

· 综 述 ·

纳米抗体的研究进展及其应用现状

董新莹, 高晓薇, 宋浩, 仇华吉*, 罗玉子*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069

董新莹, 高晓薇, 宋浩, 仇华吉, 罗玉子. 纳米抗体的研究进展及其应用现状[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4324-4338.
DONG Xinying, GAO Xiaowei, SONG Hao, QIU Huaji, LUO Yuzi. Research progress and application of nanobodies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4324-4338.

摘 要: 纳米抗体(nanobodies, Nbs)是在骆驼科动物和鲨鱼中发现的一种独特的单域抗体, 即重链抗体可变区(variable domain of the heavy chain of heavy-chain antibody, VHH), 具有很强的抗原靶向性和结合能力, 规避了传统抗体体积大、稳定性低、免疫原性高以及清除速度慢的缺点。Nbs 与毒素、酶、放射性核苷酸、荧光基团等官能团的生物偶联, 增强了 Nbs 的功能, 使其在人与动物疾病诊断和治疗方面展现出潜在的应用价值。本文综述了 Nbs 的结构特性, Nbs 库的构建、筛选以及亲和力成熟策略, 概述了 Nbs 在诊断和治疗中的应用现状, 为疫病的诊断试剂研发与临床治疗提供了参考。

关键词: 纳米抗体; 亲和力成熟; 免疫治疗; 疫病诊断

Research progress and application of nanobodies

DONG Xinying, GAO Xiaowei, SONG Hao, QIU Huaji*, LUO Yuzi*

State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: Nanobodies (Nbs), the unique single-domain antibodies discovered in the species of Camelidae and sharks, are also known as the variable domain of the heavy chain of heavy-chain antibody (VHH). They offer strong antigen targeting and binding capabilities and overcome the drawbacks such as large size, low stability, high immunogenicity, and slow clearance of conventional antibodies. Nbs can be boosted by bioconjugation with toxins, enzymes, radioactive nucleotides, fluorophores, and other functional groups, demonstrating potential applications in the diagnosis and treatment of human and animal diseases. This article introduces the structures and characteristics of Nbs, the construction and screening of Nb libraries, and the strategies for affinity maturation and then reviews the current applications of

资助项目: 黑龙江省自然科学基金(LH2023C052)

This work was supported by the Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation (LH2023C052).

*Corresponding authors. E-mail: QIU Huaji, qiuhuaji@caas.cn; LUO Yuzi, luoyuzi@caas.cn

Received: 2024-05-02; Accepted: 2024-09-11; Published online: 2024-09-12

Nbs in diagnosis and treatment, providing a reference for the development of diagnostic reagents and clinical therapies for infectious diseases.

Keywords: nanobodies; affinity maturation; immunotherapy; diagnosis of infectious disease

传统的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 在诊断和治疗领域广泛应用, 但其存在体积大、结构复杂、生产耗时以及对哺乳动物细胞表达的依赖性强等问题^[1]。随着基因工程技术的快速发展, 抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)以及单链抗体(single-chain fragment variable, scFv)有望成为传统抗体的替代品。这两类抗体虽然保持了良好的抗原特异性, 但因缺乏 Fc 结构域, 增加了抗体片段聚集和错误折叠的风险, 同时这些抗体片段的产量、溶解度以及稳定性较低, 影响了抗体的大规模生产^[2-3]。近年来, 在骆驼科动物和鲨鱼中发现的纳米抗体(nanobodies, Nbs)因其纳米级大小、高稳定性、高亲和力以及高渗透性等特性, 在多个领域引起广泛关注并展现出潜在的应用价值^[4]。本文对 Nbs 的结构、特性、筛选以及应用等方面进行概述与分析, 并对其未来发展方向和前景做出展望, 以期对疫病的诊断与治疗提供参考。

1 纳米抗体概述

Nbs 由 Hamers-Casterman 等^[5]于 1993 年首次报道, 他们从骆驼科动物的血清中分离出仅有重链的同源二聚体, 这种同源二聚体被称为重链抗体(heavy-chain antibody, HCAb), 为了与传统抗体的重链可变区(heavy-chain variable region, VH)加以区分, 将 HCAb 的 N 端具有功能性抗原结合特性的单个可变结构域称为重链抗体可变区片段(variable domain of heavy-chain antibody, VHH), 分子量约为 15 kDa, 又被称为 Nbs^[6]。除了骆驼科动物, 在鲨鱼血清中也发现了类似 HCAb 结构的免疫球蛋白新抗原受体(immunoglobulin new antigen receptor, IgNAR),

其 N 端具有大小仅为 12 kDa 的抗原受体可变区(variable domain of new antigen receptor, VNAR), VHH 或 VNAR 是源自骆驼科动物或软骨鱼类中天然存在的 HCAb 或 IgNAR 的最小的完整抗原结合域^[7-8]。

1.1 纳米抗体的结构

传统抗体由 2 条相同的重多肽链(H 链)和 2 条相同的轻多肽链(L 链)组成, L 链包括 2 个结构域, 而 H 链折叠成 4 个结构域, H 链和 L 链的 N 端结构域的序列因抗体而异, 即抗体的重链可变区(heavy-chain variable region, VH)和轻链可变区(light-chain variable region, VL)^[9](图 1A)。骆驼科动物血清中分离的 HCAb 与传统抗体相比缺乏轻链和 CH1 区, 可变区只包含 1 个 VHH 片段(图 1B), 驼源 Nbs 与传统抗体的 VH 具有相同的结构域, 即 4 个保守骨架区(framework region, FR)和 3 个互补决定区(complementarity-determining region, CDR)^[10]。鲨鱼血清中分离出的 IgNAR 天然缺失 VL, 仅有 2 条 VH 形成同源二聚体, 它的 VH 是由 1 个可变区和 5 个恒定区组成, 其中可变区包含 1 个完整的抗原结合域 VNAR^[11](图 1C)。

传统抗体的 VH 中保守骨架区 2 (framework region 2, FR2)内有 4 个高度保守的疏水性氨基酸(V42、G49、L50 和 W52), 并通过形成疏水界面促进 VH 与 VL 的连接以维持 IgG 的稳定, 但是 IgG 在高浓度下易出现聚集以及错配的现象。而在驼源 VHH 抗体中, 上述 4 个疏水性氨基酸被替换成亲水性的氨基酸(F42 或 Y42、E49、R50 和 G52), 并且这些亲水性氨基酸能够促进 Nbs 在单体状态下维持构象的稳定, 同时也增加了 Nbs 的水溶性,

提高了药物的利用率^[12]。对 Nbs 进行基因改造后,可以形成单价、多价、多特异性以及融合 Nbs 等不同类型^[13](图 2A)。其中多价 Nbs 相较于单价 Nbs 亲和力更高;而多特异性 Nbs 可以识别不同的抗原表位,在抗肿瘤应用中具有重要作用;将 Nbs 单体与不同物质如酶、荧光基团以及药物进行偶联,可以在成像或治

疗中广泛应用^[14](图 2B)。此外,驼源 VHH 的互补决定区 3 (complementarity-determining region 3, CDR3)由 16-18 个氨基酸组成,而人源 VH 的 CDR3 仅由 14 个氨基酸组成,驼源 VHH 具有更长的 CDR3,可以形成凸环结构,能够特异性地与酶活性位点以及病毒颗粒的保守表位结合,增强对隐藏抗原表位的识别能力^[15-16]。

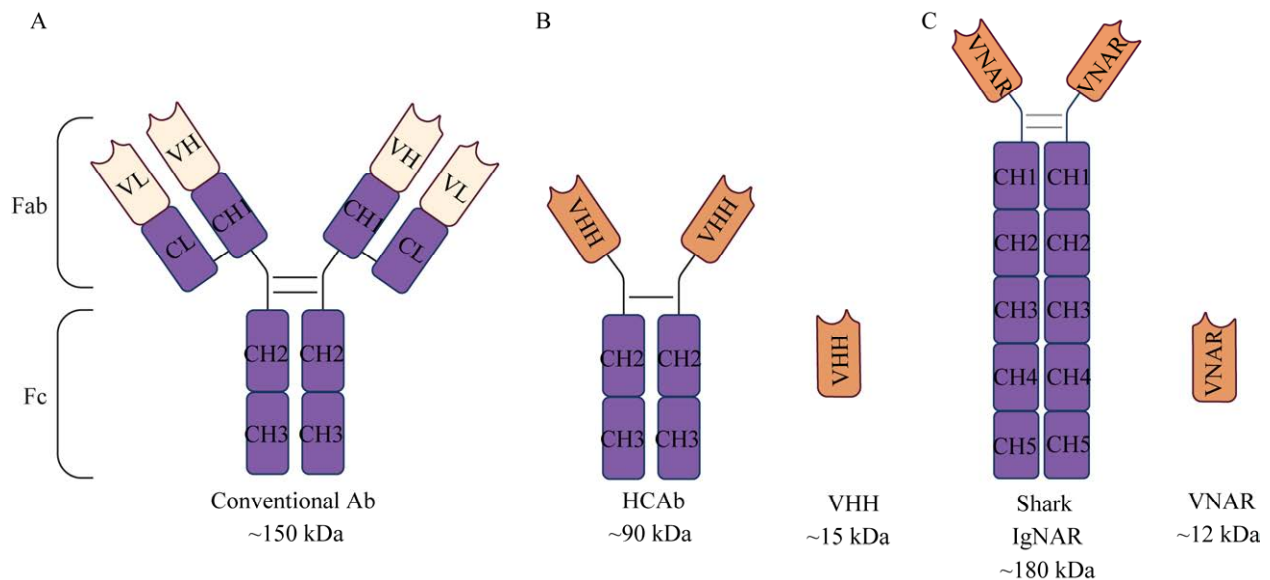


图 1 传统抗体与纳米抗体结构示意图 A:传统抗体. B:重链抗体与纳米抗体. C:鲨源纳米抗体. VL:轻链可变区; VH:重链可变区; CL:轻链恒定区; CH:重链恒定区; Ab:抗体; VHH:重链抗体可变区片段; HCAb:重链抗体; VNAR:抗原受体可变区; IgNAR:免疫球蛋白新抗原受体

Figure 1 Schematic diagram of the structure of conventional antibody and nanobody. A: Conventional antibody. B: Heavy-chain antibody and nanobody. C: Shark nanobody. VL: Light-chain variable region; VH: Heavy-chain variable region; CL: Light-chain constant region; CH: Heavy-chain constant region; Ab: Antibody; VHH: Variable domain of heavy-chain antibody; HCAb: Heavy-chain antibody; VNAR: Variable domain of new antigen receptor; IgNAR: Immunoglobulin new antigen receptor.

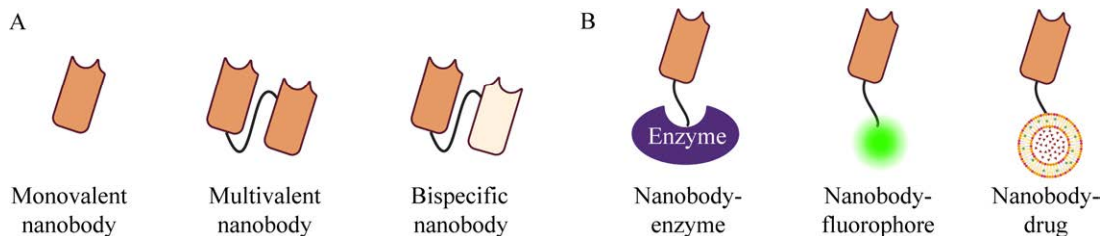


图 2 纳米抗体类型示意图 A: 单价、双价、双特异性纳米抗体. B: 纳米抗体偶联物

Figure 2 Schematic diagram of the types of nanobodies. A: Monovalent, multivalent and bispecific nanobodies. B: Nanobody conjugates.

1.2 纳米抗体的特性

Nbs 的分子量仅为传统抗体的 10%，具有穿透致密组织的能力，并且能够深入渗透肿瘤以及穿过血脑屏障，在成药性上具有独特的潜力^[17-18]。与传统抗体的 VH 相比，Nbs 中的 CDR3 环向外延伸，能高亲和力地与离子通道或病毒糖蛋白的保守表位结合^[19]。Nbs 中互补决定区 1 (complementarity-determining region 1, CDR1) 和互补决定区 2 (complementarity-determining region 2, CDR2) 中含有较多的疏水氨基酸，骨架区域的残基也参与抗原结合。此外，Nbs 体积小，可以通过肾小球的滤过作用从体内快速清除^[20]。同时，Nbs 内部存在环间二硫键，这些额外的二硫键使其在恶劣环境中仍然可以维持构象的稳定，比常规抗体更耐高温^[21]、酸碱和有机溶剂^[22]，便于储存、运输和极端条件下的使用。Nbs 相较于传统抗体而言，4 个疏水性氨基酸被亲水性氨基酸所取代，溶解性和稳定性更高^[23]。

1.3 纳米抗体库的分类

纳米抗体文库可分为 3 类，即天然纳米抗体库、免疫纳米抗体库以及合成纳米抗体库，纳米抗体文库的构建对于产生不同亲和力的 Nbs 具有十分重要的作用。

1.3.1 天然纳米抗体库

某些弱免疫原性或非免疫原性的抗原不能刺激机体产生 HCAb，可以用未经免疫的骆驼科动物或者鲨鱼的外周血淋巴细胞来构建天然纳米抗体库。天然纳米抗体库的多样性随着收集的淋巴细胞种类和数量的增加而增加，因此，从不同动物中收集大量的血液样本是保证天然纳米抗体库多样性的先决条件^[24]。为了能够筛选到高亲和力的 Nbs，必须收集足量的动物血液，使天然纳米抗体库的大小达到 10^9 - 10^{11} 左右，在这个天然纳米抗体库中 80% 左右的序列能够编码具有功能的 Nbs^[25]。天然纳米抗体库

需要进行体外亲和力成熟才能获得更高亲和力的 Nbs。

1.3.2 免疫纳米抗体库

相较于天然纳米抗体库，免疫骆驼科动物刺激体细胞成熟将使抗体文库对目标抗原具有更高的特异性和更高的亲和力^[26]。免疫纳米抗体库可以通过免疫接种产生 HCAb 的单峰骆驼、骆驼以及转基因小鼠等动物获得^[27]，是 Nbs 筛选中最常见的策略。免疫纳米抗体文库的制备需要将某一特定抗原多次免疫骆驼科动物或鲨鱼，在其体内产生 HCAb 或 IgNAR 并进行体内亲和力成熟，接着从动物外周血淋巴细胞中获得 VHH 片段，并通过噬菌体展示技术、细胞表面展示技术以及高通量测序等技术筛选出具有高亲和力的 Nbs^[28]。从免疫文库中获得的 Nbs 水平通常低至 nmol 甚至 pmol 水平，库容量相较于另外 2 个库更小，仅有 10^6 - 10^8 ^[29]。除了对骆驼科动物进行免疫外，研究人员还发现了一种能够分离出 HCAb 的转基因小鼠^[30]，同时一种名为“UniRat”的全人源抗体转基因大鼠技术平台也已经被报道用于开发人源 HCAb 或单域抗体^[31]。在难以免疫骆驼科动物的情况下，转基因小鼠是其良好的替代品。此外，骆驼科动物可能存在个体之间免疫力的自然差异，使得免疫纳米抗体库的建立进一步复杂化。

1.3.3 合成纳米抗体库

相较于免疫纳米抗体库，合成纳米抗体库缺乏体细胞成熟的过程，但可以弥补抗原种类受限的缺点。合成纳米抗体库中 Nbs 的多样性主要体现在 CDR3 区，可以通过对 CDR3 进行特定的突变与改造来识别不同的抗原^[32]。因此，可以基于天然存在的 VHH 序列，通过 CDR3 长度和序列的随机突变来构建合成纳米抗体库^[33]。目前已经设计使用了一种合成纳米抗体库支架 cAbBCII10，其框架区序列具有稳定、表达良好

以及高度通用性的特点, 与其他需要保守的二硫键才能正确折叠的 Nbs 不同, cAbBCII10 即使没有保守的二硫键也可以正确折叠, 并且该支架的人源化也能最大限度地降低其免疫原性^[34]。合成纳米抗体库容量在 10^8 – 10^9 左右, 而且与天然纳米抗体库和免疫纳米抗体库相比具有更好的 CDR3 多样性, 且无需对动物进行免疫或收集大量血液样本^[35]。

2 纳米抗体的筛选与亲和力成熟

高效的筛选方法以及亲和成熟策略在开发具有高亲和力 Nbs 中起着关键作用。本文对 Nbs 的筛选以及亲和成熟过程中采用的策略进行了总结。

2.1 纳米抗体的筛选

2.1.1 噬菌体展示

噬菌体展示是将肽或蛋白质与噬菌体外壳蛋白融合表达并展示在病毒粒子表面的一种技术^[36]。该技术最早在 1985 年提出, 通过将短肽链与丝状噬菌体 pIII 蛋白的编码基因进行融合从而实现了短肽链在噬菌体上的展示^[37], 随后研究人员利用该技术筛选得到了第 1 个 Nbs^[6]。该技术是从免疫动物的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中提取总 mRNA, 反转录为 cDNA, 使用套式 PCR 对 VHH 片段进行扩增; 将 VHH 片段插入噬菌体外壳, 再转化至大肠杆菌中使其表达并展示在噬菌体表面, 随后经过 3–5 轮生物淘洗从噬菌体展示文库中富集得到具有高亲和力的 Nbs; 其中丝状噬菌体(Ff 噬菌体)作为噬菌体展示的主要工具和载体, 主要分为 f1、fd 和 M13, 它们能够分泌到环境中但不会杀死宿主, 并且对极端 pH、高温以及存在蛋白水解酶等恶劣环境具有一定的抵抗力^[38]。噬菌体展示技术的库容量和多样性虽然受到限制, 但相较于其他展

示技术而言操作简便、成本低且适应恶劣环境的能力较强, 使得通过噬菌体展示筛选 Nbs 的应用较为广泛^[39-40]。

2.1.2 细菌展示

细菌展示是一种用于革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌细胞表面呈现异源蛋白的常用技术^[41]。2013 年在革兰氏阳性细菌表面首次成功展示了 Nbs^[42]。而在革兰氏阴性菌中, 大肠杆菌因其遗传特点和高转化效率而被广泛使用^[43], 但是大肠杆菌的外膜结构在一定程度上阻碍了细菌展示技术的应用, 有研究表明, 自主转运蛋白(autotransporters, ATs)家族分泌的蛋白不需要任何人工处理即可通过内膜, 在细菌展示技术中应用广泛^[44]。常见的细菌表面展示技术是通过基因工程原理将 VHH 片段插入 ATs 的 β 结构域产生融合蛋白, ATs 的 N 端信号肽(signal peptide, SP)引导多肽链依赖于 Sec 易位子(sec translocon)在内膜上的易位, 之后信号肽被信号肽酶切割, 融合蛋白被释放到周质中, ATs 的 C 端 β 结构域插入外膜, β 结构域促进了 ATs 中位于信号肽和 β 结构域之间的乘客结构域的外膜易位, 从而使 Nbs 展示于细菌细胞表面^[45]。细菌表面展示技术在去除重金属和有害化学物质的全细胞生物催化剂、生物传感器以及开发活菌疫苗递送系统等方面广泛应用^[46-47]。

2.1.3 酵母表面展示

随着生物技术的发展, 更具优势的酵母表面展示(yeast surface display, YSD)成为了近年来应用最为广泛的真核蛋白表达系统^[48]。酵母细胞是最适合细胞表面展示的宿主细胞之一, 主要包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) H、毕赤酵母(*Pichia pastoris*) R^[49]和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*) D^[50]等, 其中酿酒酵母展示系统发展较完善。酵母细胞壁由内层的葡萄糖骨架以及外层的甘露糖蛋白构成, 其中甘露

糖蛋白中存在一类含有锚定区域的 α 凝集素, α 凝集素由核心亚基 Aga1p 和小结合亚基 Aga2p 组成, 将融合有 VHH 片段的外源蛋白引入酵母细胞。由于融合后的蛋白含有锚定酵母细胞壁的结构, 诱导表达后, 通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定在酵母细胞壁中^[51], 与小结合亚基 Aga2p 的 N 末端或 C 末端进行融合, 融合后 Aga2p 亚基通过 2 个二硫键与 Aga1p 亚基结合, 由信号肽引导融合蛋白向细胞外分泌, 从而将 Nbs 固定在酵母细胞表面^[52]。酵母表面展示技术能够促进外源真核蛋白的翻译后加工, 即外源真核蛋白的折叠和糖基化^[53], 同时酵母表面展示技术与流式细胞荧光分选技术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 相结合可以筛选出高亲和力和高稳定性的 Nbs^[54]。

2.1.4 mRNA 展示

mRNA 展示平台已被证明是肽设计、蛋白质工程和蛋白质相互作用研究的有力工具^[55]。

mRNA 展示的关键物质是抗菌的天然产物嘌呤霉素, 它类似于氨酰 tRNA 的 3' 末端, 可以进入核糖体 A 位点终止翻译, 从而抑制蛋白质的合成^[56]。该技术首先需要 DNA 文库, 该文库具有 T7 RNA 聚合酶、启动子、5'UTR、3'UTR 以及亲和纯化标签等; 在 T7 RNA 聚合酶的作用下将 DNA 文库中的 DNA 转录为 mRNA, 生成的 mRNA 3' 末端连接嘌呤霉素, 嘌呤霉素进入核糖体 A 位点并与翻译的蛋白质多肽链的羧基末端共价偶联, 形成 mRNA-蛋白质复合物, 然后将该复合物纯化并反转录形成 mRNA-cDNA-蛋白质复合物, 通过酶联免疫吸附试验或磁珠法等体外选择过程, 筛选出与靶标蛋白特异性结合的 mRNA-cDNA-蛋白质复合物, 最后分离出 cDNA 链并进行 PCR 扩增; 从 mRNA 转录、翻译、纯化筛选、反转录以及体外筛选, 最后到 PCR 扩增, 这一过程被称为 1 轮筛选富集; 一般需要 5-7 轮筛选富集才能获得足够高亲和力的 Nbs^[57](图 3)。mRNA 展示完

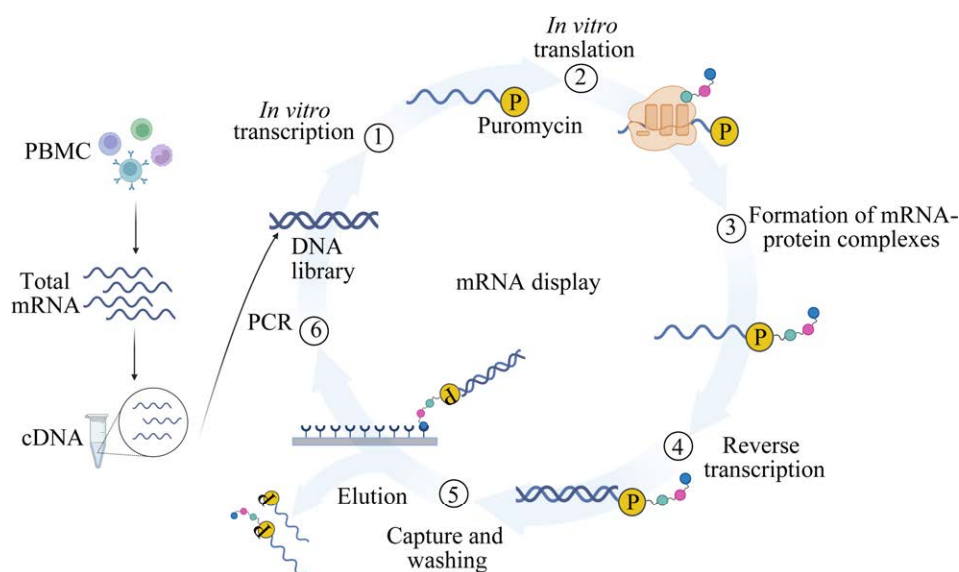


图 3 mRNA 展示技术流程

Figure 3 Flowchart of mRNA display technology.

全在体外进行, 因此序列数量不受转化步骤的限制; 同时形成的 mRNA-蛋白质复合物无核糖体的存在, 筛选效率较高。但是由于无细胞参与, 缺乏蛋白质翻译后的加工与修饰, 需要进一步研究来完善 mRNA 展示的缺陷^[58](表 1)。目前 mRNA 展示技术应用最广泛的体外翻译系统是重组的大肠杆菌 PURE 系统(protein synthesis using recombinant elements, PURE), 该系统主要由翻译因子、大肠杆菌(*Escherichia coli*)的核糖体与 tRNA、氨基酸等缓冲体系组成^[59], 可以更严格地控制蛋白质表达条件。

2.2 纳米抗体的亲和力成熟

2.2.1 亲和力成熟

在免疫应答过程中, B 淋巴细胞初次接触抗原时产生的抗体对抗原的亲和力较低, 但随着突变的发生, 抗体的亲和力逐渐升高, 这一过程被称为亲和力成熟^[60]。筛选具有更高亲和力的 Nbs 可能需要多轮突变和生物淘洗, 以及大量克隆的分离与表征。以上展示技术在提高亲和力方面仍有很大的局限性^[61], 因此, 开发更多亲和力成熟的策略至关重要。

2.2.2 纳米抗体亲和力成熟策略

在体内免疫反应过程中, 为了增强免疫球

蛋白识别和结合外来抗原的能力, 抗体 H 链在经历 V-D-J 基因片段重组后, 幼稚 B 细胞通过在生发中心进行类别转换重组(class switch recombination, CSR)并在 CDR 中经历体细胞超突变(somatic hypermutation, SHM)来实现体内亲和力成熟^[62-63]。Nbs 的特性以及易于基因改造的特点使其更适用于体外亲和力成熟策略^[64]。目前有许多抗体体外亲和力成熟策略已经被报道, 包括易错 PCR、DNA 改组、链置换、紫外线或化学突变等^[65]。对传统抗体与 VHH 进行的结构分析表明, VHH 的 CDR 相较于传统抗体表现出更多的结构多样性^[66]。CDR-H3 环在抗原识别中起着关键作用, 因此对 Nbs 的 CDR 进行突变或改造是体外亲和力成熟的最主要方式, 可以通过将特异性 CDR 嫁接到骆驼科动物的 VHH 可变结构域的 CDR 中, 来增强 Nbs 的结合亲和力^[67]; 或基于合成纳米抗体库支架 cAbBCII10 来构建合成噬菌体文库并在 VHH 的 CDR3 中引入随机序列^[68]; 或者通过丙氨酸扫描模拟 Nbs 的位点进行定点饱和突变等策略来筛选得到更高亲和力的 Nbs^[69]。同时也可以利用计算机模拟构建饱和诱变 Nbs 库, 对 CDR 进行饱和诱变后, 筛选得到具有更高亲和力和广谱活性的 Nbs^[70-72]。

表 1 Nbs 展示技术的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of nanobody display technologies

Nanobody display technology	Advantages	Disadvantages	References
Phage display	Simple operation, endurance capability for severe environment	The capacity and diversity of phage display libraries are limited	[39-40]
Bacteria display	High transformation efficiency, gram positive bacteria have a comparative higher tolerance to mechanical stress due to a thicker cell wall	The presence of the outer membrane has hindered the development of effective display technologies in <i>Escherichia coli</i>	[43-44]
Yeast display	Efficient posttranslational modification machinery, without the need for soluble protein expression and purification steps	Small storage capacity and low transformation efficiency	[53]
mRNA display	Large storage capacity, high screening efficiency, not limited by the transformation efficiency	No cell involvement, lack of protein posttranslational processing and modification	[58]

3 纳米抗体的应用

3.1 在诊断中的应用

Nbs 因其独特的生物学特性,在体外和体内诊断方面发挥着重要作用。在体外诊断领域,Nbs 已被成功应用于多种基于酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)的检测方法,如戊型肝炎病毒、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)、犬弓形虫以及大肠杆菌等病原体的检测^[73-76]。其中 Nbs 对有机溶剂具有一定的耐受性,通过 ELISA 方法来监测有机农药的含量效率高且成本相对较低,对我国食品安全防控具有重要意义^[77]。然而,与电化学生物传感器的实时监测以及便于携带等特点相比,ELISA 方法通常需要较长的孵育时间,为了提高检测效率,目前已经开发了多种基于 Nbs 的电化学生物传感器,例如检测唾液中幽门螺杆菌的免疫传感器^[78];基于 Nbs 与有机电化学晶体管(organic electrochemical transistor, OECT)联合使用的有机电化学生物传感器,在新型冠状病毒和中东呼吸综合征病毒的检测中具有更高的灵敏性和特异性^[79];并且最新研究发现检测新型冠状病毒 S 蛋白的无标记电化学免疫传感器,其检测限低于传统电化学传感器^[80]。在实际应用中,ELISA 方法和电化学生物传感器的选择还要取决于检测目标、灵敏度要求、操作便利性以及成本等因素。在体内诊断试验中,Nbs 由于缺少与体内免疫细胞上 Fc 受体非特异性结合的 Fc 结构域,不会引起 Fc 介导的细胞毒性作用,因此有望在体内成像技术中广泛应用。同时 Nbs 具有的高稳定性、低免疫原性和易于标记的特性使其成为理想的示踪剂之一,例如靶向神经元突触中的突触结合蛋白 1 (synaptotagmin-1, Syt-1)或其他疾

病诊断标志物的 Nbs 与荧光蛋白偶联可用于活体体内成像,为疾病诊断提供新的途径^[81-82];此外,Nbs 与放射性核素偶联可以用于单光子发射计算机断层显像(single photon emission computed tomography, SPECT)、正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography, PET)、计算机断层显像(computed tomography, CT)等成像技术,实现可视化诊断,尽管放射性核素偶联会影响 Nbs 的抗原结合活性,但通过与碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或荧光蛋白等标签蛋白结合,可以进一步提高其在活细胞中结合抗原的能力^[83]。

3.2 在疾病治疗中的应用

近年来,Nbs 在肿瘤治疗、自身免疫病以及病毒性疾病中得到广泛应用^[84]。Nbs 因具有肿瘤渗透和识别独特抗原的能力,在肿瘤治疗领域中发挥着重要作用。血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)是肿瘤治疗的一个重要靶点,将 VEGFR2 特异性的 Nbs 与截短形式的假单胞菌外毒素 A 融合后可抑制癌细胞的增殖^[85]。此外,基于 Nbs 的偶联物易于制备且具有强大的抗肿瘤活性,使 Nbs 成为肿瘤治疗中有前途的载体,例如 Nbs 与药物偶联可以增强对肿瘤组织的主动靶向性,提高药物递送途径的特异性 and 高效性,减少对正常细胞的损伤^[86];与放射性同位素以及靶蛋白进行偶联,可以靶向放射性核素治疗,达到抗肿瘤的作用^[87];或与微气泡偶联作为新型分子示踪剂可以靶向肿瘤的治疗^[88]。除了直接作为治疗性载体外,Nbs 也可作为免疫检查点抑制剂发挥抗肿瘤作用,抑制免疫检查点是肿瘤免疫治疗中最有效的方法之一,通过将 Nbs 与细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4)等免疫检查点分子进行结合可以有效提高抗肿瘤免

疫应答^[89]。

目前, Nbs 在治疗自身免疫性疾病方面也发挥着重要作用。自身免疫性疾病的发生与细胞因子有着密切的联系, 针对自身免疫性疾病的新治疗药物主要靶向白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白介素 17 (interleukin-17, IL-17)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等细胞因子^[90]。Nbs 药物的开发为这些疾病的治疗提供了新的途径。全球首个获批的 Nbs 治疗药物卡普赛珠单抗(Caplacizumab)是一种靶向血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF) A1 结构域的双价纳米抗体药物, 通过减少血小板聚集和微血管血栓的形成, 用于治疗血栓性血小板减少性紫癜^[91]。此后不久其他 Nbs 药物也投入临床应用中, 例如靶向 2 个 TNF- α 和 1 个抗人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的三价双特异性 Nbs 药物奥利组单抗(Ozorlizumab)能够特异性地结合并中和 TNF- α , 从而抑制其生物活性, 可以用于治疗类风湿关节炎^[92]; 沃巴利珠单抗(Vobarilizumab)则是一种靶向 IL-6 和抗白蛋白结构域的双特异性 Nbs 药物, 能够治疗类风湿关节炎以及系统性红斑狼疮^[93], 目前还有多种 Nbs 药物进入临床研究阶段。尽管 Nbs 在自身免疫性疾病治疗中取得了显著的进展, 但在病毒性疾病治疗领域的应用相对较少。目前已经报道了靶向呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)融合蛋白的三价纳米抗体药物 ALX-0171, 主要起到抗病毒感染的作用^[94]。Nbs 在病毒性疾病的治疗中具有良好的效果, 但是 Nbs 的半衰期短限制了其在治疗领域中的应用, 可以通过构建多价 Nbs 或偶联白蛋白等大分子物质来延长其半衰期^[95]。随着 Nbs 药物研发技术的不断进步和创新, 将为更多疾病的治疗提供新的策略和方法。

4 总结与展望

Nbs 来源于骆驼科动物血清中分离的 HCAb, 是一种天然存在的最小抗原结合片段。相较于单克隆抗体, Nbs 具有更小的分子结构、良好的组织渗透性、高亲和力以及高溶解性等特性, 使其在靶向药物递送、分子成像以及疾病诊断等领域中具有极高的应用价值^[96]。抗原特异性 Nbs 的鉴定高度依赖于 Nbs 文库的构建, 目前应用最广泛的仍然是通过动物免疫建立的免疫纳米抗体库, 但这种方法需要针对不同的抗原建立不同的免疫文库; 同时天然纳米抗体库缺乏体细胞成熟过程; 而合成纳米抗体库避免了动物免疫以及血液样本的采集, 并对 CDR 进行突变与改造, 通过分子克隆的方式便可以获得高亲和力的 Nbs^[97], 这种方法为 Nbs 的建库提供了新的途径。随着生物技术的快速发展, 特异性 Nbs 的筛选技术逐渐得到完善, 将筛选技术与高通量测序以及细胞分选技术相结合, 极大地提高了筛选高亲和力 Nbs 的效率, 也为临床诊断与治疗开辟了新的可能性。

Nbs 的特性使其在疾病治疗、研究以及诊断中具有独特的潜力, 但是在实际应用中还需要考虑更多的因素。随着对靶向治疗需求的增加, 尤其是在某些难以用传统抗体治疗的疾病领域, Nbs 因其体积小、渗透性强、血液清除快等特性, 可以通过静脉注射、药物偶联或放射性核素偶联从而深入细胞内部或组织间隙, 然而 Nbs 的半衰期较短, 需要更多的剂量来达到更好的治疗效果, 通过将 Nbs 与白蛋白等大分子物质偶联从而延长其在血液循环中的半衰期是一个值得深入探索的方向; 双特异性纳米抗体能够同时识别 2 种不同的抗原或者表位, 相较于 Nbs 具有更强的亲和力、特异性和靶向性, 也延长了其在体内的作用时间, 在抗体工

程研究领域以及肿瘤治疗领域具有非常广阔的前景。Nbs 也可在多个研究领域中发挥重要作用, 将 Nbs 与磁珠、琼脂糖凝胶等介质偶联来提高蛋白质与蛋白质间相互作用的灵敏度; 研究 Nbs 与同源抗原之间的相互作用来解析蛋白质的晶体结构; 利用 Nbs 不断开发出各种诱导型降解子来研究蛋白质的靶向降解等。在诊断方面, 增加免疫学检测的灵敏度与特异性是体外诊断方法建立的关键指标。Nbs 可以与药物、其他抗体和检测标签等分子结合, 形成多功能的捕获和检测平台, 有望在快速检测、特异性以及成本效益等方面展现出独特优势, 特别是在传染病检测和早期癌症诊断中扮演关键角色。Nbs 的更多应用途径还有待探索, 但作为一种新兴的抗体, Nbs 因其独特的生物学特性和应用潜力, 也已成为兽医领域的研究热点, 有望为动物疫病的治疗和诊断提供新的解决方案。

REFERENCES

- [1] DAMELANG T, BRINKHAUS M, van OSCH TLJ, SCHUURMAN J, LABRIJN AF, RISPENS T, VIDARSSON G. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 14: 1304365.
- [2] MUÑOZ-LÓPEZ P, RIBAS-APARICIO RM, BECERRA-BÁEZ EI, FRAGA-PÉREZ K, FLORES-MARTÍNEZ LF, MATEOS-CHÁVEZ AA, LURIA-PÉREZ R. Single-chain fragment variable: recent progress in cancer diagnosis and therapy[J]. *Cancers*, 2022, 14(17): 4206.
- [3] LOU HT, CAO XT. Antibody variable region engineering for improving cancer immunotherapy[J]. *Cancer Communications*, 2022, 42(9): 804-827.
- [4] MUYLDERMANS S. Applications of nanobodies[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2021, 9: 401-421.
- [5] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, ROBINSON G, HAMERS C, SONGA EB, BENDAHMAN N, HAMERS R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [6] ARBABI GHARROUDI M, DESMYTER A, WYNS L, HAMERS R, MUYLDERMANS S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies[J]. *FEBS Letters*, 1997, 414(3): 521-526.
- [7] TANG HP, GAO Y, HAN JY. Application progress of the single domain antibody in medicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4176.
- [8] 刘星, 陈奇. 鲨源单域抗体的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1069-1082.
LIU X, CHEN Q. Progress in shark single-domain antibody[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1069-1082 (in Chinese).
- [9] CONROY PJ, LAW RHP, CARADOC-DAVIES TT, WHISSTOCK JC. Antibodies: from novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets[J]. *Methods*, 2017, 116: 12-22.
- [10] KHODABAKHSH F, BEHDANI M, RAMI A, KAZEMI-LOMEDASHT F. Single-domain antibodies or nanobodies: a class of next-generation antibodies[J]. *International Reviews of Immunology*, 2018, 37(6): 316-322.
- [11] CHEONG WS, LEOW CY, ABDUL MAJEED AB, LEOW CH. Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 369-375.
- [12] ESKIER NE, ESKIER D, FIRUZAN E, UZUNLAR SK. Physicochemical differences between camelid single-domain antibodies and mammalian antibodies[J]. *Turkish Journal of Biology*, 2023, 47(6): 423-436.
- [13] BANNAS P, HAMBACH J, KOCH-NOLTE F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1603.
- [14] WANG JW, KANG GB, YUAN HB, CAO XC, HUANG H, de MARCO A. Research progress and applications of multivalent, multispecific and modified nanobodies for disease treatment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 12: 838082.
- [15] CAWEZ F, MERCURI PS, MORALES-YÁÑEZ FJ, MAALOUF R, VANDEVENNE M, KERFF F, GUÉRIN V, MAINIL J, THIRY D, SAULMONT M, VANDERPLASSCHEN A, LAFAYE P, AYMÉ G, BOGAERTS P, DUMOULIN M, GALLEN M.

- Development of nanobodies as theranostic agents against CMY-2-like class C β -lactamases[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2023, 67(4): e0149922.
- [16] WANG YL, SUN YF, SHEN ZL, WANG C, QIAN J, MAO QY, WANG YJ, SONG WP, KONG Y, ZHAN CY, CHEN ZG, DIMITROV DS, YANG ZL, JIANG SB, WU F, LU L, YING TL, SUN L, WU YL. Fully human single-domain antibody targeting a highly conserved cryptic epitope on the Nipah virus G protein[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 6892.
- [17] HOSSEINDOKHT M, BAKHERAD H, ZARE H. Nanobodies: a tool to open new horizons in diagnosis and treatment of prostate cancer[J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21(1): 580.
- [18] RUIZ-LÓPEZ E, SCHUHMACHER AJ. Transportation of single-domain antibodies through the blood-brain barrier[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1131.
- [19] ASAADI Y, JOUNEGHANI FF, JANANI S, RAHBARIZADEH F. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments[J]. *Biomarker Research*, 2021, 9(1): 87.
- [20] SONG WY, WEI WJ, LAN XL, CAI WB. Albumin binding improves nanobody pharmacokinetics for dual-modality PET/NIRF imaging of CEACAM5 in colorectal cancer models[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2023, 50(9): 2591-2594.
- [21] KUNZ P, ORTALE A, MÜCKE N, ZINNER K, HOHEISEL JD. Nanobody stability engineering by employing the ΔT_m shift; a comparison with apparent rate constants of heat-induced aggregation[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2019, 32(5): 241-249.
- [22] JOVČEVSKA I, MUYLDERMANS S. The therapeutic potential of nanobodies[J]. *BioDrugs*, 2020, 34(1): 11-26.
- [23] 何晓婷, 董洁娴, 沈兴, 王弘, 沈玉栋, 徐振林. 纳米抗体的稳定性及其结构基础研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(6): 1004-1017.
HE XT, DONG JX, SHEN X, WANG H, SHEN YD, XU ZL. Advances on the relationship between stability and structure of nanobody[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2022, 49(6): 1004-1017 (in Chinese).
- [24] YAN JR, WANG PY, ZHU M, LI GH, ROMÃO E, XIONG S, WAN YK. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, 13: 33.
- [25] MUYLDERMANS S. A guide to: generation and design of nanobodies[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(7): 2084-2102.
- [26] ROSSOTTI MA, TREMPÉ F, van FAASSEN H, HUSSACK G, ARBABI-GHAHROUDI M. Isolation and characterization of single-domain antibodies from immune phage display libraries[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2702: 107-147.
- [27] XU JL, XU K, JUNG S, CONTE A, LIEBERMAN J, MUECKSCH F, LORENZI JCC, PARK S, SCHMIDT F, WANG ZJ, HUANG YX, LUO Y, NAIR MS, WANG PF, SCHULZ JE, TESSAROLLO L, BYLUND T, CHUANG GY, OLIA AS, STEPHENS T, et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 278-282.
- [28] QIU JX, LI J, ZHANG Z, DONG SR, LING XM, FANG ZX, LING QS, HUANG ZX. Construction of an alpaca immune antibody library for the selection of nanobodies against *Drosophila melanogaster* proteins[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1207048.
- [29] ROMÃO E, POIGNAVENT V, VINCKE C, RITZENTHALER C, MUYLDERMANS S, MONSIEU B. Construction of high-quality camel immune antibody libraries[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1701: 169-187.
- [30] TENG YM, YOUNG JL, EDWARDS B, HAYES P, THOMPSON L, JOHNSTON C, EDWARDS C, SANDERS Y, WRITER M, PINTO D, ZHANG YJ, ROODE M, CHOVANEC P, MATHESON L, CORCORAN AE, FERNANDEZ A, MONTOLIU L, ROSSI B, TOSATO V, GJURACIC K, et al. Diverse human VH antibody fragments with bio-therapeutic properties from the Crescendo Mouse[J]. *New Biotechnology*, 2020, 55: 65-76.
- [31] CLARKE SC, MA B, TRINKLEIN ND, SCHELLENBERGER U, OSBORN MJ, OUISSE LH, BOUDREAU A, DAVISON LM, HARRIS KE, UGAMRAJ HS, BALASUBRAMANI A, DANG KH, JORGENSEN B, OGANA HAN, PHAM DT, PRATAP PP, SANKARAN P, ANEGON I, van SCHOOTEN WC, BRÜGGEMANN M, et al. Multispecific antibody development platform based on human heavy chain antibodies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 9: 3037.

- [32] CONTRERAS MA, SERRANO-RIVERO Y, GONZÁLEZ-POSE A, SALAZAR-URIBE J, RUBIO-CARRASQUILLA M, SOARES-ALVES M, PARRA NC, CAMACHO-CASANOVA F, SÁNCHEZ-RAMOS O, MORENO E. Design and construction of a synthetic nanobody library: testing its potential with a single selection round strategy[J]. *Molecules*, 2023, 28(9): 3708.
- [33] LIU BY, YANG DW. Easily established and multifunctional synthetic nanobody libraries as research tools[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1482.
- [34] MORENO E, VALDÉS-TRESANCO MS, MOLINA-ZAPATA A, SÁNCHEZ-RAMOS O. Structure-based design and construction of a synthetic phage display nanobody library[J]. *BMC Research Notes*, 2022, 15(1): 124.
- [35] ZIMMERMANN I, EGLOFF P, HUTTER CAJ, KUHN BT, BRÄUER P, NEWSTEAD S, DAWSON RJP, GEERTSMA ER, SEEGER MA. Generation of synthetic nanobodies against delicate proteins[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(5): 1707-1741.
- [36] 刘碧霞, 刘媛, 谢静, 郭郑斌, 王斌, 左钱飞, 张睿. 噬菌体展示技术在全人源性抗体发现中的应用[J]. *免疫学杂志*, 2023, 39(10): 910-915.
LIU BX, LIU Y, XIE J, GUO ZB, WANG B, ZUO QF, ZHANG R. Progresses of phage display technology application in fully human antibody discovery[J]. *Immunological Journal*, 2023, 39(10): 910-915 (in Chinese).
- [37] SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [38] RAKONJAC J, GOLD VAM, LEÓN-QUEZADA RI, DAVENPORT CH. Structure, biology, and applications of filamentous bacteriophages[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2024(8): pdb.over107754.
- [39] LU JC, DING JN, LIU ZX, CHEN TT. Retrospective analysis of the preparation and application of immunotherapy in cancer treatment (Review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2022, 60(2): 12.
- [40] LEDSGAARD L, LJUNGARS A, RIMBAULT C, SØRENSEN CV, TULIKA T, WADE J, WOUTERS Y, McCAFFERTY J, LAUSTSEN AH. Advances in antibody phage display technology[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(8): 2151-2169.
- [41] 蔡锷, 储引娣, 黄丕英, 韦良婉, 范恩国. 基于蛋白质跨外膜自转运系统的细菌细胞表面蛋白展示技术研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(2): 458-475.
- CAI K, CHU YD, HUANG PY, WEI LW, FAN EG. Trend of bacterial cell surface display: the autodisplay technology[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 458-475 (in Chinese).
- [42] FLEETWOOD F, DEVOOGDT N, PELLIS M, WERNERY U, MUYLDERMANS S, STÄHL S, LÖFBLOM J. Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(6): 1081-1093.
- [43] MIN P. Surface display technology for biosensor applications: a review[J]. *Sensors*, 2020, 20(10): 2775.
- [44] MAHDAVI SZB, OROOJALIAN F, EYVAZI S, HEJAZI M, BARADARAN B, POULADI N, TOHIDKIA MR, MOKHTARZADEH A, MUYLDERMANS S. An overview on display systems (phage, bacterial, and yeast display) for production of anticancer antibodies; advantages and disadvantages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208: 421-442.
- [45] BERIOTTO I, ICKE C, SEVASTSYANOVICH YR, ROSSITER AE, ROMAGNOLI G, SAVINO S, HODGES FJ, COLE JA, SAUL A, MacLENNAN CA, CUNNINGHAM AF, MICOLI F, HENDERSON IR. Efficient autotransporter-mediated extracellular secretion of a heterologous recombinant protein by *Escherichia coli*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e0359422.
- [46] NAKATANI H, HORI K. Cell surface protein engineering for high-performance whole-cell catalysts[J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2017, 11(1): 46-57.
- [47] SAGGESE A, BACCIGALUPI L, DONADIO G, RICCA E, ISTICATO R. The bacterial spore as a mucosal vaccine delivery system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13): 10880.
- [48] BAN B, BLAKE RC 2nd, BLAKE DA. Yeast surface display platform for rapid selection of an antibody library *via* sequential counter antigen flow cytometry[J]. *Antibodies*, 2022, 11(4): 61.
- [49] DONG C, QIAO J, WANG XP, SUN WL, CHEN LX, LI ST, WU K, MA LX, LIU Y. Engineering *Pichia pastoris* with surface-display minicellulosomes for carboxymethyl cellulose hydrolysis and ethanol production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 108.
- [50] WANG HY, WANG ZZ, LIU GL, CHENG XH, CHI

- ZM, MADZAK C, LIU CG, CHI Z. Genetical surface display of silicatein on *Yarrowia lipolytica* confers living and renewable biosilica-yeast hybrid materials[J]. ACS Omega, 2020, 5(13): 7555-7566.
- [51] MÜLLER GA. Membrane insertion and intercellular transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: potential therapeutic applications[J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2020, 126(2): 139-156.
- [52] LI YB, WANG X, ZHOU NY, DING JM. Yeast surface display technology: mechanisms, applications, and perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2024, 76: 108422.
- [53] LIU Z, HO SH, HASUNUMA T, CHANG JS, REN NQ, KONDO A. Recent advances in yeast cell-surface display technologies for waste biorefineries[J]. Bioresource Technology, 2016, 215: 324-333.
- [54] ZHANG CM, CHEN HY, ZHU YP, ZHANG Y, LI X, WANG F. *Saccharomyces cerevisiae* cell surface display technology: strategies for improvement and applications[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1056804.
- [55] 周永飞, 杨敬鹏, 常军亮, 曹玉锋. 人源化单克隆抗体的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(9): 1114-1119.
- ZHOU YF, YANG JP, CHANG JL, CAO YF. Progress in research on humanized monoclonal antibody[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(9): 1114-1119 (in Chinese).
- [56] AVINER R. The science of puromycin: from studies of ribosome function to applications in biotechnology[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 1074-1083.
- [57] KAMALINIA G, GRINDEL BJ, TAKAHASHI TT, MILLWARD SW, ROBERTS RW. Directing evolution of novel ligands by mRNA display[J]. Chemical Society Reviews, 2021, 50(16): 9055-9103.
- [58] NEWTON MS, CABEZAS-PERUSSE Y, TONG CL, SEELIG B. *In vitro* selection of peptides and proteins-advantages of mRNA display[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(2): 181-190.
- [59] GANESH RB, MAERKL SJ. Towards self-regeneration: exploring the limits of protein synthesis in the protein synthesis using recombinant elements (PURE) cell-free transcription-translation system[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(8): 2555-2566.
- [60] 赵东平. 亲和力成熟技术在天然蛋白及合成纳米抗体中的应用[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文, 2022.
- ZHAO DP. Application of affinity maturation technology in natural protein and synthesis of nano-antibody[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University, 2022 (in Chinese).
- [61] PELTOMAA R, BENITO-PEÑA E, BARDERAS R, MORENO-BONDI MC. Phage display in the quest for new selective recognition elements for biosensors[J]. ACS Omega, 2019, 4(7): 11569-11580.
- [62] LIU JC, ZHANG K, ZHANG X, GUAN F, ZENG H, KUBO M, LEE P, CANDOTTI F, JAMES LK, CAMARA NOS, BENLAGHA K, LEI JH, FORSMAN H, YANG L, XIAO W, LIU Z, LIU CH. Immunoglobulin class-switch recombination: mechanism, regulation, and related diseases[J]. MedComm, 2024, 5(8): e662.
- [63] CHI XY, LI Y, QIU XY. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation[J]. Immunology, 2020, 160(3): 233-247.
- [64] HOEY RJ, EOM H, HORN JR. Structure and development of single domain antibodies as modules for therapeutics and diagnostics[J]. Experimental Biology and Medicine, 2019, 244(17): 1568-1576.
- [65] 程鑫. 抗 CD47 特异性纳米抗体的体外亲和力成熟[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2019.
- CHENG X. Affinity maturation of anti-CD47 specific nano-antibody *in vitro*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2019 (in Chinese).
- [66] MITCHELL LS, COLWELL LJ. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data[J]. Proteins, 2018, 86(7): 697-706.
- [67] HEIDARI MM, SHIRAZI EA, CHERAGHI SF, SHAHSHAHANI R, RAHNAMA T, KHATAMI M. CDR grafting and site-directed mutagenesis approach for the generation and affinity maturation of anti-CD20 nanobody[J]. Molecular Biology Reports, 2024, 51(1): 751.
- [68] YAN JR, LI GH, HU YH, OU WJ, WAN YK. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications[J]. Journal of Translational Medicine, 2014, 12: 343.
- [69] WANG XR, CHEN Q, SUN ZC, WANG YD, SU BC, ZHANG CH, CAO HM, LIU X. Nanobody affinity improvement: directed evolution of the anti-ochratoxin A single domain antibody[J]. International Journal of

- Biological Macromolecules, 2020, 151: 312-321.
- [70] EL SALAMOUNI NS, CATER JH, SPENKELINK LM, YU HB. Nanobody engineering: computational modelling and design for biomedical and therapeutic applications[J]. FEBS Open Bio, 2024.
- [71] VERKHIVKER G. Structural and computational studies of the SARS-CoV-2 spike protein binding mechanisms with nanobodies: from structure and dynamics to avidity-driven nanobody engineering[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(6): 2928.
- [72] DONG S, GAO MJ, BO ZY, GUAN LJ, HU XD, ZHANG H, LIU BB, LI P, HE KL, LIU XJ, ZHANG CZ. Production and characterization of a single-chain variable fragment antibody from a site-saturation mutagenesis library derived from the anti-Cry1A monoclonal antibody[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 60-69.
- [73] ARCE LP, PAVAN MF, BOK M, GUTIÉRREZ SE, ESTEIN SM, SANTOS AT, CONDORÍ WE, UHART MM, PARREÑO V, VIZOSO-PINTO MG, IBAÑEZ LI. A multispecies competitive nanobody-based ELISA for the detection of antibodies against hepatitis E virus[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 15448.
- [74] 贾存瑜. 猪圆环病毒II型 Cap 蛋白纳米抗体的制备与竞争 ELISA 方法的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019.
- JIA CY. Preparation of nano-antibody against porcine circovirus type II Cap protein and establishment of competitive ELISA method[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [75] RAULF MK, JORDAN D, AUER H, WARNECKE JM, LEPENIES B, STRUBE C. A new ELISA and western blot technique based on recombinant TES antigen and/or larval antigen for the detection of toxocarasis in humans[J]. Parasitology, 2021, 148(3): 333-340.
- [76] DHEHIBI A, ALLAOUI A, RAOUAFI A, TERRAK M, BOUHAOUALA-ZAHAR B, HAMMADI M, RAOUAFI N, SALHI I. Nanobody-based sandwich immunoassay for pathogenic *Escherichia coli* F17 strain detection[J]. Biosensors, 2023, 13(2): 299.
- [77] 张玉琪. 对硫磷纳米抗体制备、免疫检测方法建立及分子识别机制研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2019.
- ZHANG YQ. Preparation of nano-antibody against parathion, establishment of immunoassay method and study on molecular recognition mechanism[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [78] AHMAD MI, AMORIM CG, ABU QATOUSEH LF, MONTENEGRO MCBSM. Nanobody-based immunosensor for the detection of *H. pylori* in saliva[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2024, 260: 116423.
- [79] GUO KY, WUSTONI S, KOKLU A, DÍAZ-GALICIA E, MOSER M, HAMA A, ALQAHTANI AA, AHMAD AN, ALHAMLAN FS, SHUAIB M, PAIN A, McCULLOCH I, AROLD ST, GRÜNBERG R, INAL S. Rapid single-molecule detection of COVID-19 and MERS antigens *via* nanobody-functionalized organic electrochemical transistors[J]. Nature Biomedical Engineering, 2021, 5(7): 666-677.
- [80] SHOUTE LCT, ABDELRASOUL GN, MA YH, DUARTE PA, EDWARDS C, ZHUO R, ZENG J, FENG YW, CHARLTON CL, KANJI JN, BABIUK S, CHEN J. Label-free impedimetric immunosensor for point-of-care detection of COVID-19 antibodies[J]. Microsystems & Nanoengineering, 2023, 9: 3.
- [81] QUEIROZ ZETUNE VILLA REAL K, MOUGIOS N, REHM R, SOGRATE-IDRISSI S, ALBERT L, RAHIMI AM, MAIDORN M, HENTZE J, MARTÍNEZ-CARRANZA M, HOSSEINI H, SAAL KA, OLEKSIIEVETS N, PRIGGE M, TSUKANOV R, STENMARK P, FORNASIERO EF, OPAZO F. A versatile synaptotagmin-1 nanobody provides perturbation-free live synaptic imaging and low linkage-error in super-resolution microscopy[J]. Small Methods, 2023, 7(10): 2300218.
- [82] JIANG YX, LIN Y, KRISHNASWAMY S, PAN RM, WU Q, SANDUSKY-BELTRAN LA, LIU MY, KUO MH, KONG XP, CONGDON EE, SIGURDSSON EM. Single-domain antibody-based noninvasive *in vivo* imaging of α -synuclein or tau pathology[J]. Science Advances, 2023, 9(19): eadf3775.
- [83] SOETENS E, BALLEGEER M, SAELENS X. An inside job: applications of intracellular single domain antibodies[J]. Biomolecules, 2020, 10(12): 1663.
- [84] 邓文月, 张维达, 孙慧敏, 于海波. 纳米抗体特性及其在冠状病毒研究中的应用[J]. 生物技术, 2022, 32(1): 126-133.
- DENG WY, ZHANG WD, SUN HM, YU HB. Characteristics of nanobody and its applications on study of coronaviruses[J]. Biotechnology, 2022, 32(1): 126-133 (in Chinese).
- [85] BEHDANI M, ZEINALI S, KARIMIPOUR M,

- KHANAHMAD H, SCHOONOOGHE S, ASLEMARZ A, SEYED N, MOAZAMI-GODARZI R, BANIAHMAD F, HABIBI-ANBOUHI M, HASSANZADEH-GHASSABEH G, MUYLDERMANS S. Development of VEGFR2-specific Nanobody *Pseudomonas* exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth[J]. *New Biotechnology*, 2013, 30(2): 205-209.
- [86] NESSLER I, KHERA E, VANCE S, KOPP A, QIU QF, KEATING TA, ABU-YOUSIF AO, SANDAL T, LEGG J, THOMPSON L, GOODWIN N, THURBER GM. Increased tumor penetration of single-domain antibody-drug conjugates improves *in vivo* efficacy in prostate cancer models[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(6): 1268-1278.
- [87] KLAUSER PC, CHOPRA S, CAO L, BOBBA KN, YU BC, SEO Y, CHAN E, FLAVELL RR, EVANS MJ, WANG L. Covalent proteins as targeted radionuclide therapies enhance antitumor effects[J]. *ACS Central Science*, 2023, 9(6): 1241-1251.
- [88] YU ZP, HU M, LI ZQ, XU D, ZHU LH, GUO YL, LIU QL, LAN WH, JIANG J, WANG LF. Anti-G250 nanobody-functionalized nanobubbles targeting renal cell carcinoma cells for ultrasound molecular imaging[J]. *Nanotechnology*, 2020, 31(20): 205101.
- [89] BABAMOHAMADI M, MOHAMMADI N, FARYADI E, HADDADI M, MERATI A, GHOBADINEZHAD F, AMIRIAN R, IZADI Z, HADJATI J. Anti-CTLA-4 nanobody as a promising approach in cancer immunotherapy[J]. *Cell Death & Disease*, 2024, 15(1): 17.
- [90] URICOLI B, BIRNBAUM LA, DO P, KELVIN JM, JAIN J, COSTANZA E, CHYONG A, PORTER CC, RAFIQ S, DREADEN EC. Engineered cytokines for cancer and autoimmune disease immunotherapy[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(15): e2002214.
- [91] SCULLY M, CATALAND SR, PEYVANDI F, COPPO P, KNÖBL P, KREMER HOVINGA JA, METJIAN A, deLa RUBIA J, PAVENSKI K, CALLEWAERT F, BISWAS D, de WINTER H, ZELDIN RK, INVESTIGATORS H. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic *Purpura*[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 380(4): 335-346.
- [92] TANAKA Y. Ozoralizumab: first Nanobody® therapeutic for rheumatoid arthritis[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2023, 23(7): 579-587.
- [93] HANNON CW, McCOURT C, LIMA HC, CHEN S, BENNETT C. Interventions for cutaneous disease in systemic lupus erythematosus[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021, 3(3): CD007478.
- [94] CUNNINGHAM S, PIEDRA PA, MARTINON-TORRES F, SZYMANSKI H, BRACKEVA B, DOMBRECHT E, DETALLE L, FLEURINCK C, CUNNINGHAM S, PIEDRA PA, VERHULST S, MATTHIJS I, PROESMANS M, GOETGHEBUER T, BOSHEVA M, DOSEV S, NIKOLOVA O, CHAKAROVA P, WU HUPAT E, MESA MONSALVE J, et al. Nebulised ALX-0171 for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in hospitalised children: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2021, 9(1): 21-32.
- [95] 李甜甜, 邓效禹, 李智杰, 许丽文, 孙亚杰, 胡博, 白雪. 纳米抗体及其在动物传染病防控中的应用[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(2): 377-385.
- LI TT, DENG XY, LI ZJ, XU LW, SUN YJ, HU B, BAI X. Nanoantibodies and their application in prevention and control of animal infectious diseases[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 44(2): 377-385 (in Chinese).
- [96] PERCIPALLE M, HUNASHAL Y, STEYAERT J, FOGOLARI F, ESPOSITO G. Structure of nanobody Nb₂₃[J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3567.
- [97] VALDÉS-TRESANCO MS, MOLINA-ZAPATA A, POSE AG, MORENO E. Structural insights into the design of synthetic nanobody libraries[J]. *Molecules*, 2022, 27(7): 2198.

(本文责编 郝丽芳)