

• 基础研究 •

广谱中和新型冠状病毒及其变体的纳米抗体制备及功能研究

汪佰成¹,倪晶怡¹,刘馨月¹,龚雪^{1*},季晨博^{1,2*}¹南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)医学研究中心,²南京市女性生育力保护及重塑医学重点实验室,江苏 南京 210004

[摘要] 目的:开发广谱靶向严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)及其变体的纳米抗体(nanobody, Nb),并确立一种能够广泛用于制备广谱中和病毒及其多种变体Nb的策略。方法:使用SARS-CoV-2野生型菌株刺突蛋白的受体结合域(wild type receptor-binding domain, WT-RBD)免疫羊驼,构建出纳米抗体噬菌体文库,通过Delta变体的RBD(Delta-RBD)对文库进行免疫管筛选、ELISA实验等操作筛选得到Nb,毕赤酵母系统表达Nb并纯化,通过ELISA、生物膜干涉技术、假病毒中和实验以及Alphafold2建模和分子对接等多种手段验证Nb的性质及功能。结果:得到4个Nb不仅均对WT-RBD具有较高的亲和力,还能有效结合Delta-RBD及Omicron变体的RBD(Omicron-RBD)。Nb34、Nb42和Nb45对Delta-RBD和Omicron-RBD表现出较强的结合能力,同时Nb45可以有效中和Omicron变体的假病毒。这些Nb能够结合SARS-CoV-2及其变体的机制可能与其结合RBD上的保守位点相关。结论:得到的4个Nb具有防治SARS-CoV-2及其变体的巨大潜力,同时本研究中立和使用的这种策略也可以广泛用于制备广谱中和易变异病毒及其多种变体的Nb。

[关键词] SARS-CoV-2; 变体; 策略; 中和性纳米抗体; 假病毒**[中图分类号]** R392**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2025)11-1598-10**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250094

Nanobody preparation and functional studies for broad-spectrum neutralization of SARS-CoV-2 and its variants

WANG Baicheng¹, NI Jingyi¹, LIU Xinyue¹, GONG Xue^{1*}, JI Chenbo^{1,2*}¹Medical Research Center, Women's Hospital of Nanjing Medical University (Nanjing Women and Children's Healthcare Hospital), ²Nanjing Medical Key Laboratory of Female Fertility Preservation and Restoration, Nanjing 210004, China

[Abstract] **Objective:** To produce broad-spectrum nanobodies (Nbs) targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and its variants, and establish a strategy for producing Nbs broad-spectrum neutralizing the virus and its various variants. **Methods:** Alpacas were immunized with the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 wild-type strain (WT-RBD) to construct a nanobody phage library, and the library was screened by biopanning and ELISA with the RBD of the Delta variant (Delta-RBD) to select Nbs. The selected Nbs were expressed and purified using the *Pichia pastoris* system, and their properties and functions characterized by ELISA, biolayer interferometry, pseudovirus neutralization experiments, and molecular modeling and docking. **Results:** Four Nbs were obtained, all exhibiting high affinity for WT-RBD, while also effectively neutralizing Delta-RBD and the RBD of the Omicron variant (Omicron-RBD), with Nb45 effectively neutralizing the pseudovirus of (Omicron-RBD). We also found that the mechanism of these Nbs for neutralizing SARS-CoV-2 and its variants may be related to interfering with the conserved sites on these RBD. **Conclusion:** The four Nbs obtained have great potential for prevention and treatment of SARS-CoV-2 and its variants, and the strategy established in this study can also be widely used for the preparation of Nbs broad-spectrum neutralizing viruses and their various variants.

[Key words] SARS-CoV-2; variants; strategy; neutralizing nanobody; pseudovirus

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(11): 1598-1607]

[基金项目] 江苏省“333高层次人才培养工程”项目;南京市妇幼保健院“十四五”青年人才项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenboji@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-9869-4228); gongxue@njmu.edu.cn (ORCID: 0009-0006-2405-3192)

由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的冠状病毒疾病(coronavirus disease 2019, COVID-19)大流行是过去20年来全球第3次冠状病毒大流行^[1]。截至2024年12月,世界范围内报告的病例累计已超过7.77亿,导致全球700多万人死亡^[2]。这场全球性的卫生危机不但给世界公共卫生系统带来了沉重负担,而且严重影响了全球经济^[3]。虽然各大机构迅速开发了许多种有效的疫苗,但由于接种疫苗引起的免疫反应不断下降以及新变体的不断出现(Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron等),想要根除SARS-CoV-2仍然具有极大的挑战性^[4]。

纳米抗体(nanobody, Nb)是在羊驼、骆驼和鲨鱼的外周血中产生的独特抗体^[5-6]。它们的大小仅为传统IgG抗体的1/10,是能够选择性结合抗原的最小功能抗体片段^[7-8]。并且相比传统抗体, Nb具有诸多优点,比如高亲和力、较高的稳定性和溶解度、快速的组织渗透能力、识别隐藏表位的能力以及生产成本低等^[9]。

本研究首先使用野生型菌株刺突蛋白的受体结合域(wild type receptor-binding domain, WT-RBD)免疫羊驼,构建出Nb噬菌体文库,之后通过SARS-CoV-2 Delta变体RBD蛋白(Delta-RBD)筛选文库得到4种Nb,这些Nb对SARS-CoV-2原始株及Delta-RBD、SARS-CoV-2 XBB变体RBD蛋白(Omicron-RBD)均具有高亲和力。此外,通过实验证实Nb45可以在体外有效中和Omicron变体的假病毒,并进一步证明了这4种Nb具有较高的热稳定性和pH稳定性。这些实验结果均表明,这4种Nb具有防治由SARS-CoV-2及其变体引起的COVID-19的巨大潜力。此外,本研究中确立和使用的这种构建文库和筛选抗体的策略也可以广泛用于制备广谱中和病毒及其多种变体的Nb。

1 材料和方法

1.1 材料

293T-ACE2细胞获赠于南京大学的吴稚伟教授;10%胎牛血清(上海ExCell Bio公司);100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素(南京KeyGEN BioTECH公司);WT-RBD(上海BIOINTRON公司);Delta-RBD、Omicron-RBD和小鼠单克隆抗myc标签抗体(HRP)(北京Sino Biological公司);氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、单组分显色液(TMB)和IPTG(北京Solarbio

Biotechnology公司);博来霉素、TMB显色终止溶液(上海Beyotime公司);Amicon®Ultra-4离心过滤装置(Merck公司,德国);COVID-19-Spike(XBB1.5)蛋白假病毒、考马斯亮蓝快速染色溶液和His标记蛋白琼脂糖高速纯化树脂(上海Yesen公司);DMEM培养基、Hoechst 33342染料、TRIzol(Thermo Fisher Scientific公司,美国);TaKaRa逆转录试剂盒、Taq DNA Polymerase HotStart enzyme、T4连接酶(北京TaKaRa Bio公司);限制性内切酶Spe I、Sac I(NEB公司,美国);大肠杆菌TG1感受态细胞(深圳KT HEALTH公司);生物膜干涉技术(BLI, Pall ForteBio Corp公司,美国);倒置荧光显微镜(Leica公司,德国);咪唑(Biofroxx公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体文库的建立及免疫学筛选

每周对1只成年羊驼进行1次WT-RBD皮下注射来触发免疫反应,连续6次注射免疫后,通过TRIzol从外周血淋巴细胞中提取总RNA,使用逆转录试剂盒从总RNA中逆转录获得cDNA。随后,使用不同模板量的cDNA,通过Taq DNA Polymerase HotStart enzyme催化进行巢式PCR得到DNA产物。获得足够数量的DNA产物后,将pComb3XSS噬菌体质粒载体和DNA产物用限制性内切酶Spe I和Sac I酶切,然后用T4连接酶连接,即可获得含有目的基因的载体质粒。然后用电转移法将载体质粒转移到大肠杆菌TG1感受态细胞,建立目标纳米抗体的细菌文库。将细菌文库梯度稀释后平板划线,构建的菌库容量由单个菌落的总数决定。随机选取几种单克隆菌落进行菌落PCR,以评估单克隆抗体的阳性率。其他文库菌落均储存在-80℃冰箱。

将筛选抗原Delta-RBD包被免疫管,4℃过夜;PBS洗管后,室温封闭2h;加入制备的噬菌体文库孵育1h;PBST(1×PBS加0.1% Tween20)洗管后加入Trypsin溶液,室温旋转洗脱30min;加入10% AEBSF终止洗脱,将免疫管中的溶液转移至新的1.5 mL离心管中,即为第1轮筛选出的噬菌体洗脱液。将第1轮噬菌体洗脱液浸染感受态细胞TG1,获得1轮筛选过的噬菌体文库,重复此筛选方法3轮,获得筛选后的阳性文库。挑选筛选后的文库中的单克隆,进行单克隆ELISA,筛选出数个阳性Nb。为了进一步研究,对这些Nb进行测序,然后通过GENTle软件进行分析并翻译成氨基酸,根据互补决定区3(complementarity determining region 3, CDR3)的序列不同分为不同家族。

1.2.2 Nb的表达和纯化

从TG1细胞中提取克隆质粒,电转移到巴氏酵母菌X-33。将酵母菌在含有100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 博来霉素的酵母蛋白胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)中培养,然后挑取单克隆菌落,接种于含有100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 博来霉素的扩大培养基中,扩大培养后诱导表达,对菌液离心留取上清液。使用含有His标签的蛋白琼脂糖高速纯化树脂与上清液中的目的蛋白结合,分别用5 mmol/L咪唑、10 mmol/L咪唑溶液脱杂蛋白2遍,最终用500 mmol/L咪唑洗脱。纯化目的蛋白后通过琼脂糖凝胶电泳纯度分析,并通过Amicon®Ultra-4离心过滤装置浓缩。

1.2.3 亲和力实验

通过ELISA测定4种Nb与WT-RBD蛋白及其变体的结合活性。WT-RBD、Delta-RBD或Omicron-RBD溶解于pH为9.6的CBS溶液(1.59 g Na_2CO_3 与2.94 g NaHCO_3 加蒸馏水定容至1 000 mL)中(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加至高结合力96孔酶板上(每孔100 μL),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜后PBST洗板,随后3% BSA室温下封闭1 h再次洗板,每孔加入含有Nb的3% BSA室温下孵育2 h后洗板5次,随后加入抗myc标签抗体(HRP)室温孵育1 h再次洗板,随后加入TMB单组分显色溶液,避光显色,显色结束后加入TMB显色终止液(450 nm,不含硫酸)终止显色反应,用酶标仪读取450 nm处的吸光度值。本研究还进一步通过使用不同浓度RBD与几种Nb结合显色后的吸光度值计算得到了各个抗体的半数效应浓度(EC_{50})。

1.2.4 生物膜干涉技术(bio-layer interferometry, BLI)实验检测Nb对Omicron-RBD的亲和力

通过BLI分析Nb对Omicron-RBD的亲和力。首先,将Omicron-RBD稀释至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后装入APS生物传感器中10 min,调整3种Nb浓度为1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 进行预实验。确定每个Nb的最大可用浓度后,在不同Nb浓度的基础上设置6个实验组:最大浓度,稀释2倍、4倍、8倍、16倍和空白对照。检测缓冲液为添加0.1% BSA和0.02% Tween的PBS。通过600 s的结合,以及随后的300 s解离,测定出几种Nb与RBD蛋白的结合能力。采用八元系统数据分析软件对原始数据进行拟合,最终确定拟合常数(R^2)和平衡解离常数(K_D)。

1.2.5 假病毒中和试验

为感染COVID-19-Spike(XBB1.5)蛋白假病毒,将293T-ACE2细胞接种到96孔细胞培养板中。随后将不同浓度的Nb45(50、100和200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)与假

病毒在37 $^{\circ}\text{C}$ 下混合1 h。孵育完成后,将混合物加入到293T-ACE2细胞中,孵育24 h后切换成新鲜培养基。然后用Hoechst 33342染料对细胞进行染色,观察细胞核,然后通过倒置荧光显微镜观察不同实验组的荧光信号。

1.2.6 AlphaFold2建模和分子对接

通过AlphaFold2.ipynb (<https://colab.research.google.com/>)在线模拟生成WT-RBD、Delta-RBD、Omicron-RBD和4种Nb的三维结构。随后将4种Nb通过ZDOCK(<https://zdock.umassmed.edu/>)分别在线对接到不同的RBD上,每个结合均给出了前10名预测结果。选取预测结果第1名作为后续实验对象,通过DrugScore PPI (<https://cpclab.uni-duesseldorf.de/>),预测它们的结合位点,将 $\text{ddGcalc} > 3 \text{ Kcal/mol}$ 或 ddGcalc 最高的位点作为预测的结合位点。最后通过Pymol软件进行结构修饰,得到分子对接结果及结合位点。

1.2.7 热稳定性和pH稳定性的评价

为了探究Nb的理化性质,使用不同条件处理Nb后进行ELISA实验。在探究热稳定性实验中,将Nb在不同温度[室温(room temperature, RT)、40 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 、95 $^{\circ}\text{C}$]孵育10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同时间(0、10 min、30 min、1 h、2 h、6 h、12 h、18 h、24 h);37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同时间(0、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、10 d),通过ELISA实验测定处理后的Nb与抗原的结合能力。

为了探究pH稳定性,将4个Nb在不同的pH值(3、5、7、9、11)下溶解于3%的BSA中,并在室温下孵育2 h。同样通过ELISA实验测定处理后的Nb与抗原的结合能力。

1.3 统计学方法

通过GraphPad Prism软件进行统计分析,实验均重复3次,计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 靶向WT-RBD Nb文库的构建

为了获得靶向WT-RBD的Nb,本研究构建了一个大型且高度多样化的文库。首先,用WT-RBD蛋白免疫羊驼6次,之后从外周血淋巴细胞中提取总RNA(图1A),通过cDNA制备、VHH基因扩增构建细菌文库(图1B、C)。后续测得细菌文库容量为 9.6×10^8 pfu,同时通过随机选取48个单克隆菌落进

行PCR分析,结果显示细菌文库阳性率为95.83%(图1D)。随后通过细菌文库及辅助噬菌体初步构建出噬菌体文库,效价为 1.64×10^{12} pfu/mL。这些结果表明,本研究建立了一个靶向WT-RBD的Nb文库。

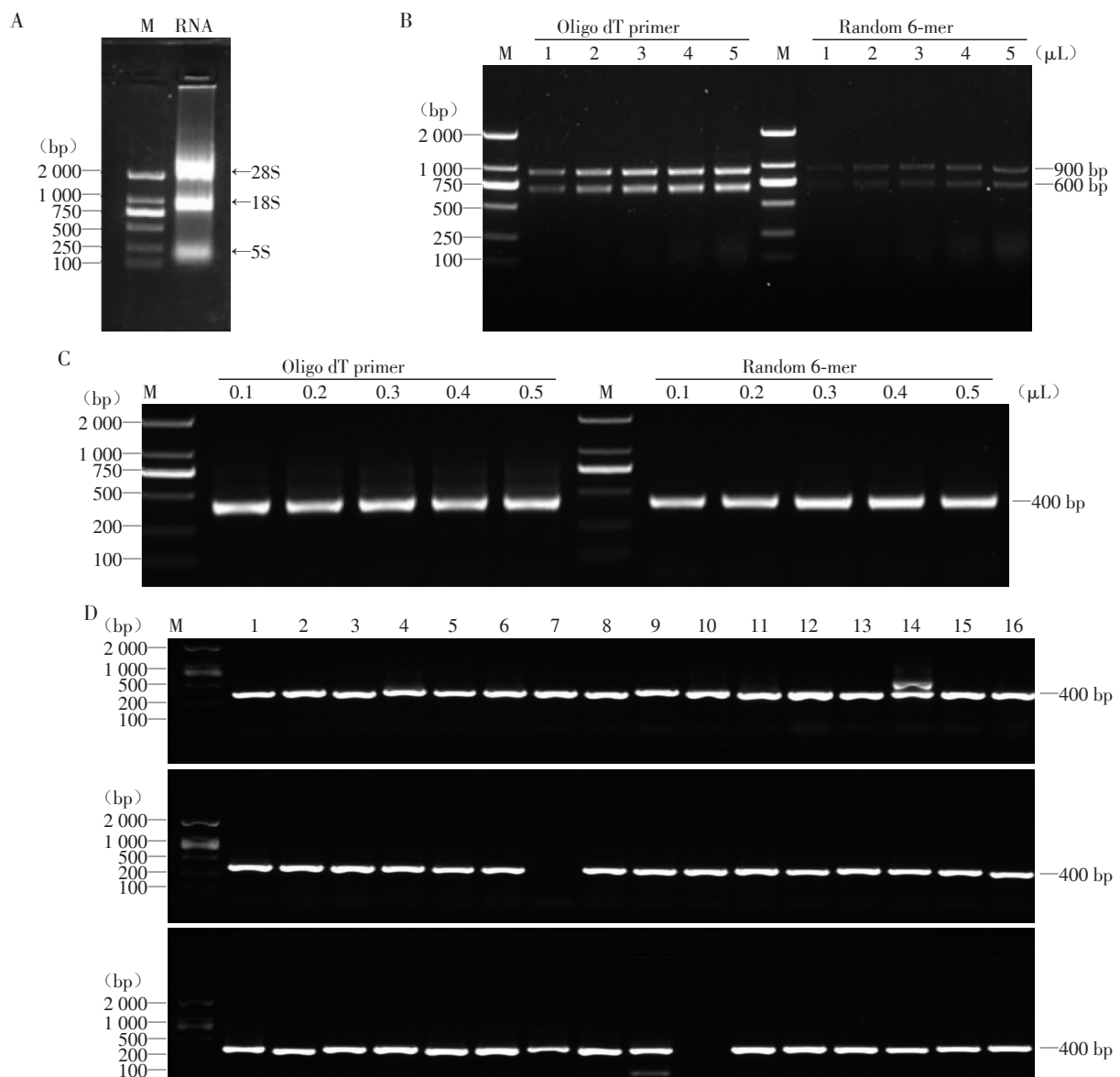
2.2 利用Delta-RBD筛选Nb

使用Delta-RBD对噬菌体文库进行免疫管筛选和单菌落ELISA从而筛选出靶向Delta-RBD的Nb。经过3轮富集,噬菌体文库逐渐扩增200倍。随后,通过2轮ELISA从192个随机克隆中选择出125个结合率 >3 的阳性克隆(图2A)。对所有阳性克隆菌落进行测序并进行比对,去除重复序列,得到48个不同的序

列。通过Clustal Omega对48个序列进行系统发育树分析(图2B),此举为筛选中和Nb提供了更多选择和潜在的候选对象。由于互补决定区3(complementarity determining region 3, CDR3)序列的多样性,选择Nb34、Nb42、Nb45和Nb48作为Delta-RBD的结合抗体进行进一步研究。

2.3 Nb的表达、纯化和鉴定

考虑到将来的应用范围、生产成本和大规模生产可能性,选择毕赤酵母系统进行表达。用Ni-NTA蛋白琼脂糖高速纯化树脂纯化诱导表达出的Nb。SDS-PAGE分析显示,纯化的Nb34、Nb42、Nb45和



A: The electrophoresis results verified the quality and purity of the total RNA. B: In the first round of PCR amplification, gel electrophoresis showed clear bands of cDNA templates amplified by two primers. C: In the second round of PCR amplification, gel electrophoresis was performed using different amounts of cDNA templates. D: Among the 48 screened clones, the positive rate was 95.83%. M: marker.

图1 建库过程中部分凝胶电泳结果图

Figure 1 Results of partial agarose gel electrophoresis during library building

Nb48蛋白分子量符合预期(图3A)。纯化得到的Nb纯度较高,可用于进一步研究。

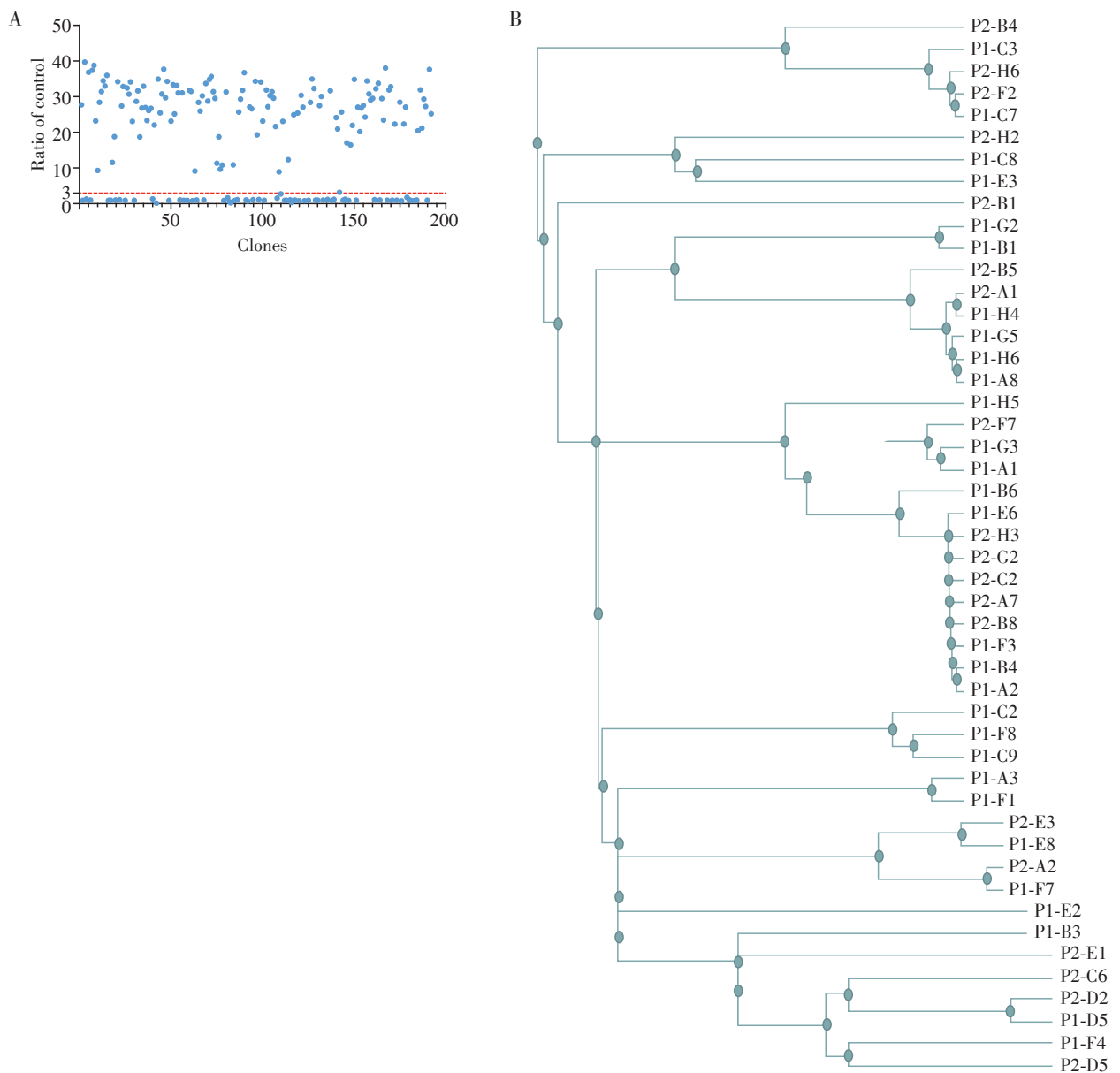
通过ELISA检测了4种Nb对WT-RBD的亲和力,结果表明,4种Nb在450 nm处均具有较高的吸光度(图3B)。并且,通过后续实验计算得出各纳米抗体的EC₅₀均低于20 nmol/L,说明这4种Nb对WT-RBD具有良好的亲和力(图3C)。

2.4 Nb有效结合SARS-CoV-2变体

由于SARS-CoV-2突变会导致其逃避结合抗体的中和,对4种Nb与SARS-CoV-2变体的亲和力进

行深入研究。ELISA实验证实了4种Nb对Delta-RBD和Omicron-RBD的亲和力。值得注意的是,除了Nb48对Delta和Omicron突变株表现出亲和力稍弱外,其他Nb均表现出较高的亲和力(图4A、B)。进一步实验探究了Nb34、Nb42和Nb45对突变株RBD的EC₅₀,结果显示3种Nb对Delta-RBD(EC₅₀分别为18.94 nmol/L、6.93 nmol/L、6.64 nmol/L)和Omicron-RBD(EC₅₀分别为7.95 nmol/L、13.59 nmol/L和8.91 nmol/L)均具有良好的亲和力(图4C~E)。

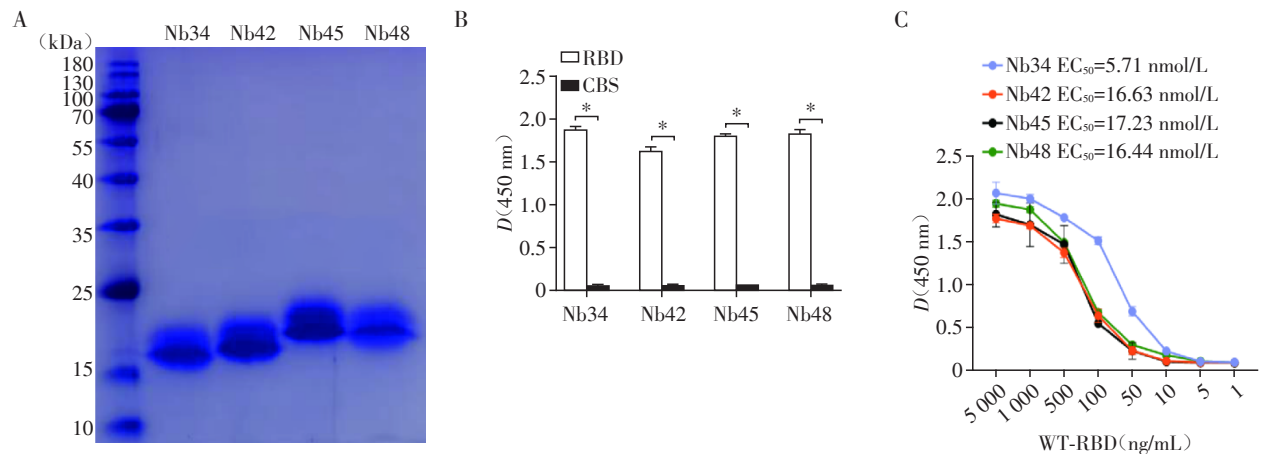
此外,本研究通过生物膜干涉技术评估了这3个



A: Clones with a binding rate greater than 3 were identified as positive clones through the PE-ELISA experiment. B: A phylogenetic tree targeting the SARS-CoV-2 RBD binding domain nanobody was constructed using the neighbor-joining method in Clustal Omega.

图2 Nb文库阳性克隆筛选及系统发育树的建立

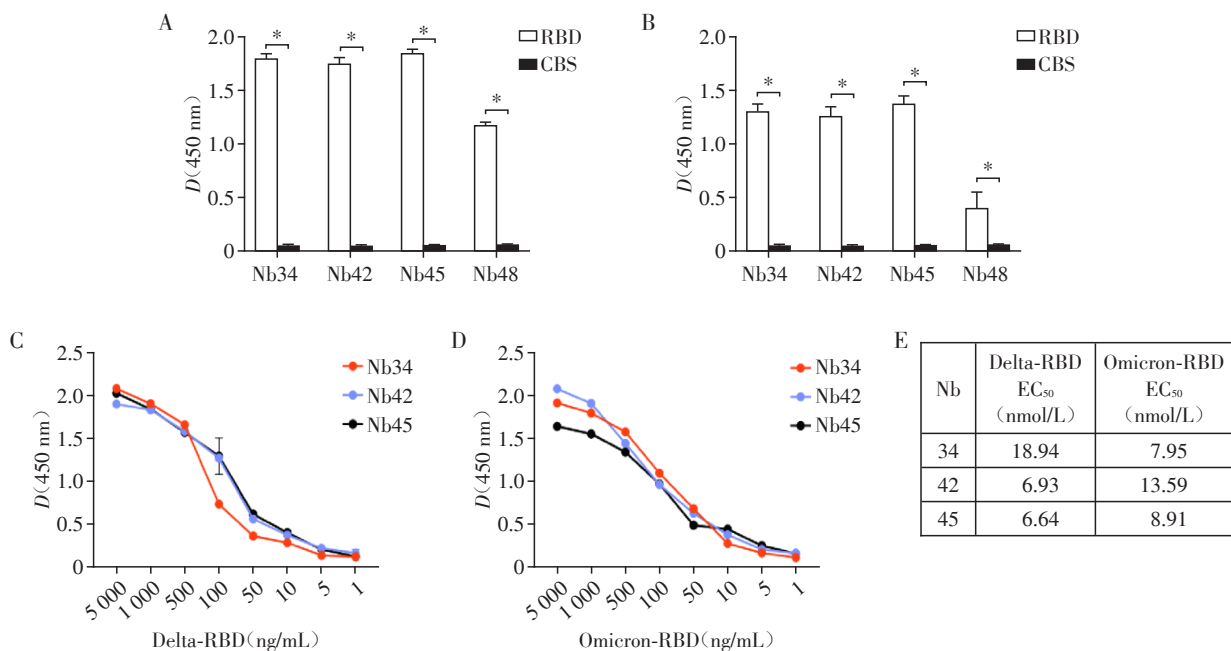
Figure 2 Screening of positive clones of nanoantibodies library and establishment of a phylogenetic tree



A: The nanobodies were expressed through the *Pichia pastoris* expression system and then purified, followed by stained with Coomassie brilliant blue. B: The ELISA experiment verified that all four nanobodies had affinity for WT-RBD. Compared with the blank control group, $P < 0.05$. C: Different concentrations of WT-RBD were used to conduct ELISA experiments with the four nanobodies respectively to obtain the $D(450 \text{ nm})$ value, and the EC_{50} was calculated ($n=3$).

图3 Nb的表达纯化及与WT-RBD的结合

Figure 3 Expression and purification of Nbs and binding to WT-RBD



A, B: ELISA experiments demonstrated that except for Nb48, the other three nanobodies had high affinities for both Delta-RBD (A) and Omicron-RBD (B). Compared with the blank control group, $P < 0.05$. C-E: ELISA experiments were conducted using different concentrations of Delta-RBD (C) and Omicron-RBD (D) with the four nanobodies to obtain the $D(450 \text{ nm})$ and EC_{50} (E) was calculated ($n=3$).

图4 Nb与Delta-RBD及Omicron-RBD的结合

Figure 4 Nanobodies bind to Delta-RBD and Omicron-RBD

Nb与Omicron-RBD的结合动力学。结果显示3种Nb均表现优越(表1)。这些结果表明,这几种Nb可以有效地中和Delta-RBD和Omicron-RBD。

2.5 Nb45体外抑制Omicron突变株假病毒的感染

如前所述,Nb45与SARS-CoV-2变体具有良好结合能力,进一步研究Nb45是否也能对Omicron突

变株假病毒起效。实验结果与预期相符,与Nb45共孵育后,Omicron突变株假病毒进入GFP阳性的293T-ACE2细胞的数量明显减少。定量实验显示,与200 $\mu\text{mol/L}$ Nb45共孵育后,Omicron突变株假病毒进入GFP阳性的293T-ACE2细胞的数量减少了93%(图5)。这些结果表明,Nb45是一种有效的

表1 BLI验证亲和力

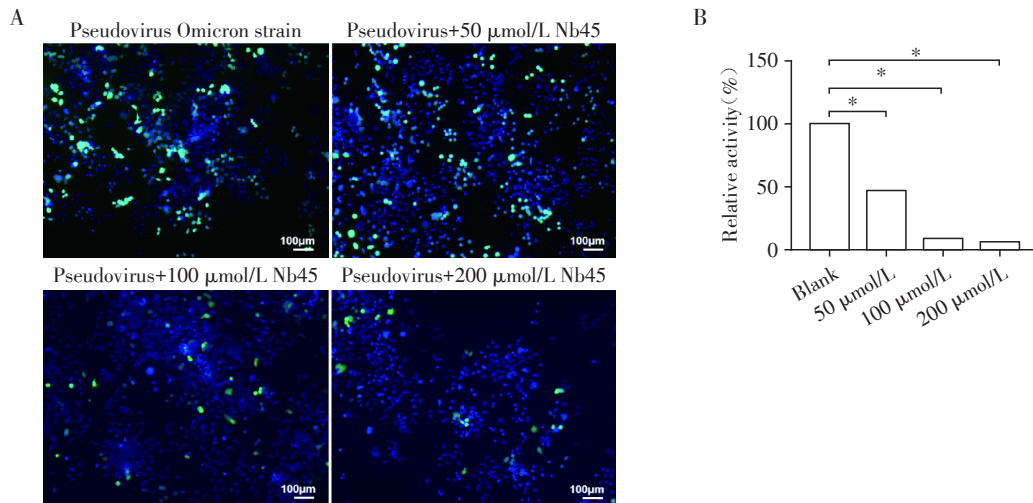
Table 1 BLI verification of affinity

Name	KD($\bar{x} \pm s$)	R ²
Omicron-RBD+Nb34	$2.118 \times 10^{-7} \pm 1.801 \times 10^{-8}$	0.932
Omicron-RBD+Nb42	$5.349 \times 10^{-8} \pm 3.575 \times 10^{-9}$	0.892
Omicron-RBD+Nb45	$5.974 \times 10^{-7} \pm 3.877 \times 10^{-8}$	0.892

SARS-CoV-2 及其变体的中和Nb。

2.6 分子对接分析

为了直观地评估4种Nb的广泛中和作用,使用AlphaFold2等工具来构建分子模型,并将抗原与抗体对接。图5显示了每个Nb与SARS-CoV-2原始株、Delta变体和Omicron变体之间的相互作用。其



A: The green in the fluorescence image indicates the Omicron pseudovirus, and the blue represents 293T cells. B: The bar graph shows that compared with the blank control, Nb45 prevents the entry of the Omicron pseudovirus into 293T cells. * $P < 0.05, n=3$).

图5 Nb45阻止Omicron假病毒进入293T细胞

Figure 5 Nb45 prevents Omicron pseudovirus entry into 293T cells

中,红色标记表示Nb位点,蓝色标记表示RBD位点(图6A)。进一步分析显示,预测的结合位点均属于保守位点,这就证明了4种Nb对SARS-CoV-2及其更多变体广泛的中和潜力(图6B)。

2.7 Nb具有优越的理化特性

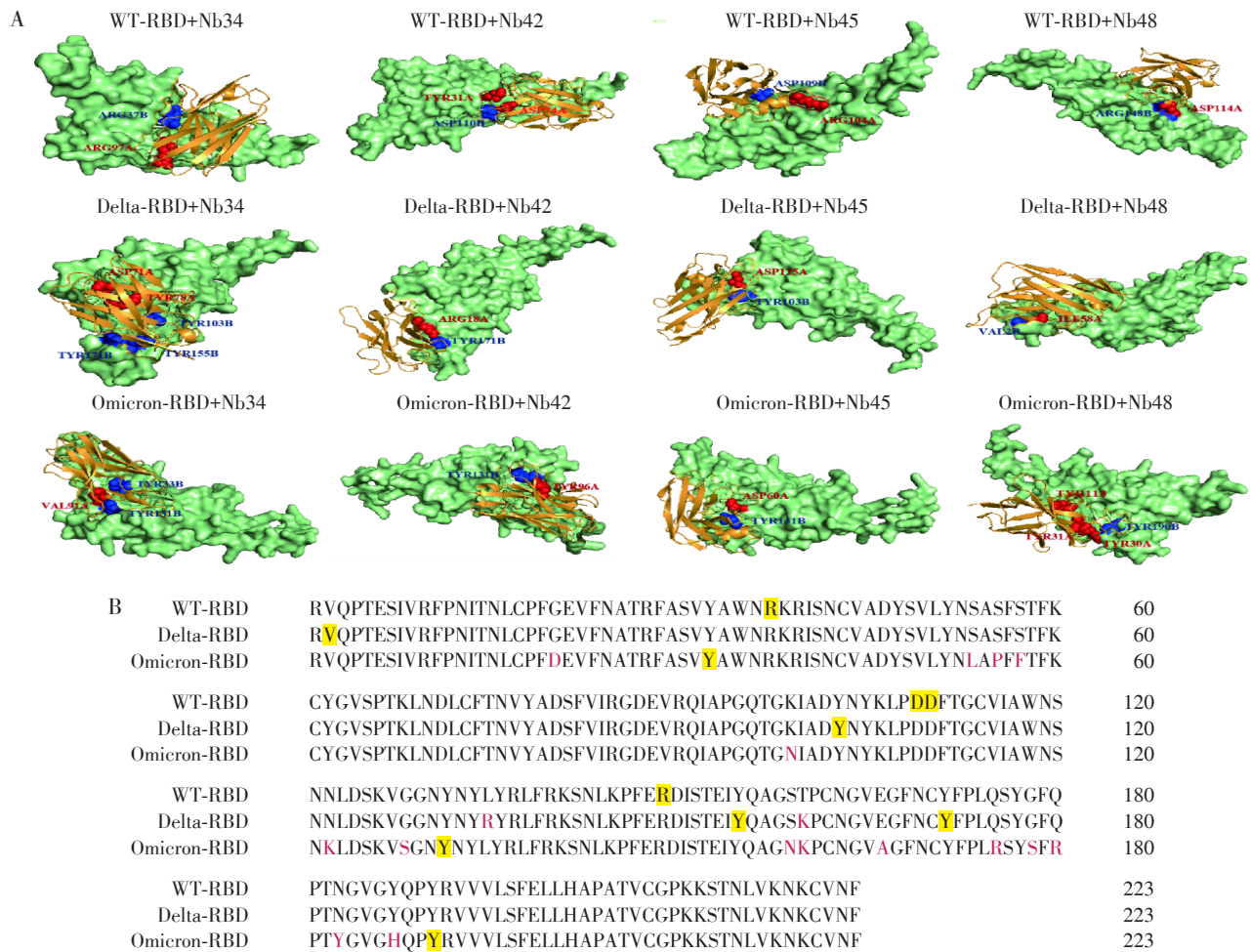
为了测试Nb的物理稳定性,将4种Nb暴露在不同条件下,包括不同温度和pH值(图7)。在RT和40、60、80、90和95℃下孵育10min后,4种Nb均保持着良好的亲和力(图7A)。在37℃下,10d内4种Nb活性保持在70%左右(图7B)。即使在95℃孵育2h后,4种Nb的结合活性仍均>75%(图7C)。另外,4种Nb的结合活性在环境酸碱度达到一定程度后才会受到限制(图7D)。上述结果表明,这4种Nb是高度稳定的,它们的用途必将不会受限于临床运输和保存等。

3 讨论

本研究利用WT-RBD免疫羊驼建立噬菌体文库,随后通过Delta-RBD对文库进行筛选,诱导表达后获得了4株Nb,即Nb34、Nb42、Nb45、Nb48。实验证明其与SARS-CoV-2及其变体具有良好的结合能

力,并证实Nb45具有中和Omicron变体假病毒的能力。此外,本研究还证明了这4种Nb具有较高的热稳定性和pH稳定性。通过预测Nb与RBD相互作用的结构,进一步阐明了它们中和SARS-CoV-2及其变体的机制。这一策略成功获得能够识别SARS-CoV-2及其变体的广谱Nb,并且这种方法广泛适用于防治不断变异的病毒,如流感病毒、艾滋病毒等。这项研究为推进多种病毒的疫苗以及诊断方法的开发提供了新思路。

SARS-CoV-2是一种单链阳性RNA病毒,属于乙型冠状病毒属^[10-11]。SARS-CoV-2的刺突蛋白是一种三聚体跨膜蛋白,由2个功能亚基——S1和S2组成。S1亚基,特别是其RBD,通过与人血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme2, ACE2)结合,在促进病毒进入宿主细胞当中发挥着关键作用^[12-13]。因此,SARS-CoV-2刺突蛋白,尤其是RBD结合域,是各类研究主要的抗原靶点,如开发检测试剂盒、疫苗、中和抗体以及病毒抑制剂等。虽然目前有诸多针对刺突蛋白特别是RBD的单克隆抗体,但是SARS-CoV-2的不断变异提高了其免疫逃逸能力,从而降低了这些抗体的中和能力^[14-17]。因



A: Molecular models of four nanobodies binding to different RBDs, with red labels indicating nanobody sites and blue labels indicating RBD sites.
B: Sequence comparison of WT-RBD, Delta-RBD and Omicron-RBD, with red indicating the mutation sites of the mutants and yellow background indicating the predicted binding sites of each RBD with the four nanobodies, and all predicted binding sites are conserved sites.

图6 Nb与RBD结合分子模型及位点分析

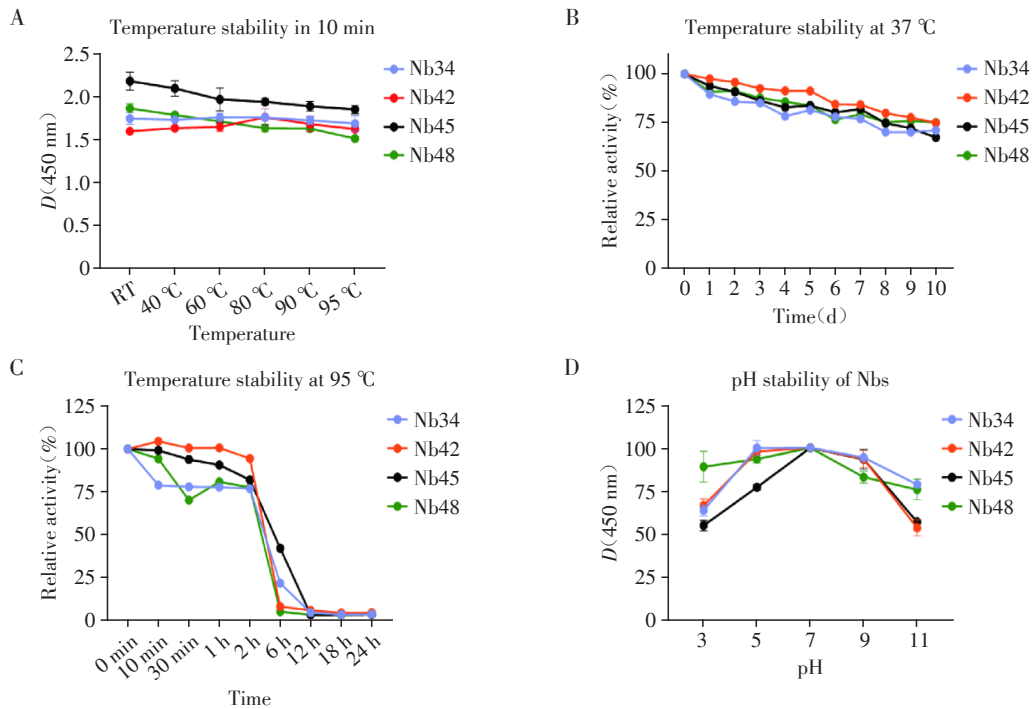
Figure 6 Molecular modeling and site analysis of nanobodies binding to RBD

此,通过更优的筛选策略获得抗体以应对病毒突变带来的挑战尤为重要。

在病毒的流行过程中,它们的基因突变率和重组率很高,这是其能够引起季节性甚至全球性流行病的关键因素^[18]。随着病毒的抗体中和位点基因发生突变并广泛传播,原来疫苗的有效性会随之降低,导致病毒能够部分逃避抗体识别^[19-20]。虽然现存的COVID-19疫苗对预防SARS-CoV-2感染有效,但由于接种疫苗引起的免疫反应不断下降以及新变体的不断出现显著地增加了感染SARS-CoV-2的风险^[21]。因此,需要制备能够靶向新变体的广谱中和抗体。

目前已有一些研究开发了针对WT-RBD的Nb,但是效果并不尽如人意。Huo等^[22]开发了2种Nb(H11-D4和H11-H4)能够靶向结合WT-RBD,并阻

断其与ACE2的相互作用,这2种Nb的EC₅₀分别为61 nmol/L和161 nmol/L,不过它们与其他变体的亲和力尚待验证。Lu等^[23]分别获得了靶向S蛋白(Nb91-hFc)、靶向WT-RBD(Nb3-hFc)以及同时靶向S蛋白和WT-RBD(Nb35-hFc)的Nb,然而这些Nb对其他多种变体的亲和力同样有待考证。现有研究所描述的SARS-CoV-2中和Nb的亲和效力不同,EC₅₀从61 nmol/L到近1 300 nmol/L^[4, 24-25]。本研究中Nb34对WT-RBD的结合活性最强,EC₅₀值为5.71 nmol/L。另外,其他3个Nb与WT-RBD结合的EC₅₀值也<18 nmol/L。另外,除Nb48外,其余3个Nb与Delta和Omicron变体的结合能力也较强,EC₅₀在6.64~18.94 nmol/L。本研究结果为开发针对SARS-CoV-2及其变体的高效治疗方法提供了坚实基础。



Four types of nanobodies were incubated at different temperatures or pH values, and the affinity of the treated nanobodies to WT-RBD was detected by ELISA. A: Nanobodies were incubated at RT, 40, 60, 80, 90 and 95 °C for 10 min respectively. B: Nanobodies were incubated at 37 °C for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days. C: Nanobodies were incubated at 95 °C for 0, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 18 h and 24 h. D: Nanobodies were incubated at different pH values for 2 h. The OD values at 450 nm was determined by ELISA (n=3).

图7 实验验证Nb的热稳定性和pH稳定性

Figure 7 Experimentally verify the thermal stability and pH stability of the nanobodies

现有文献显示,传统抗体在中和SARS-CoV-2方面具有较大潜力,然而这些抗体的缺点也较为显著,如开发成本高、组织渗透能力有限、特异性较低等。组织中被动扩散的速率与分子大小成反比,Nb分子量小,因此其组织通透性较高,易于进入病变部位。并且,Nb具有高亲和力和较多的结合表位,相比传统抗体,它们与病毒的结合更加敏感。此外,Nb具有优越的热稳定性和pH稳定性,这就说明其应用不会受限于临床运输和保存^[26]。与传统单克隆抗体相比,Nb还具有较低的生产成本和较高的产量,这也是它们的独特优势。总而言之,Nb具有优越的物理特性,使其在防治传染病方面具有相当可观的前景。

本研究所描述的4种Nb可以结合SARS-CoV-2及其变体的RBD结合域,其中Nb45还可以在体外中和Omicron突变株假病毒。然而,现有的中和试验具有局限性,需要评估更多突变株以及假病毒株。另外,根据预测结构显示,与4种Nb相互作用的RBD位点均属于保守位点,这些结论都可能有助于防治SARS-CoV-2及其变体。尽管COVID-19大流行已结束,本研究获得的保守抗体对于未来应对变化多样的

冠状病毒仍然具有一定的战略意义,简易的抗体筛选策略对于易突变病毒的防控也具有借鉴意义。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

The authors declare that they have no competing interests.

作者贡献声明:

汪佰成、倪晶怡、刘馨月负责实验操作、数据分析并准备文章初稿。季晨博负责文章的修订。季晨博和龚雪负责整个课题的构思并提供总体方向。

Author's Contributions:

WANG Baicheng, NI Jingyi, and LIU Xinyue conducted the experiments, analyzed the data, and prepared the manuscript. JI Chenbo was involved in revising the manuscript. JI Chenbo and GONG Xue conceived the study and provided overall direction for the project.

[参考文献]

[1] GAI J W, MA L L, LI G H, et al. A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential[J]. Med Comm(2020), 2021, 2(1): 101-113
[2] World Health Organization. Number of COVID-19 cases

- and deaths reported to WHO (cumulative total)[EB/OL]. [2024-12-31]. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=o>.
- [3] SU Q L, SHI W, HUANG X N, et al. Screening, expression, and identification of nanobody against SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3355
- [4] WU D D, CONG J X, WEI J L, et al. A naïve phage display library-derived nanobody neutralizes SARS-CoV-2 and three variants of concern [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 5781-5795
- [5] LIU M M, LI L, JIN D, et al. Nanobody-a versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13(4): e1697
- [6] KIJANKA M, DORRESTEIJN B, OLIVEIRA S, et al. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors[J]. *Nanomedicine(Lond)*, 2015, 10(1): 161-174
- [7] JIN B K, ODONGO S, RADWANSKA M, et al. NANOBODIES®: a review of diagnostic and therapeutic applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5994
- [8] FRIDY P C, LI Y Y, KEEGAN S, et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(12): 1253-1260
- [9] JOVČEVSKA I, MUYLDERMANS S. The therapeutic potential of nanobodies[J]. *BioDrugs*, 2020, 34(1): 11-26
- [10] WRAPP D, WANG N S, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. *bioRxiv*, 2020: 2020.02.11.944462
- [11] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269
- [12] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280
- [13] WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 281-292
- [14] STARR T N, GREANEY A J, DINGENS A S, et al. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016[J]. *bioRxiv*, 2021: 2021.02.17.431683
- [15] ACTIV-3/THERAPEUTICS for Inpatients with COVID-19 Study Group. Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BRII-196 plus BRII-198, for adults hospitalised with COVID-19(TICO): a randomised controlled trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(5): 622-635
- [16] FAROUQ M A H, ACEVEDO R, FERRO V A, et al. The role of antibodies in the treatment of SARS-CoV-2 virus infection, and evaluating their contribution to antibody-dependent enhancement of infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6078
- [17] LAN J, GE J W, YU J F, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor[J]. *Nature*, 2020, 581(7807): 215-220
- [18] TANNER A R, DOREY R B, BRENDISH N J, et al. Influenza vaccination: protecting the most vulnerable [J]. *Eur Respir Rev*, 2021, 30(159): 200258
- [19] CASTRO DOPICO X, OLS S, LORÉ K, et al. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination [J]. *J Intern Med*, 2022, 291(1): 32-50
- [20] STANDING J F, BUGGIOTTI L, GUERRA-ASSUNCAO J A, et al. Randomized controlled trial of molnupiravir SARS-CoV-2 viral and antibody response in at-risk adult outpatients [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1652
- [21] XU J L, XU K, JUNG S, et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants [J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 278-282
- [22] HUO J D, LE BAS A, RUZA R R, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(9): 846-854
- [23] LU Q Z, ZHANG Z L, LI H X, et al. Development of multivalent nanobodies blocking SARS-CoV-2 infection by targeting RBD of spike protein [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 33
- [24] YANG J, LIN S, CHEN Z M, et al. Development of a bispecific nanobody conjugate broadly neutralizes diverse SARS-CoV-2 variants and structural basis for its broad neutralization [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19(11): e1011804
- [25] SCHOOF M, FAUST B, SAUNDERS R A, et al. An ultra-potent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive spike [J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1473-1479
- [26] SALVADOR J P, VILAPLANA L, MARCO M P. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(9): 1703-1713

[收稿日期] 2025-01-21

(本文编辑:戴王娟)