



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111909272 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 23

(21) 申请号 202010808068.8

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.08.12

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109265548 A, 2019.01.25

申请公布号 CN 111909272 A

WO 2016061142 A1, 2016.04.21

CN 110305210 A, 2019.10.08

(43) 申请公布日 2020.11.10

刘星, 陈奇. 鲨鱼单域抗体的研究进展. 《生物工程学报》. 2020, 第1069-1082页.

(73) 专利权人 华东理工大学

Fei Zhang等. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

checkpoint blockade. 《Cell Discovery》. 2017, 17004第1-12页.

(72) 发明人 郑文云 刘秋丽 马兴元

审查员 罗洋

(74) 专利代理机构 上海三和万国知识产权代理
事务所(普通合伙) 31230

专利代理师 张民华

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

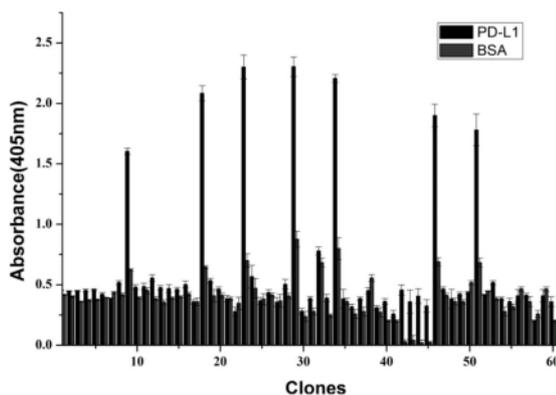
序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

抗PD-L1纳米抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种抗PD-L1纳米抗体及其应用,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV区;所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.8—SEQ ID NO.12任一所示的CDR3区;所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。本发明基于新型鲨鱼V-NAR框架序列所筛选的抗PD-L1纳米抗体,具有优良的稳定性,可为新型抗肿瘤药物研发与获得提供新品种。



1. 抗PD-L1纳米抗体,其特征在于,所述抗体的序列如Anti-PD-L1-NbP1、Anti-PD-L1-NbP2、Anti-PD-L1-NbP3、Anti-PD-L1-NbP4和Anti-PD-L1-NbP5 任一所示,其中

Anti-PD-L1-NbP1:ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDASYGLGS TCWYRKKSGSTNEESISKGGRY
VETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGVPVSWGRVCAWWSLHCLRFLFGCGDGTAVTVNP;

Anti-PD-L1-NbP2:ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDASYGLGS TCWYRKKSGSTNEESISKGGRY
VETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGV LGGPFGVRCAMYRWWCGLRRRTC G DGTAVTVNP;

Anti-PD-L1-NbP3:ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDASYGLGS TCWYRKKSGSTNEESISKGGRY
VETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGVGTELRFWFCMWMKMLLCVIRGWLVC DGTAVTVNP;

Anti-PD-L1-NbP4:ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDASYGLGS TCWYRKKSGSTNEESISKGGRY
VETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGVGFVWGLVYLCLRF C DGTAVTVNP;

Anti-PD-L1-NbP5:ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDASYGLGS TCWYRKKSGSTNEESISKGGRY
VETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGVVPLCMFVFCMLV C DGTAVTVNP。

2. 一种多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸编码权利要求1所述抗体。

3. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有权利要求2所述多核苷酸。

4. 一种抗体药物偶联物,其特征在于,所述抗体药物偶联物含有权利要求1所述抗体。

5. 权利要求1所述抗PD-L1纳米抗体的应用,其特征在于,用于制备检测PD-L1分子的试剂或者用于制备治疗肿瘤的药物。

抗PD-L1纳米抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学与分子生物学领域,尤其涉及基于构建的鲨鱼抗体可变区(V-NAR)噬菌体合成肽库筛选获得的抗PD-L1纳米抗体和应用。

背景技术

[0002] 鲨鱼体内存在一类只含重链的抗体IgNAR,其可变区V-NAR是目前已知分子量最小的抗体片段,被称为纳米抗体。V-NAR具有亲和力高、稳定性强、可溶性好、易偶联改造和良好的组织渗透能力等优势,因而在生物医药行业具有广阔的应用前景。

[0003] 噬菌体展示库是目前构建文库广泛应用的方法。虽然免疫文库的抗体靶特异性较高,但是其存在局限性。例如,不仅免疫时间过长,只针对单一的免疫抗原,而且对抗原的要求也苛刻。天然文库的多样性较为丰富,但其文库的抗体结合力较弱。然而,合成抗体库具有库容大、多样性丰富、可用于筛选多种抗原以及生产成本低等优势,是目前高亲和力抗体获得的主要来源,对于V-NAR类药物的研发有重要意义。

[0004] 目前,免疫疗法已成为治疗癌症的有效手段之一,最常用的治疗方式为阻断程序性死亡配体-1(programmed cell death 1ligand,PD-L1)免疫检查点。已发现多种肿瘤细胞均过表达PD-L1,PD-L1可与T细胞表面的PD-1结合,从而抑制T细胞的活化增殖,最终导致肿瘤细胞免疫逃逸。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于,提供一种抗PD-L1纳米抗体,基于鲨鱼抗体可变区(V-NAR)噬菌体的合成肽库筛选而得,与PD-L1特异性结合,可阻断PD-1与PD-L1的结合,并具有优良的稳定性。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供了一种抗PD-L1纳米抗体,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV区;

[0007] 所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;

[0008] 所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.8—SEQ ID NO.12任一所示的CDR3区;

[0009] 所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。

[0010] 作为一个优选方案,抗PD-L1纳米抗体,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV区;所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.8所示的CDR3区;所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。

[0011] 作为一个优选方案,抗PD-L1纳米抗体,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV

区;所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.9所示的CDR3区;所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。

[0012] 作为一个优选方案,抗PD-L1纳米抗体,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV区;所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.10所示的CDR3区;所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。

[0013] 作为一个优选方案,抗PD-L1纳米抗体,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV区;所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.11所示的CDR3区;所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。

[0014] 作为一个优选方案,抗PD-L1纳米抗体,所述抗体的序列包括FR区、CDR区以及HV区;所述FR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的FR1区、SEQ ID NO.2所示的FR2区、SEQ ID NO.3所示的FR3区和SEQ ID NO.4所示的FR4区;所述CDR区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的CDR1区和SEQ ID NO.12所示的CDR3区;所述HV区包括氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的HV2区和SEQ ID NO.7所示的HV4区。

[0015] 本发明所述抗体包含一个或多个氨基酸置换、添加和/或缺失,或在非CDR区域内的残基中有一个或多个保守氨基酸置换。

[0016] 在本发明的另一方面,提供了一种多核苷酸,所述多核苷酸编码上述抗体。

[0017] 在本发明的另一方面,提供了一种表达载体,所述表达载体含上述多核苷酸。

[0018] 在本发明的另一方面,提供了一种抗体药物偶联物,所述抗体药物偶联物含有上述抗体。

[0019] 在本发明的另一方面,提供了所述抗PD-L1纳米抗体的应用,用于制备检测PD-L1分子的试剂或者用于制备治疗肿瘤的药物。

[0020] 为了构建多样性丰富、通用性好以及无抗原偏向性的高容量合成鲨鱼V-NAR噬菌体库,本发明通过设计一种新型鲨鱼V-NAR框架,以此框架为基础,并使用NNK的方法在CDR3区中引入突变,构建获得了库容为 1.9×10^9 cfu的基于鲨鱼抗体IgNAR可变区(V-NAR)的合成噬菌体库,并且基因插入率100%,多样性丰富。此外,从噬菌体库中筛选获得PD-L1特异性纳米抗体,其均与PD-L1特异性结合,可阻断PD-1与PD-L1的结合,并具有优良的稳定性。所以,可证实所构建的V-NAR噬菌体库具有生物学活性,可作为其它抗原的通用筛选平台。

[0021] 本发明的优点在于,本发明基于新型鲨鱼V-NAR框架序列所筛选的抗PD-L1纳米抗体,具有优良的稳定性,可为新型抗肿瘤药物研发与获得提供新品种。

附图说明

[0022] 图1为新型V-NAR框架序列。

[0023] 图2为PCR扩增V-NAR片段的DNA电泳图。

- [0024] 图3为ELISA初步鉴定PD-L1特异性纳米抗体。
- [0025] 图4为Anti-PD-L1纳米抗体经镍柱纯化后的SDS-PAGE图,其中泳道1为Nb-P1;泳道2为Nb-P2;泳道3为Nb-P3;泳道4为Nb-P4;泳道5为Nb-P5。
- [0026] 图5为Anti-PD-L1纳米抗体的体外热稳定性评价。
- [0027] 图6为Anti-PD-L1纳米抗体的体外亲和力评价。
- [0028] 图7为Anti-PD-L1纳米抗体的体外细胞荧光亲和力评价。
- [0029] 图8为Anti-PD-L1纳米抗体的体外流式亲和力评价。
- [0030] 图9为Circular dichroism检测Anti-PD-L1尿素稳定性。
- [0031] 图10为流式细胞术检测Anti-PD-L1-NbP3和P4阻断功能,A:Anti-PD-L1-NbP3阻断功能;B:Anti-PD-L1-NbP4阻断功能。

具体实施方式

[0032] 以下,结合具体实施方式对本发明的技术进行详细描述。应当知道的是,以下具体实施方式仅用于帮助本领域技术人员理解本发明,而非对本发明的限制。

[0033] 下面的实施例中所示实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和生物材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0034] 实施例1:新型V-NAR框架的设计

[0035] 通过PDB (<https://www.rcsb.org>) 和NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库获取2YWZ_A、AAP86762、4HGK_C、AAN75852、AAM33845、Lep-12E1、ABY64741和Tom70等V-NAR纳米抗体氨基酸序列,并使用clustalw (<https://www.ebi.ac.uk>) 和WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 分析V-NAR氨基酸序列。根据序列比对结果上骨架区相对应位置的氨基酸出现频率的高低,确定V-NAR框架4个FR区的氨基酸序列。对于V-NAR框架的CDR1、HV2和HV4区氨基酸序列,不仅要根据序列比对结果,还需参考已报道的V-NAR中有利抗体稳定的特定位点氨基酸,最终确定V-NAR框架CDR1、HV2和HV4区的氨基酸序列。V-NAR的CDR3区是与抗原结合的关键部位,所以我们选择使用三种不同长度的CDR3(13、18和22个氨基酸),并在每个位置引入“NNK”(N代表4种碱基,A、T、C和G,K代表2种碱基,T和G)随机化,增加文库多样性,从而提高合成文库的质量。利用ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和CPHmodels 3.2Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) 对这8种纳米抗体序列及设计的V-NAR框架序列进行一级以及高级结构预测,从而确定V-NAR框架序列(图1)。

[0036] 实施例2:V-NAR噬菌体库的构建及评价

[0037] 利用重叠延伸PCR扩增得到V-NAR全长基因片段,总共3轮PCR。第1轮PCR扩增获得FR1-FR3区DNA片段。第2轮PCR扩增获得CDR3-FR4区DNA片段,第3轮PCR扩增获得完整的V-NAR全抗体基因片段(图2)。随后将其和pCANTAB5E噬菌粒载体分别进行Sfi I和Not I内切酶酶切,以及连接且电转入大肠杆菌TG1。随后对利用2×TY培养基稀释V-NAR合成文库,按照 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 到 10^{-8} (10倍)梯度稀释,取100μL各个浓度的菌液涂布于含Amp的2×TY平板上,根据稀释倍数和相应平板上的单菌落数目,从而检测V-NAR的库容。随机挑取20个单克隆,进行菌液PCR以及测序,从而确定V-NAR目的基因插入率和多样性。V-NAR文库质量评价见表1,包括库容量、基因插入率以及基因多样性等。

[0038] 表1.评价噬菌体文库的质量

	库容量	基因插入率	多样性
[0039]	1.9×10^9 cfu	100%	20/20

[0040] 实施例3:PD-L1特异性纳米抗体的筛选及初步鉴定

[0041] 将PD-L1蛋白和BSA用 NaHCO_3 缓冲液稀释,浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$,PD-L1蛋白为实验组,BSA为对照组。每孔加入 $150\mu\text{L}$,设置3个复孔, 4°C 下过夜孵育。随后对反应孔用TBST(0.1%)缓冲液洗涤,并用3%脱脂牛奶在 4°C 下封闭2h。洗涤后加入 $100\mu\text{L}$ 噬菌体库溶液,并在室温下孵育60min。接着用TBST缓冲液洗涤10遍后,将 $200\mu\text{L}$ 洗脱液加至孔内,并在室温下孵育10min。孵育结束后,每孔再加入 $15\mu\text{L}$ 中和缓冲液,即为第1轮筛选获得的阳性噬菌体,并进行滴度测定。利用 $2 \times \text{TY}$ 培养基将其进行稀释,并侵染对数期TG1甘油菌,孵育30min。孵育后,分别取 $100\mu\text{L}$ 菌液均匀涂布于含Kan的 $2 \times \text{TY}$ 平板上,根据稀释倍数和单菌落数目计算文库的滴度。随后将其在大肠杆菌TG1中扩增,并用M13K07辅助噬菌体进行救援,进行下一轮筛选,共计4轮。

[0042] 从第4轮筛选后洗脱噬菌体的平板上随机挑取60个单菌落,分别进行噬菌体扩增。使用 NaHCO_3 溶液将PD-L1蛋白和BSA稀释为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加入 $150\mu\text{L}$ 溶液,PD-L1蛋白为实验组,BSA为对照组, 4°C ,60rpm,过夜孵育。

[0043] TBST(0.1%)缓冲液洗涤后并加入5%脱脂奶粉封闭1h。将扩增后的噬菌体用TBST(0.1%)缓冲液稀释10倍。封闭结束后洗涤,并将 $100\mu\text{L}$ 噬菌体库溶液加至孔内, 37°C ,孵育1h。孵育后用TBST(0.1%)缓冲液洗涤,并每孔加入 $200\mu\text{L}$ 用5%的脱脂奶粉以1:5000的比例稀释的HRP标记的Anti-M13抗体, 25°C ,60rpm孵育60min。注意此过程需在避光下完成。将30% H_2O_2 与ABTS溶液混合以配制成底物溶液。TBST(0.1%)缓冲液洗涤96孔板后,将 $100\mu\text{L}$ ABTS底物溶液加入孔内进行显色,室温避光孵育10min。将 $100\mu\text{L}$ 浓 H_2SO_4 加至每孔以终止反应,并检测在405nm处的吸光度。根据实验组和阴性对照组的吸光度比值确定阳性克隆(图3),并将其于 $2 \times \text{TY}$ 培养基中培养后测序。结果显示有5个CDR3区不同序列的Anti-PD-L1纳米抗体。FR1区序列如SEQ ID NO.1所示;FR2区序列如SEQ ID NO.2所示;FR3区序列如SEQ ID NO.3所示;FR4区序列如SEQ ID NO.4所示;CDR1区序列如SEQ ID NO.5所示;HV2区序列如SEQ ID NO.6所示;HV4区序列如SEQ ID NO.7所示;CDR3区DNA序列如SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9或SEQ ID NO.10或SEQ ID NO.11或SEQ ID NO.12所示。

[0044] SEQ ID NO.1:ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRL

[0045] SEQ ID NO.2:TCWYRKKSGSGGRYVETV

[0046] SEQ ID NO.3:FSLRINDLTVEDGGTYRCGV

[0047] SEQ ID NO.4:CGDGTAVTVNP

[0048] SEQ ID NO.5:DASYGLGS

[0049] SEQ ID NO.6:TNEESISK

[0050] SEQ ID NO.7:NSGSKS

[0051] SEQ ID NO.8:PVSFWGRVCAWWSLHCLRFLFG

[0052] SEQ ID NO.9:LGGPFGVRCAMYRWWCGLRRRT

[0053] SEQ ID NO.10:GTELRFWFCMWKMLLCVRGWLVL

[0054] SEQ ID NO.11:GFWGCLVYLCRLF

[0055] SEQ ID NO.12:VVPLCMFVFCMLV。

[0056] 实施例4:Anti-PD-L1纳米抗体的构建表达及纯化

[0057] 利用PCR技术扩增获得Anti-PD-L1纳米抗体基因序列,并对其进行Nde I和Xho I双酶切,克隆至pET-24a(+)载体。随后将重组质粒转化如将表达质粒转化入表达菌株E.coli BL21(DE3)中;从转化的平板上挑选单菌落接种到含卡那抗性的5mL LB液体培养基中培养过夜,然后取1mL过夜培养的菌液转接到含卡那抗性的100mL LB液体培养基中,37℃,180rpm培养到菌液OD₆₀₀值在0.6左右;接着添加诱导剂IPTG至终浓度0.5mM,30℃诱导10小时;诱导表达结束后,9000rpm离心5分钟收集菌体;将菌体再次重悬于PBS缓冲液中,并利用低温高压细胞破碎仪破碎菌体,将破碎后的菌体4℃,9000rpm,20min,分别收集其上清以及沉淀;将沉淀重悬于PBS缓冲液中,并取适量上清和溶解后的沉淀跑SDS-PAGE用于验证PD-L1纳米抗体的表达形式;用包涵体洗涤液重悬沉淀并离心,重复3次;利用包涵体溶解液重悬沉淀,并进行镍柱纯化,每个纯化后的蛋白(图4)分装后-80℃保存。

[0058] 实施例5:Anti-PD-L1纳米抗体的体外活性评价

[0059] (1) 将PD-L1蛋白稀释为5μg/mL和10μg/mL,每孔加入量为150μL,包被于96孔板中,PD-L1蛋白为实验组,BSA为阴性对照组,同样进行稀释并包被,4℃,60rpm,过夜孵育。用TBST(0.1%)缓冲液洗涤3遍后,将200μL 3%脱脂奶粉加入每孔中进行封闭,并在4℃下孵育1h。将5株Anti-PD-L1纳米抗体用TBST(0.1%)缓冲液稀释为0.625μg/mL、1.25μg/mL、2.5μg/mL、5μg/mL、10μg/mL和20μg/mL。封闭后用TBST(0.1%)缓冲液洗涤,并加入200μL各梯度浓度的纳米抗体,37℃,孵育1h。TBST(0.1%)缓冲液洗涤后,并添加200μL以1:5000的比例在3%脱脂奶粉中稀释的HRP标记的Anti-HA抗体。25℃,60rpm,孵育60min,注意此过程需在避光下完成。TBST(0.1%)缓冲液洗涤后,将100μL ABTS底物溶液加至孔内,25℃,60rpm,避光孵育10min进行显色。每孔加入100μL浓H₂SO₄终止显色,孵育5min后用酶标仪检测在405nm处的吸光度。通过通过抗原、抗体浓度以及405nm处的吸光度计算Anti-PD-L1纳米抗体的亲和力。

[0060] (2) 将NbP1、NbP2、NbP3、NbP4、NbP5 5株Anti-PD-L1纳米抗体使用NaHCO₃溶液稀释为100μg/mL。分别将每种纳米抗体于20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃和80℃下孵育10min,各温度下设置3个平行。结束后于4℃保存。经各温度处理后的纳米抗体与抗原的结合力同样利用上述间接ELISA检测(图5)。

[0061] 表2:Anti-PD-L1纳米抗体的CDR3区基因和氨基酸序列

纳米抗体	CDR3 区基因序列	CDR3 区氨基酸序列
Anti-PD-L1-NbP1	CCTGTTAGTTTTTGGGGTAGGGTT TGTGCGTGGTGGTCTTTGCATTGT TTGAGGTTTTTGTGGG	PVSFWGRVCAWWSLHCLR FLFG
Anti-PD-L1-NbP2	CTGGGGGGCCTTTGGGGTGAG GTGTGCGATGTATAGGTGGTGGT GTGGGTTGAGGCGGCGTACT	LGGPFGVRCAMYRWWCG LRRRT
[0062] Anti-PD-L1-NbP3	GGTACGGAGCTTCGTTGGTTTTTC GTGTATGTGGAAGATGTTGTTGT GTGTTAGGGGTTGGTTGGTG	GTELRFWFCMWKMLLCV RGWLW
Anti-PD-L1-NbP4	GGTTTTTGGGGTTGTTTGGTTTAT TTGTGTAGGCTTTTT	GFWGCLVYLCRLF
Anti-PD-L1-NbP5	GTTGTGCCGTTGTGTATGTTTGT TTTTGTATGTTGGTT	VVPLCMFVFCMLV

[0063] (3) 利用PD-L1和PD-L2蛋白的同源性检测Anti-PD-L1纳米抗体的与PD-L1结合的特异性,方法同ELISA(图6)。

[0064] (4) 将HepG2细胞以 1×10^5 cell/mL的密度铺在共聚焦培养皿中,培养18h。设置空白组和实验组,空白组只加入1mL DMEM培养基;使用DMEM培养基将FITC标记的5株Anti-PD-L1纳米抗体稀释为50 μ g/mL,实验组加入1mL已配制的FITC标记的Anti-PD-L1纳米抗体溶液。置于培养箱共孵育6h。共孵育结束后,PBS溶液洗涤细胞并用4%多聚甲醛固定HepG2细胞,于培养箱中放置15min。弃去4%多聚甲醛并用PBS缓冲液清洗。将DiI染料加至培养皿,于培养箱中放置1h,进行细胞膜染色。弃去细胞膜染料并用PBS洗涤。再加入Hoechst33342染料,37 $^{\circ}$ C下静置15min,对细胞核进行染色。弃去细胞核染料并洗涤,再加入1mL PBS缓冲液,于尼康共聚焦显微镜下观察Anti-PD-L1纳米抗体与细胞结合情况(图7)。

[0065] (5) 将HepG2细胞以 2×10^5 cell/mL的密度铺在六孔板中,培养18h。弃去培养基并清洗HepG2细胞。设置空白组和实验组,空白组只加入2mL DMEM培养基,实验组加入2mL含有FITC标记纳米抗体(50 μ g/mL)的DMEM培养基。于细胞培养箱中共孵育6h。共孵育结束后,用PBS缓冲液洗涤细胞并消化孔内细胞。随后再加入1mL DMEM培养基终止消化,吹打孔内细胞并转移至EP管,离心收集细胞。将细胞沉淀重悬于PBS中,并用流式细胞仪检测HepG2细胞荧光强度(图8)。Anti-PD-L1纳米抗体的体外活性评价见表3,包括亲和力、热稳定性以及特异性。

[0066] 表3纳米抗体的体外亲和力活性评价

纳米抗体名称	NbP1	NbP2	NbP3	NbP4	NbP5
[0067] Ka (M^{-1})	7.04×10^6	9.58×10^4	3.82×10^6	4.19×10^7	2.74×10^5

[0068] 实施例6:Anti-PD-L1纳米抗体的尿素稳定性

[0069] 将透析复性后的Anti-PD-L1纳米抗体使用鲨鱼血中的尿素溶液(21.6mg/mL)稀释为0.5mg/mL,设置4个时间梯度,0h、2h、4h和8h。在室温下,分别将纳米抗体放置不同的时间

段后,利用圆二色谱仪检测纳米抗体结构变化(图9)。

[0070] 实施例7:Anti-PD-L1纳米抗体的对PD-L1与PD-1相互作用的阻断作用

[0071] 将HepG2细胞消化,以 2×10^5 cell/mL的密度铺在六孔板中,置于细胞培养箱中过夜培养。弃去培养基,并用PBS缓冲液洗涤细胞。空白组只加入2mL DMEM培养基,共计5个实验组,第一组只加入FITC标记的纳米抗体;第二组预先加入PD-1蛋白,孵育1h后再加入FITC标记的纳米抗体,PD-1与纳米抗体的摩尔比为5:1;第三组同时加入PD-1蛋白和FITC标记的纳米抗体,两者的摩尔比为5:1;第四组也是预先与PD-1孵育1h,随后再加入纳米抗体,两者的摩尔比为2:1;第五组同时加入PD-1与纳米抗体,摩尔比为2:1。最后置于培养箱共孵育6h。细胞孵育结束后,用PBS洗涤细胞,并用胰酶消化孔内细胞,1000rpm离心收集细胞。弃上清并用PBS缓冲液重悬细胞,再次离心收集细胞。将细胞沉淀重悬于0.5mL PBS中,并用流式细胞仪检测其荧光强度,以计算抗体的阻断作用(图10)。

[0072] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 华东理工大学
- [0003] <120> 抗PD-L1纳米抗体及其应用
- [0004] <130> /
- [0005] <160> 17
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 25
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] Ala Arg Val Asp Gln Thr Pro Arg Ser Val Thr Lys Glu Thr Gly Glu
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] Ser Leu Thr Ile Asn Cys Val Leu Arg
- [0015] 20 25
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 18
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0020] <400> 2
- [0021] Thr Cys Trp Tyr Arg Lys Lys Ser Gly Ser Gly Gly Arg Tyr Val Glu
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Thr Val
- [0024] <210> 3
- [0025] <211> 20
- [0026] <212> PRT
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 3
- [0029] Phe Ser Leu Arg Ile Asn Asp Leu Thr Val Glu Asp Gly Gly Thr Tyr
- [0030] 1 5 10 15
- [0031] Arg Cys Gly Val
- [0032] 20
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 11
- [0035] <212> PRT
- [0036] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0037] <400> 4
- [0038] Cys Gly Asp Gly Thr Ala Val Thr Val Asn Pro

[0039]	1	5	10
[0040]	<210>	5	
[0041]	<211>	8	
[0042]	<212>	PRT	
[0043]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0044]	<400>	5	
[0045]	Asp Ala Ser Tyr Gly Leu Gly Ser		
[0046]	1	5	
[0047]	<210>	6	
[0048]	<211>	8	
[0049]	<212>	PRT	
[0050]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0051]	<400>	6	
[0052]	Thr Asn Glu Glu Ser Ile Ser Lys		
[0053]	1	5	
[0054]	<210>	7	
[0055]	<211>	6	
[0056]	<212>	PRT	
[0057]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0058]	<400>	7	
[0059]	Asn Ser Gly Ser Lys Ser		
[0060]	1	5	
[0061]	<210>	8	
[0062]	<211>	22	
[0063]	<212>	PRT	
[0064]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0065]	<400>	8	
[0066]	Pro Val Ser Phe Trp Gly Arg Val Cys Ala Trp Trp Ser Leu His Cys		
[0067]	1	5	10 15
[0068]	Leu Arg Phe Leu Phe Gly		
[0069]		20	
[0070]	<210>	9	
[0071]	<211>	22	
[0072]	<212>	PRT	
[0073]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0074]	<400>	9	
[0075]	Leu Gly Gly Pro Phe Gly Val Arg Cys Ala Met Tyr Arg Trp Trp Cys		
[0076]	1	5	10 15
[0077]	Gly Leu Arg Arg Arg Thr		

[0078]		20	
[0079]	<210>	10	
[0080]	<211>	22	
[0081]	<212>	PRT	
[0082]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0083]	<400>	10	
[0084]	Gly Thr Glu Leu Arg Trp Phe Ser Cys Met Trp Lys Met Leu Leu Cys		
[0085]	1	5	10 15
[0086]	Val Arg Gly Trp Leu Val		
[0087]		20	
[0088]	<210>	11	
[0089]	<211>	13	
[0090]	<212>	PRT	
[0091]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0092]	<400>	11	
[0093]	Gly Phe Trp Gly Cys Leu Val Tyr Leu Cys Arg Leu Phe		
[0094]	1	5	10
[0095]	<210>	12	
[0096]	<211>	13	
[0097]	<212>	PRT	
[0098]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0099]	<400>	12	
[0100]	Val Val Pro Leu Cys Met Phe Val Phe Cys Met Leu Val		
[0101]	1	5	10
[0102]	<210>	13	
[0103]	<211>	66	
[0104]	<212>	DNA	
[0105]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0106]	<400>	13	
[0107]	cctgtagtt tttgggtag gttttgtgcg tgggtgtcct tgcattgttt gaggtttttg	60	
[0108]	tttggg	66	
[0109]	<210>	14	
[0110]	<211>	66	
[0111]	<212>	DNA	
[0112]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0113]	<400>	14	
[0114]	cttggggggc cttttggggt gaggtgtgcg atgtataggt ggtggtgtgg gttgaggcgg	60	
[0115]	cgtact	66	
[0116]	<210>	15	

- [0117] <211> 66
[0118] <212> DNA
[0119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0120] <400> 15
[0121] ggtacggagc ttcgttggtt ttcgtgtatg tggaagatgt tgttgtgtgt taggggttgg 60
[0122] ttggtg 66
[0123] <210> 16
[0124] <211> 39
[0125] <212> DNA
[0126] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0127] <400> 16
[0128] ggtttttggg gttgtttggt ttatttgtgt aggcttttt 39
[0129] <210> 17
[0130] <211> 39
[0131] <212> DNA
[0132] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0133] <400> 17
[0134] gttgtgccgt tgtgtatggt tgttttttgt atggttggt 39

FR1 CDR1 FR2 HV2
ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRLDASYGLGSTCWYRKKSGSTNEESISKGG
FR2 HV4 FR3 CDR3 FR4
RYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGV*****CGDGTAV
TVNP

图1

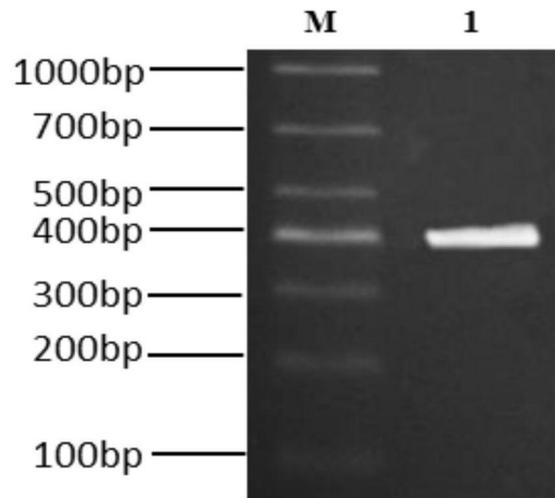


图2

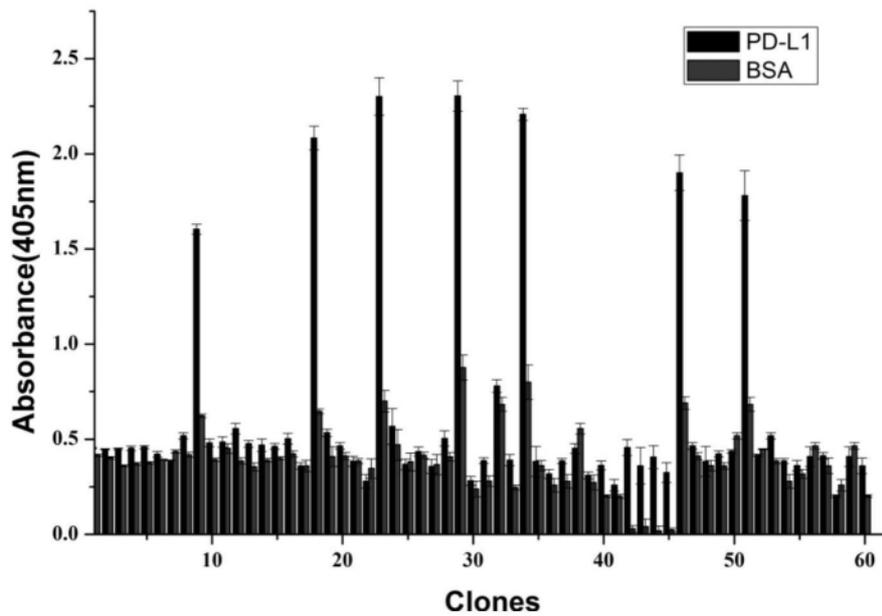


图3

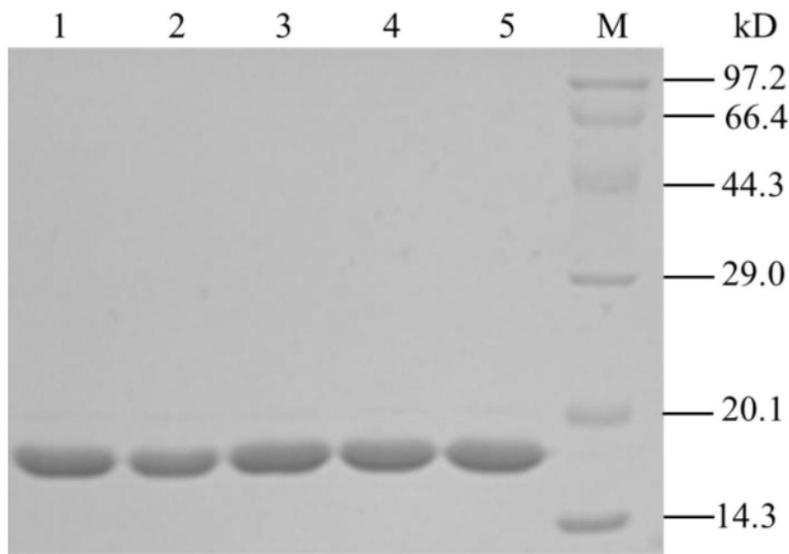


图4

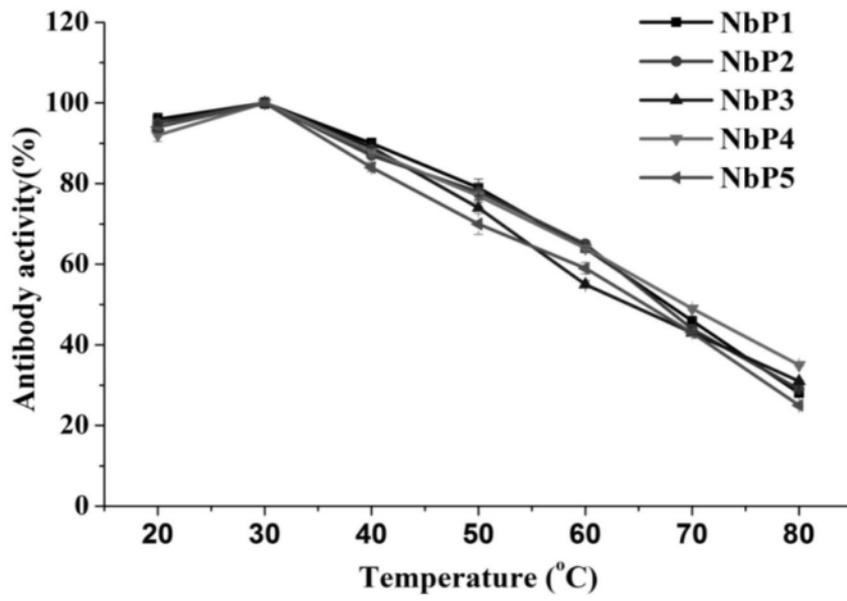


图5

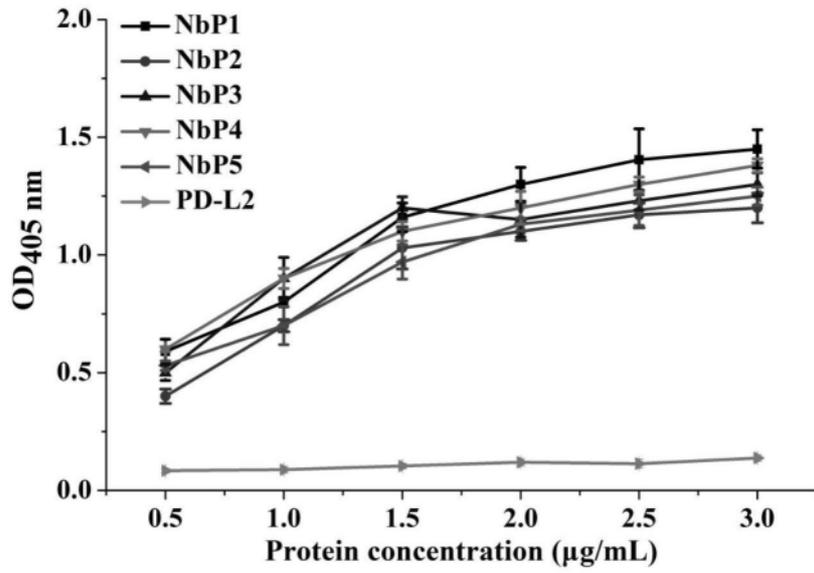


图6

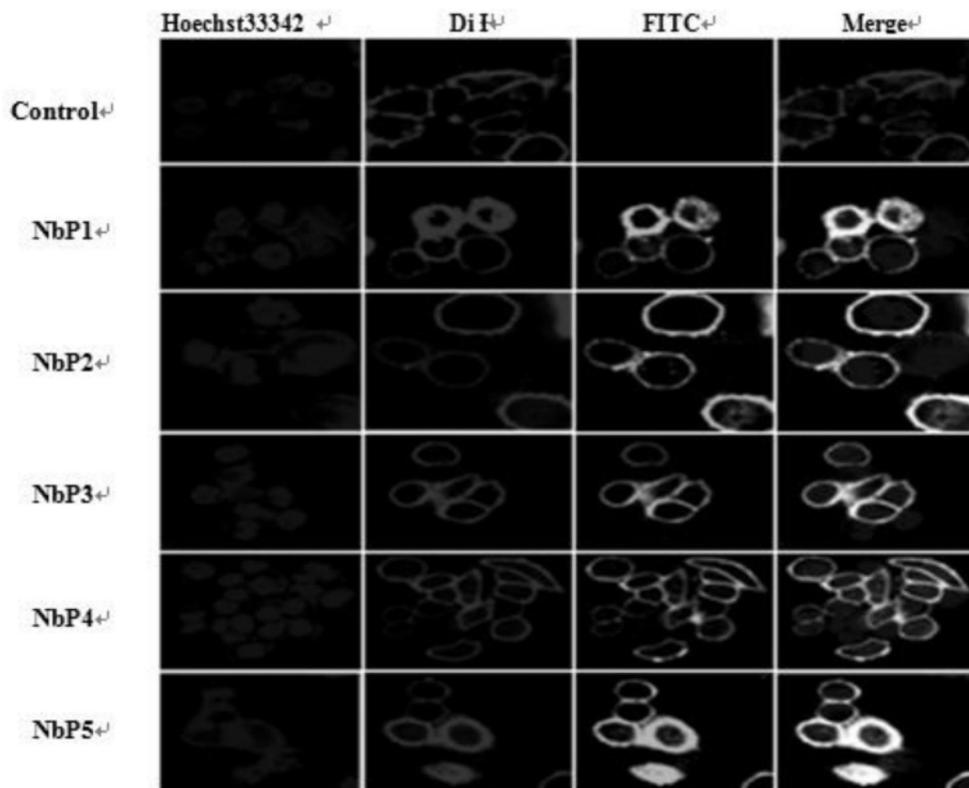


图7

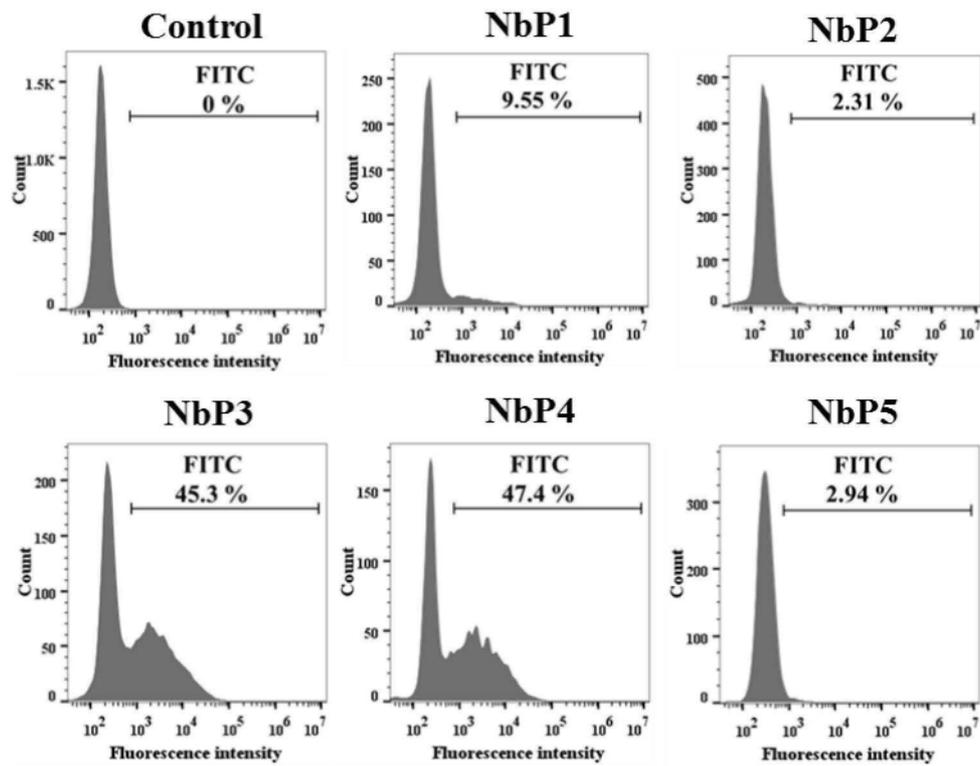


图8

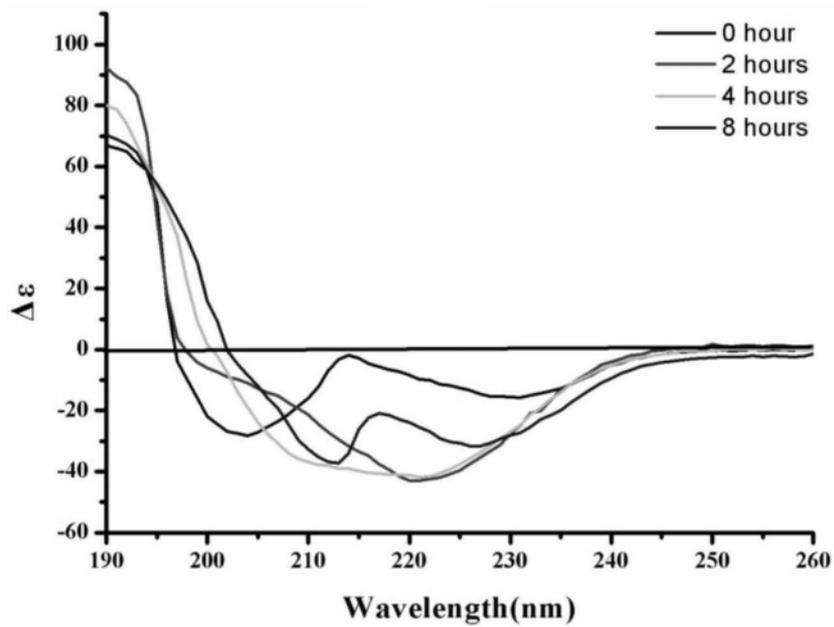


图9

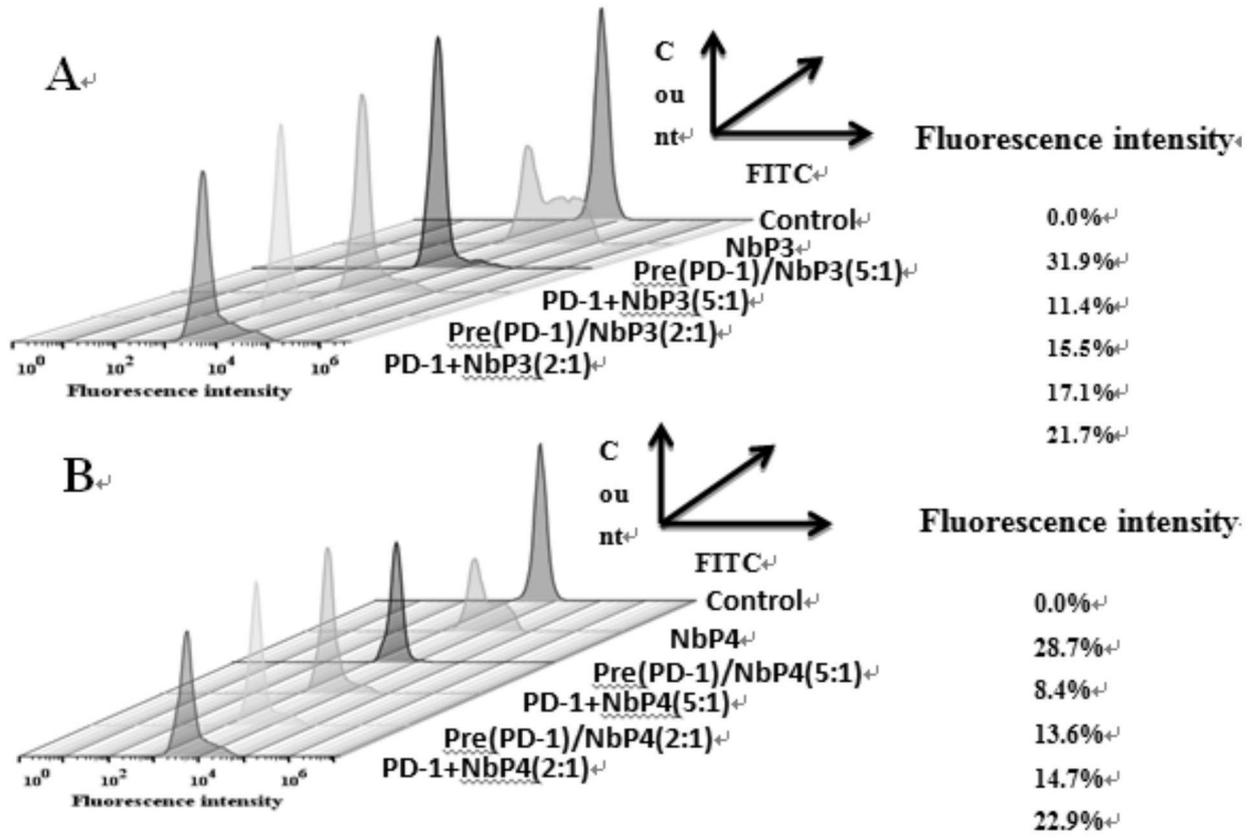


图10