。

[0076] 2.4结果分析

[0077] 选择合适的几个浓度梯度的结合解离曲线采用1:1binding的模式对所有曲线进行拟合,最终得到亲和力数值及结合常数和解离常数等重要参数(见图4:横坐标为时间,单位为秒;纵坐标为响应值,单位为RU)。结果显示,6A7纳米抗体可特异性结合偶联在芯片上的hβ-NGF蛋白,亲和力为 $9.493 \times 10^{-9}$ 。

[0078] 实施例3纳米抗体的活性分析

[0079] 3.1乳腺癌细胞MCF-7分泌β-NGF的检测

[0080] 将处于日常培养的MCF-7细胞消化后浓度调整为30000个/mL,接种于96孔细胞培养板内,每孔100μL。经过10h细胞贴壁后,将一组细胞培养液更换为完全培养液,另一组更换为基础培养液(无FBS),培养箱中静置培养,分别在培养24h、48h和72h后收取对应孔上

清。利用商品化 $\beta$ -NGF检测试剂盒对上清中含量进行检测。将试剂盒提前室温平衡,取100 $\mu$ L上清样品或标准品加入对应孔内,37 $^{\circ}$ C孵育90min后,使用洗涤液清洗五次后每孔加入100 $\mu$ L提前稀释好的生物素化检测抗体(稀释30min内使用),37 $^{\circ}$ C孵育60min再次清洗,最后加入100 $\mu$ L酶结合物工作液后37 $^{\circ}$ C孵育30min。洗板后加入100 $\mu$ L显色底物,37 $^{\circ}$ C避光保存15min,加入50 $\mu$ L终止液后酶标仪450nm处读数。结果见图5(A为将MCF-7细胞分别在0% FBS和10% FBS情况下分别培养24h、48h和72h后,采用CCK8对细胞增殖情况进行检测,横坐标为时间,单位为小时,纵坐标为OD<sub>450</sub>值;B为分别在培养24h、48h和72h后收集0% FBS和10% FBS培养下MCF-7细胞上清,采用商品化NGF检测试剂盒对上清中NGF含量进行检测,横坐标为时间,单位为小时,纵坐标为NGF浓度,单位为ng/L),通过对不同浓度血清培养条件下,不同时间点细胞上清中 $\beta$ -NGF浓度进行测定发现,随着培养时间的增长、血清浓度的降低,培养液中 $\beta$ -NGF含量明显升高。在无血清培养72h后,培养液中 $\beta$ -NGF的含量达到97.68ng/L。这个结果说明,在细胞缺少营养成分的时候,会通过分泌 $\beta$ -NGF从而达到适应性状态。

### [0081] 3.2MCF-7细胞增殖活性检测

[0082] 将细胞消化后浓度调整为30000个/mL,接种于96孔细胞培养板内,每孔100 $\mu$ L。第二天弃上清培养液,每孔加入100 $\mu$ L无菌PBS溶液,轻轻摇晃后弃掉。每孔分别加入100 $\mu$ L由基础培养液稀释的不同浓度的纳米抗体(5、50、500、1000、2500、5000、10000、20000、50000pM),培养箱中孵育,对照孔仅加入100 $\mu$ L基础培养液。孵育72h后,弃上清,每孔加入含10% CCK8(v/v)的基础培养液,培养箱中静置孵育2h后,酶标仪检测OD<sub>450nm</sub>处读数。

[0083] 按照拟合后的半数抑制浓度将纳米抗体6A7进行稀释后,与MCF-7细胞在无血清情况下分别培养24h、48h和72h,通过CCK8对细胞增殖情况进行检测。结果见图6(A为将不同浓度的6A7抗体与MCF-7细胞在无血清情况下孵育72h后,利用CCK8对细胞增殖情况进行验证,横坐标为浓度的对数,单位为pM,纵坐标为细胞抑制率;B为将浓度为5nM的6A7抗体与MCF-7细胞分别孵育24h、48h和72h后,采用CCK8试剂对细胞增殖情况进行检测,横坐标为时间,单位为小时,纵坐标为细胞抑制率),将表达的6A7抗体稀释成不同浓度后与MCF-7细胞共孵育,加入CCK8试剂检测抗体对细胞增殖的影响。随着抗体浓度的升高,MCF-7细胞增殖速率明显降低,在抗体浓度达到10000pM时,抗体对MCF-7增殖抑制率达到最高。之后抗体浓度升高就不会再提高对细胞的抑制率。经过对数据进行拟合,纳米抗体6A7对NGF的IC<sub>50</sub>为5433pM。将6A7浓度调整为5nM后与MCF-7分别孵育不同时间,结果显示,随着时间的推移,6A7对MCF-7细胞增殖的抑制效果越来越明显。由此说明,6A7可以中和NGF对MCF-7细胞的增殖促进作用,并且抑制效果与抗体浓度、作用时间呈正相关。

### [0084] 3.3MCF-7细胞迁移实验

[0085] 使用格尺在6孔板背面做好横线标记,每隔0.5cm一条线,将MCF-7细胞消化为单细胞后,使用完全培养液将细胞浓度调整为10<sup>6</sup>个/mL,每孔加入500 $\mu$ L细胞悬液。细胞培养箱中静置培养过夜。使用无菌黄枪头垂直于标记横线进行划痕,弃培养液后使用PBS洗三次,空白对照孔加入500 $\mu$ L基础培养液,样品孔中加入含10 $\mu$ g/mL的基础培养液。细胞培养箱中培养。分别在0h、12h和24h取出细胞进行拍照并测量划痕距离。结果见图7(A为将细胞融合为单细胞层后认为制造划痕,添加终浓度为10 $\mu$ g/mL纳米抗体后细胞划痕愈合速度明显降低,左侧纵列为空白对照,右侧纵列为实验组;B为通过Image J分析划痕距离对6A7抑制MCF-7细胞迁移进行评价,横坐标为时间,单位为小时,纵坐标为MCF-7的划痕宽度比例,单

位为%)，根据Image J测定结果显示，在划痕后24h，未添加纳米抗体的对照孔内划痕已经愈合，而添加10 $\mu$ g/mL纳米抗体6A7的处理孔，24h后划痕仅恢复31% ( $P < 0.001$ )。由此说明，6A7纳米抗体明显抑制了细胞的迁移作用。

[0086] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

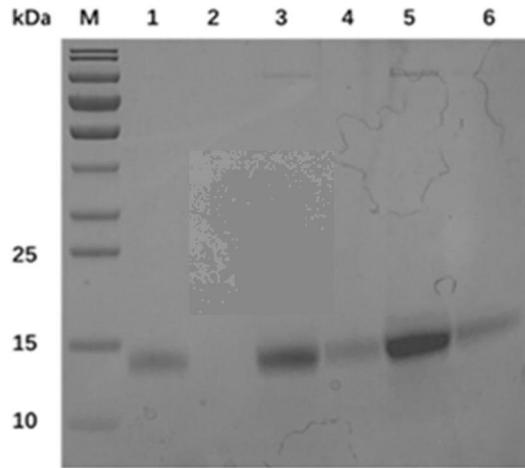


图1

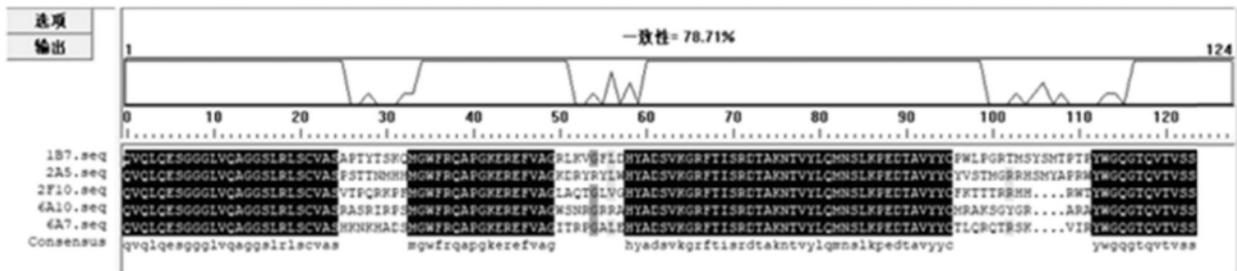


图2

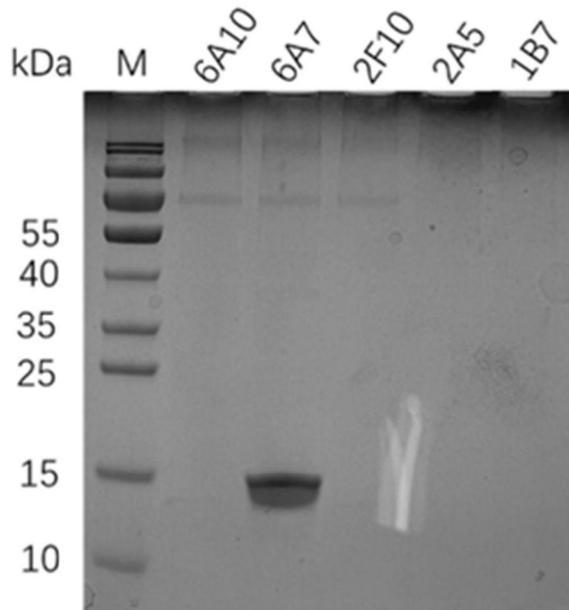


图3

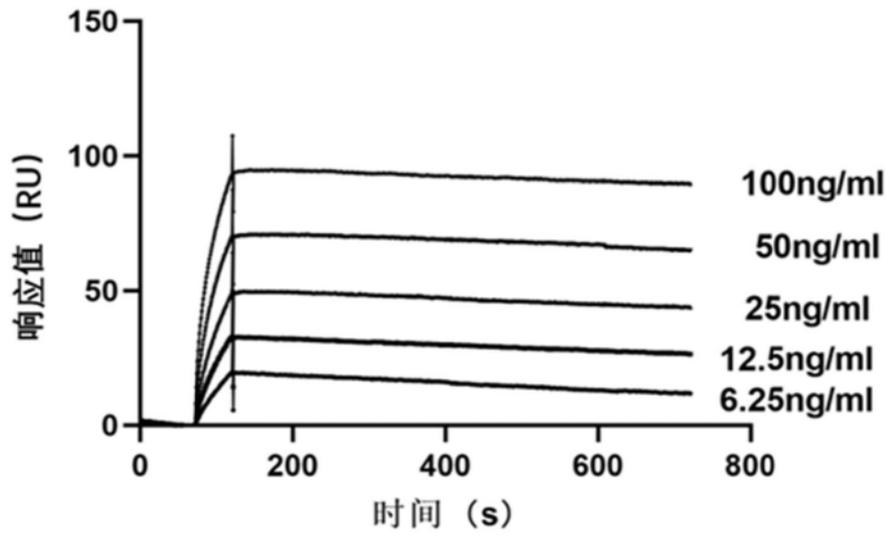


图4

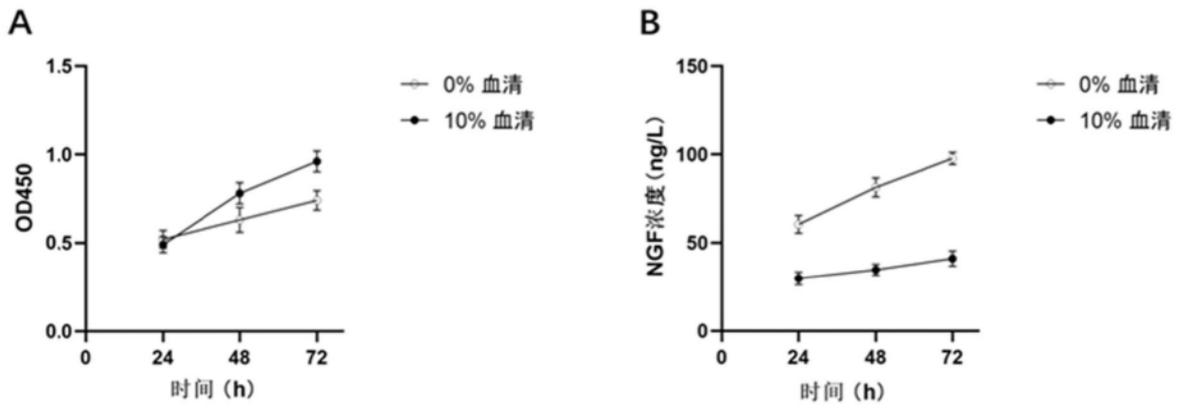


图5

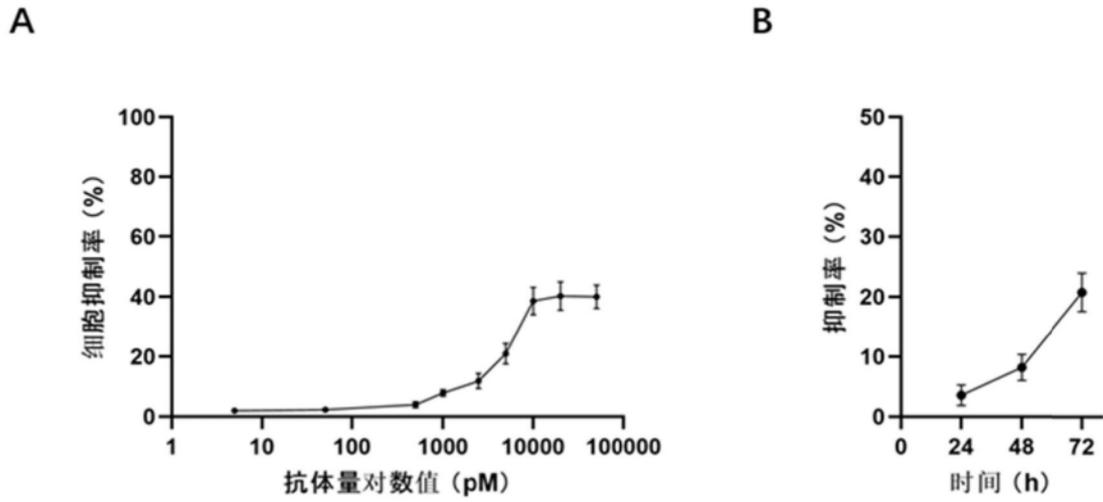


图6

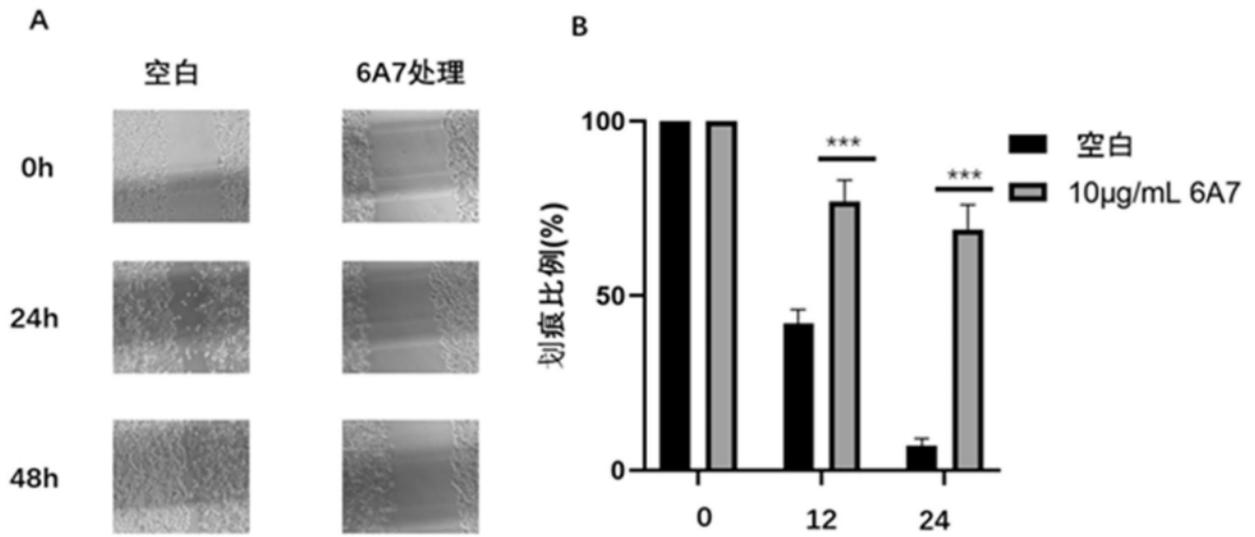


图7