



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112250765 A

(43) 申请公布日 2021.01.22

(21) 申请号 202010944860.6

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.10

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 哈尔滨博易诚生物科技有限公司

G01N 33/574 (2006.01)

地址 150000 黑龙江省哈尔滨市松北区中源大道10957号街道保利水韵长滩小区会所

C12R 1/19 (2006.01)

(72) 发明人 齐帮若 贾栋

(74) 专利代理机构 大庆知文知识产权代理有限公司 23115

代理人 方博

(51) Int. Cl.

C07K 16/32 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

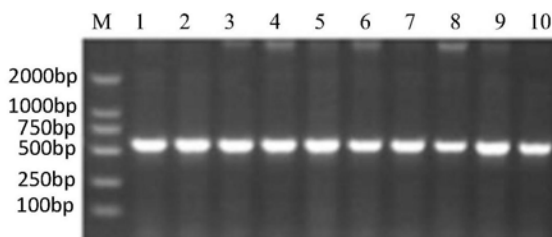
权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种针对HER2的纳米抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种针对HER2的纳米抗体及其应用,所述针对HER2的纳米抗体的VHH链包括框架区FR和互补决定区CDR,所述框架区FR包括FR1~FR4的氨基酸序列,互补决定区CDR包括CDR1~CDR3的氨基酸序列,其中:FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,CDR1的氨基酸序列SEQ ID NO.5所示,CDR2的氨基酸序列SEQ ID NO.6所示,CDR3的氨基酸序列SEQ ID NO.7所示。本发明的纳米抗体能够在大肠杆菌内高效表达,应用于检测试剂及靶向药物的开发。



1. 一种针对HER2的纳米抗体VHH链,其特征在于所述VHH链包括框架区FR和互补决定区CDR,所述框架区FR包括FR~FR4的氨基酸序列,互补决定区CDR包括CDR1~CDR3的氨基酸序列,其中:FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,CDR1的氨基酸序列SEQ ID NO.5所示,CDR2的氨基酸序列SEQ ID NO.6所示,CDR3的氨基酸序列SEQ ID NO.7所示。

2. 根据权利要求1所述的针对HER2的纳米抗体VHH链,其特征在于所述VHH链具有SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1所述的针对HER2的纳米抗体VHH链,其特征在于所述VHH链具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。

4. 一种针对HER2的纳米抗体,其特征在于所述纳米抗体是一种针对HER2表位的纳米抗体,包括两条具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列的VHH链。

5. 一种权利要求4所述针对HER2的纳米抗体在HER2检测方面的应用。

6. 一种权利要求4所述针对HER2的纳米抗体在肿瘤治疗药物中的应用。

7. 一种DNA分子,其特征在于所述DNA分子编码选自下组的蛋白质:权利要求1、2或3所述针对HER2的纳米抗体的VHH链,或权利要求4所述针对HER2的纳米抗体的纳米抗体。

8. 一种表达载体,其特征在于所述表达载体含有SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列。

9. 一种宿主细胞,其特征在于所述宿主细胞能表达权利要求4所述针对HER2的纳米抗体。

## 一种针对HER2的纳米抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术或生物医学领域,涉及一种针对程序性死亡受体1(programmed death 1,HER2)的纳米抗体及其编码序列与应用。

### 背景技术

[0002] HER2是一种重要的免疫抑制分子,为CD28超家族成员,其最初是从凋亡的小鼠T细胞杂交瘤2B4.11克隆出来。以HER2为靶点的免疫调节对抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等均有重要的意义。HER2抗体可以阻止PD-L1与HER2结合用来解除肿瘤细胞抵御功能。一旦肿瘤细胞被HER2抗体攻击后,免疫细胞就可以击破肿瘤细胞。因而,HER2抗体的抗肿瘤作用是广谱的。目前,HER2抗体的临床试验包括肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、皮肤癌和脑肿瘤等。HER2抗体可以控制50%的皮肤癌病人的癌症进展,治愈10%左右的皮肤癌病人,对于非小细胞肺癌病人也有24%的临床控制效果。但是,目前HER2抗体主要来自动物细胞制备的单克隆抗体,这样就使得制备成本高,制备过程较为繁琐,同时由于杂交瘤自身的特点会导致每个批次间容易产生差异。

[0003] 纳米抗体是目前已知最小的可结合抗原的抗体分子,来自于骆驼血液中的天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的单链抗体可变区。最初是由Hamers在研究骆驼血液的实验中发现的。纳米抗体的分子量通常只有15KD,化学性质稳定,可溶性高,容易表达,并且能够偶联其他分子(例如核素),因此应用纳米抗体技术研发抗肿瘤药物具有广阔的应用前景。

### 发明内容

[0004] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供了一种针对HER2的纳米抗体及其应用。本发明的纳米抗体能够在大肠杆菌内高效表达,应用于检测试剂及靶向药物的开发。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0006] 一种针对HER2的纳米抗体VHH链,其包括框架区FR和互补决定区CDR,所述框架区FR包括FR~FR4的氨基酸序列,互补决定区CDR包括CDR1~CDR3的氨基酸序列,其中:FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,CDR1的氨基酸序列SEQ ID NO.5所示,CDR2的氨基酸序列SEQ ID NO.6所示,CDR3的氨基酸序列SEQ ID NO.7所示。

[0007] 一种针对HER2的纳米抗体VHH链,其具有SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列,SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。

[0008] 一种针对HER2的纳米抗体,其是一种针对HER2表位的纳米抗体,包括两条具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列的VHH链,可应用在制备HER2检测实际方面。

[0009] 一种DNA分子,其编码选自下组的蛋白质:HER2的纳米抗体的VHH链或HER2的纳米抗体。

[0010] 一种表达载体,其含有SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列。

[0011] 一种宿主细胞,其可以表达HER2纳米抗体。

[0012] 本发明利用筛选得到的HER2抗原特异性纳米抗体用于肿瘤治疗药物中。

[0013] 相比于现有技术,本发明具有如下优点:

[0014] 纳米体是位于重链上的单可变域抗体,也称为VHH抗体。纳米体与基因工程方法相兼容,允许对纳米抗体框架和氨基酸的改变来改善结合能力。纳米体与传统抗体相比,具有分子质量小、水溶性好、高耐性、稳定性强、低免疫原性、较强的组织穿透力、高表达性、抗原识别能力强、易于生产等特点。并且因纳米抗体分子量小、结构简单,由单一的基因编码,在极端的温度和PH值下仍可保持稳定,所以它很容易在微生物中合成,能在噬菌体、酵母等微生物中大量的表达,而且其相对价格低廉、可进行大规模生产,易于普及和应用,因此在生物技术和医学应用方面比其他抗体具有优越性。

### 附图说明

[0015] 图1是编码纳米抗体的DNA电泳图,M为分子量marker,1为PCR产物,条带约600bp,1-10为PCR产物。

[0016] 图2是HER2特异性的纳米抗体,图(A):SDS-PAGE电泳图,M:marker,1:经过层析纯化的HER2抗体;图(B):Western blot图,M:marker,1:经过层析纯化的HER2抗体。

[0017] 图3是应用HER2纳米抗识别HER2的ELISA检测结果。

### 具体实施方式

[0018] 本发明首先制备及纯化HER2抗原,将其免疫骆驼,制备HER2特异性的纳米抗体文库,然后将纯化后的HER2偶联在酶标板上,利用噬菌体展示技术筛选高亲和力的HER2特异性纳米抗体,并将其转入大肠杆菌TG1,建立纳米抗体表达体系。

[0019] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明的技术方案。

[0020] 实施例1

[0021] 本实施例安札如下步骤构建HER2特异性纳米抗体文库:

[0022] (1) 表达纯化HER2,然后将1mg HER2抗原与费氏佐剂等体积混合,免疫一只骆驼,每周一次,共免疫7次,刺激B细胞表达特异性的纳米抗体;

[0023] (2) 经过7次免疫结束后,提取100mL外周血淋巴细胞,并提取mRNA;

[0024] (3) 合成cDNA扩增VHH;

[0025] (4) 利用限制性内切酶pst I,NotI酶切20 $\mu$ g噬菌体展示载体及10 $\mu$ L VHH,连接两个片段;

[0026] (5) 将连接产物转化至感受态TG1,构建HER2纳米抗体文库并测定库容,库容大小为 $8.0 \times 10^9$ 。

[0027] 实施例2

[0028] 本实施例按照如下步骤筛选HER2特异性纳米抗体:

[0029] (1) 将溶解在100mm NaHCO<sub>3</sub>、pH8.2的20 $\mu$ gHER2包被在nunc酶标板上,4度放置过夜;

[0030] (2) 第二天加入100 $\mu$ L 3% milk,室温封闭2h,加入100 $\mu$ L  $3 \times 10^{11}$ 滴度的文库噬菌体;

[0031] (3) 第一轮淘选用含有0.05% tween20的TBST洗10遍/第二轮洗20遍/第三轮清洗

20遍,清洗掉非特异性结合的噬菌体:

[0032] (4)用100mM TEA洗脱结合的噬菌体,并感染处于对数生长期的TG1,37℃培养1h,产生并纯化用于下一步侵染的噬菌体,继续筛选,逐步得到富集。

[0033] 实施例3

[0034] 本实施例用噬菌体的酶联免疫吸附法筛选特异性的单个阳性克隆,步骤如下:

[0035] (1)从实施例2中4轮筛选后含有噬菌体的细胞培养皿中,挑选96个单克隆菌并接种于含有100μg/mL的氨苄霉素的LB培养基中,生长到对数生长期后,加入终浓度为1mM的IPTG,28℃培养过夜;

[0036] (2)利用渗透法获得粗提的抗体,并将抗体转移到经过抗包被的ELISA板中,室温下放置1h;

[0037] (3)用TBST洗去未结合的抗体,加入mouse anti-HA抗体,室温下放置1h;

[0038] (4)用TBST洗去未结合的抗体,加入anti-mouse-HRP;

[0039] (5)用TBST洗去未结合的抗体,加入TMB显色液,在酶标仪上450nm波长读取吸收值;

[0040] (6)当样品OD值大于对照值2倍以上时,判断为阳性克隆;

[0041] (7)当阳性克隆孔的菌转摇在含有100μg/mL的氨苄霉素的TB培养基,提取质粒进行测序;根据测序结果,应用snappgene软件分析每种克隆,把CDR1、CDR2和CDR3序列相同的株视为同一克隆,而不同的视为不同克隆株。筛选得到的特异性特异性HER2纳米抗体的VHH链的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。VHH链的氨基酸序列,由框架区FR和互补决定区CDR组成,所述框架区FR包括SEQ ID NO.1所示的FR1,SEQ ID NO.2所示的FR2,SEQ ID NO.3所示的FR3,SEQ ID NO.4所示的FR4;所述互补决定区CDR包括SEQ ID NO.5所示的CDR1,SEQ ID NO.6所示的CDR2,SEQ ID NO.7所示的CDR3。

[0042] 其中FR1~FR4和CDR1~CDR3的序列如下所示:

[0043] FR1:QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCATSA。

[0044] CDR1:RTFNYSYMKWFR。

[0045] FR2:QAPGKEFVARISRSG。

[0046] CDR2:GTTYADSVK。

[0047] FR3:GRFTISRDTAKSVVYLQMNSLKPEDTAIYY。

[0048] CDR3:CAAAIFDVTDY。

[0049] FR4:ERADYWGQGTQVTVSS。

[0050] 基于VHH链的核苷酸序列和氨基酸序列,还可以得到以下产物:

[0051] 一种HER2纳米抗体,它是针对HER2表位的纳米抗体,包括两条具有SEQ ID NO.9所示氨基酸序列的VHH链。

[0052] 一种DNA分子,它编码选自下组蛋白质:上述针对HER2的纳米抗体的VHH链,或上述HER2纳米抗体。

[0053] 一种表达载体,它含有SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列。

[0054] 一种宿主细胞,它可以表达HER2纳米抗体。

[0055] 实施例4

[0056] 应用筛选得到的特异性HER2纳米抗体进行酶联免疫吸附检测,步骤如下:

[0057] 为检测所筛选得到的特异性HER2纳米抗体是否能识别HER2抗原,将HER2抗原(2 $\mu$ g/mL)加入96孔酶标板,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;用TBST洗3次,后用3%脱脂乳封闭酶标板,37 $^{\circ}$ C作用1h,用TBST洗3次,加入不同稀释浓度的HER2纳米抗体,37 $^{\circ}$ C作用2h;TBST洗3次,加入HRP标记的抗HA鼠抗体,作用1h,TBST洗3次,加入TMB后检测,并用构建的纳米抗体作为阴性对照。

[0058] 图1和图2说明本发明成功扩增了HER2纳米抗体的DNA序列,并通过纯化及SDS-PAGE和Western blot验证,得到了能够特异性识别HER2抗原的HER2纳米抗体。如图3所示,HER2纳米抗体可以特异性的识别HER2,而阴性对照纳米抗体则与HER2无反应,说明本发明提出的HER2纳米抗体为进一步开发HER2检测试剂盒和抗肿瘤药物奠定了基础。

[0059] 上述实施例只是对本发明的技术方案作进一步的说明,但并不局限于此,凡是对本发明技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,均应涵盖在本发明的保护范围内。

## 序列表

	<110>哈尔滨博易诚生物科技有限公司	
	<120>一种针对 HER2 的纳米抗体及其应用	
	<160>9	
	<210> 1	
	<211> 26	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 1	
	QVQLQESGGGLVQAGASLRRLSCATSA	26
	<210> 2	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 2	
	QAPGKEFVARISRSG	15
	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> PRT	
[0060]	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	GRFTISRDTA KSVVYLQMNS LKPEDTAIYY	30
	<210> 4	
	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 4	
	ERADYWGQGTQVTVSS	16
	<210> 5	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 5	
	RTFNSSYSMKWFR	12
	<210> 6	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 6	

	GTTYADSVK	10
	<210> 7	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 7	
	CAAAIFDVTDY	11
	<210> 8	
	<211> 360	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 8	
	caagttcagt tacaagaatc tggtggcgga ttggtccagg ctggggcctc ccttegtetc	
	60	
	tcatgtgcaa cttcggcgcg cacctttaat agttatagca tgaaatggtt ccgacaagct	
	120	
[0061]	cctggtaagg agtttgtagc ccggatttct agatccggcg gaacaacgta ctatgcagat	
	180	
	tcagtgaaag ggaggttcac tatctcgcgt gacaccgca agagtgttgt ctacctacag	
	240	
	atgaacagcc tgaaaccgca agatacagct atatattact gcgccgcagc gatttttgac	
	300	
	gtaacggatt atgagcgcgc tgactactgg ggtcaaggca ctcaggtgac cgtttcttcc	
	360	
	<210> 9	
	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 9	
	QVQLQESGGG LVQAGASLRL SCATSARTFN SYSMKWFRQA PGKEFVARIS RSGGTTYAD	
	60	
	SVKGRFTISR DTAKSVVYLQ MNSLKPEDTA IYYCAAAIFD VTDYERADYW GQGTQVTVSS	
	120	



## 序列表

<110> 哈尔滨博易诚生物科技有限公司

<120> 一种针对HER2的纳米抗体及其应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*

<400> 1

```
caagttcagt tacaagaatc tgggtggcgga ttggtccagg ctggggcctc ccttcgtctc 60
tcatgtgcaa cttcggecgc cacctttaat agttatagca tgaaatggtt cgcacaagct 120
cctggtaagg agtttgtagc cggatttct agatccggcg gaacaacgta ctatgcagat 180
tcagtgaaag ggaggttcac tatctcgcgt gacaccgcga agagtgttgt ctacctacag 240
atgaacagcc tgaaaccgga agatacagct atatattact gcgccgcagc gatttttgac 300
gtaacggatt atgagcgcgc tgactactgg ggtcaaggca ctcaggtgac cgtttcttcc 360
```

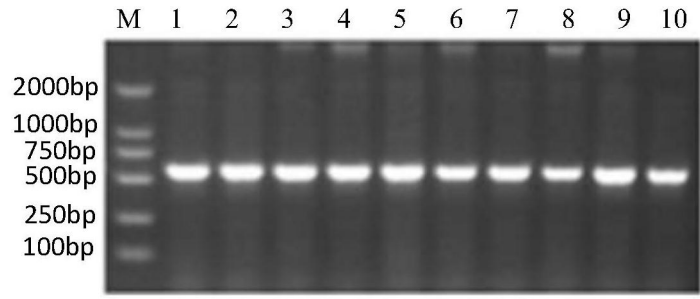


图1

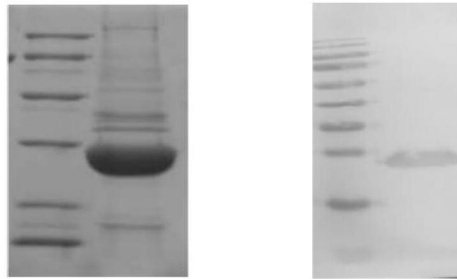


图2

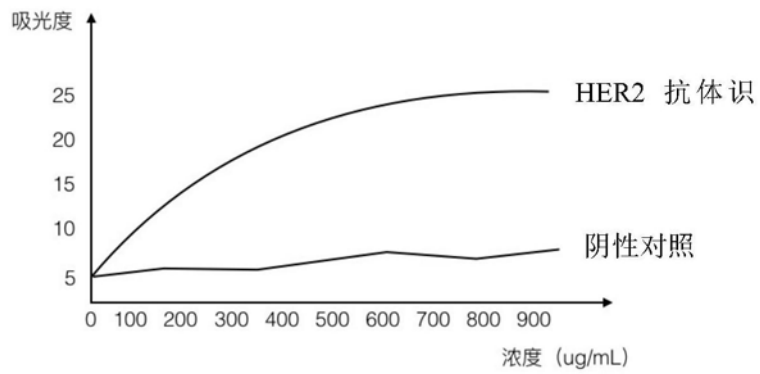


图3