

• 综 述 •

单域抗体的研究和应用进展

康晓圳^{1,3}, 曹佳莉^{1,3}, 张保惠^{2,3}, 袁权^{2,3}

1 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361102

2 厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361102

3 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

康晓圳, 曹佳莉, 张保惠, 等. 单域抗体的研究和应用进展. 生物工程学报, 2018, 34(12): 1974–1984.

Kang XZ, Cao JL, Zhang BH, et al. Single-domain antibody – advances in research and application. Chin J Biotech, 2018, 34(12): 1974–1984.

摘 要: 传统 IgG 抗体分子一般由轻链和重链组成, 轻链包含 1 个可变区 (VL) 和 1 个恒定区 (CL), 重链包含 1 个可变区 (VH) 和 3 个恒定区 (CH1, CH2, CH3)。单域抗体 (Single domain antibody, sdAb), 是指缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体, 因其分子量小, 也被称为纳米抗体 (Nanobody)。20 世纪 90 年代, 单域抗体最早在骆驼科动物中被发现, 之后在护士鲨、大星鲨和鳐鱼等软骨鱼纲动物中也发现了类似的抗体。单域抗体虽然结构简单, 但仍然可以达到与传统抗体相当甚至更高的与特异抗原结合的亲和力。相比于传统抗体, 单域抗体具有分子量小、稳定性强、易于重组表达等优点。近年来在生物学基础研究和医学临床应用方面均备受关注并被广泛应用。文中将从单域抗体的结构特征、理化性质、筛选方法及其在生物医学领域的重要应用进展进行综述。

关键词: 重链抗体, 单域抗体, 骆驼, 纳米抗体

Single-domain antibody – advances in research and application

Xiaozhen Kang^{1,3}, Jiali Cao^{1,3}, Baohui Zhang^{2,3}, and Quan Yuan^{2,3}

1 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

2 School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

3 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: Conventional IgG is composed of heavy and light chains. The light chain has one variable region (VL) and one constant region (CL) domain, whereas the heavy chain has one variable region (VH) and three constant region domains (CH1, CH2 and CH3). Single domain antibody (sdAb) is a kind of antibody that is composed of a variable domain of heavy chain and devoid of the light chain completely. Due to its small size, it is also called as nanobody. Although the sdAb has a simple structure, it can exhibit a comparable even better antigen-binding affinity than conventional antibody. Compared with

Received: March 9, 2018; **Accepted:** April 8, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81672023).

Corresponding author: Quan Yuan. E-mail: yuanquan@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81672023) 资助。

网络出版时间: 2018-04-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20180419.1148.001.html>

conventional antibody, the small size, high stability and simplicity in recombinant expression are representative advantages of sdAb. In recent years, scientists are becoming increasingly interested in the roles of sdAb in fundamental biomedical research and clinical application. In this review, we summarized the structural features, physicochemical properties, screening strategies and recent advances in application of sdAb.

Keywords: heavy-chain antibody, single-domain antibody, camelids, nanobody

传统抗体分子 (IgG) 在结构上是由两条相同的重链和两条相同的轻链组成, 此种结构在哺乳动物中均是非常保守的。抗体分子的轻链包含了 1 个 VL 区和 1 个 CL 区 (图 1), 而重链则拥有 1 个 VH 区和 3 个 CH 区 (CH1、CH2 和 CH3)。VH 区和 VL 区之间通过二硫键相互连接形成抗体的可变区 (Fv), 是抗体识别抗原的最小单位, 抗体可变区的序列差异决定了抗体能够特异地识别不同的抗原。而 CL 区和 CH 区则是相对保守的, 被称为抗体的恒定区, 其中 CH 区的 CH2 和 CH3 两个区域对于抗体招募免疫细胞发挥 ADCC (抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用) 和 CDC (补体依赖的细胞毒性作用) 功能有着重要的作用^[1-2]。

1993 年布鲁塞尔自由大学的 Hamers-Casterman 等首先报道了骆驼血液中除了传统的 IgG 抗体外还存在另一种类型的抗体, 与传统的哺乳动物抗体 IgG 分子结构不同, 这种抗体既缺失传统抗体的轻链, 也缺少重链恒定区的 CH1 区域, 被称为重链抗体 (Heavy chain antibody, HcAb)。重链抗体的可变区仅由抗体重链的可变区组成 (图 1), 与传统抗体的 Fab 类似, 该可变区可以与抗原特异性结合, 因此重链抗体可以发挥和传统抗体一样的功能。在哺乳类动物中, 目前只有在胼足亚目的骆驼科动物血液中发现含有功能性的重链抗体, 同属于偶蹄目的反刍亚目和猪形亚目动物体内未发现这类抗体^[3]。HcAb 普遍存在于各种骆驼科动物中, 包括单峰驼 *Camelus dromedarius*、亚州双峰驼 *Camelus bactrianus*、南美洲的大羊驼 *Lama glama*、原驼 *Lama guanicoe*、羊驼 *Vicugna pacos* 等, 尽管其所占比例略有不同, 如在南美洲

羊驼的血液中重链抗体比例为 10%–25%, 而在普通的双峰骆驼中则高达 50%–80%^[4-5]。除了骆驼科动物外, 在护士鲨 (又称为铰口鲨, Nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*)、大星鲨 (Smooth dogfish, *Mustelus canis*)、白斑角鲨 (Spiny dogfish, *Squalus acanthias*)、鳐鱼 (Skate) 和魮鱼 (Ray) 等软骨鱼纲动物血液也存在类似结构的抗体。在这些远古的物种血液中除了有异源四聚体的 IgM 和 IgW 抗体外, 还有一种被称为新抗原受体 (Ig new antigen receptor) 的重链抗体, 简称为 IgNAR^[6], 这类抗体由两个相同的重链组成, 重链包含 5 个恒定区和 1 个可变区 (图 1)。

无论是骆驼科动物来源的 HcAb 还是软骨鱼来源的 IgNAR, 其特异性结合抗原的均为单一重链的可变区, 分别被称为 VHH (Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH) 和 VNAR (Variable domain of new antigen receptor, VNAR)。采用分子生物学技术直接克隆并重组表达 VHH 或 VNAR, 可获得只含有单个结构域的最小单元抗原结合片段, 被称为单域抗体 (Single-domain antibodies, sdAbs), 亦被称为纳米抗体 (Nanobody)。单域抗体通常只由 110–130 个氨基酸组成, 分子量仅有 12–15 kDa, 远远小于传统完整抗体 (150–160 kDa) 及其 Fab 片段 (约 50 kDa), 但却能具备与传统抗体相似或更高的特异性抗原亲和力。单域抗体固有的分子量小、理化特征稳定、亲和力高和易于重组表达制备的特点使得其在被发现后备受关注, 经过 20 多年的研究, 在免疫研究、诊断检测、医学和生物学成像、治疗性抗体发展等领域的应用均取得了积极进展。文中主要从 sdAbs 的结构和理化特征、筛选和制备方法、

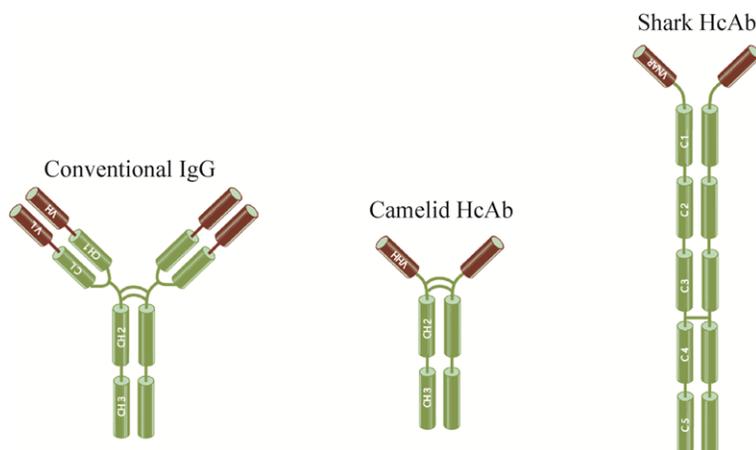


图1 传统抗体与重链抗体的结构对比示意图

Fig. 1 Structures of conventional antibody and heavy-chain antibody.

在生物学和医学研究中的应用等方面总结分析了单域抗体的新近研究进展,并展望了其进一步发展和应用的前景以及面临的问题。

1 单域抗体的理化性质

相比于传统抗体而言,单域抗体有着独特的理化性质。主要包括以下几点:1)单域抗体的分子量小,因为没有轻链的存在,单域抗体VHH的大小只有15 kDa左右,鲨鱼来源的单域抗体VNAR因为缺少CDR2区(Complementarity-determining region 2,互补决定簇2),只有12 kDa左右,是已知的最小的抗原结合单位。这一特点使得其相对易于携带靶向药物进入细胞内部或穿越血脑屏障发挥作用。2)单域抗体具有更好的溶解度和稳定性。传统抗体VH的FR2区域通常会包含数个相对保守的疏水氨基酸,利于与VL通过疏水相互作用结合,但在VHH中这段区域常是暴露的,因此这几个氨基酸被演化替换成亲水性的氨基酸,例如,在传统抗体的VH中第37位的Val、第44位的Gly、第45位的Leu和第47位的Phe/Trp等疏水氨基酸,在骆驼科动物VHH中被相应替换为Phe/Tyr(aa37)、Glu/Gln(aa45)、Arg/Cys(aa45)、Gly/Arg/Leu/Ser(aa47)等相对亲水

性更强的氨基酸^[7-8]。这些氨基酸改变使得VHH在蛋白可逆折叠、热稳定性和抗蛋白降解等方面的性质相较于传统抗体更优。一些单域抗体可以耐受2.3–3.3 mol/L的盐酸胍以及60–80 °C的高温^[9]。此外,VHH除形成Ig分子保守的FR1(Framework region 1,框架区域1)和FR3(Framework region 3,框架区域3)间的二硫键外,还可能形成连接CDR1(Complementarity-determining region 1,互补决定簇1)和CDR3(Complementarity-determining region 3,互补决定簇3)或者连接CDR2和CDR3之间的额外二硫键,从而进一步提高VHH构象结构的稳定性^[10-12],这些二硫键甚至可以让单域抗体不被胃蛋白酶和糜蛋白酶降解,因此有些单域抗体可以口服应用^[10]。3)单域抗体的CDR3较长,使其与抗原的结合方式更加灵活,此种结构特征使得单域抗体可以结合抗原凹状的隐藏表位,例如病毒的隐藏表位^[13]和酶/受体蛋白分子的激活位点等^[14-15]。4)与传统的鼠单克隆抗体相比,骆驼单域抗体的免疫原性更小,鼠源抗体与人源抗体的差异较大,导致其免疫原性强,一般需要经过复杂的人源化才能得到进一步的应用,而骆驼抗体的VH和人抗体的VH相似度很高,易于进行人源化改造和临床应用。

2 单域抗体筛选方法

2.1 基于噬菌体表面展示技术的单域抗体筛选

噬菌体表面展示技术最早由 Smith 等在 1985 年发展出来, 该技术的核心是将目的基因通过基因工程方法融合表达在噬菌体外壳蛋白基因中, 使其展示在噬菌体表面, 进而可通过特异性富集筛选获得携带有靶蛋白/多肽的噬菌体, 再进行克隆化和序列测定, 并最终获得靶蛋白/多肽的 DNA 编码序列。这一技术借助噬菌体的高扩增性, 将基因型和功能表型(结合活性)结合在一起, 是一种非常高效的筛选系统^[16]。

由于不存在传统抗体的轻重链匹配问题, 单域抗体更适合采用噬菌体展示文库技术进行筛选。噬菌体单域抗体文库一般分为三大类: 免疫库、天然库和全合成库。免疫库是指从预先免疫过的动物(如羊驼等)体内通过特异性富集靶抗原特异的 B 细胞基因, 并扩增获得重链抗体 VH 基因而构建的单域抗体表达文库, 通常只需较小库容即可筛选到高亲和力抗体。免疫库的受限因素在于免疫原的特征, 不同免疫原在动物中的体液免疫应答强弱和表位差异均可能影响最终获得抗体的质量和多样性, 最终筛选到的抗体同质化(如识别的表位相同等)程度较高。天然库是采用未经靶抗原免疫动物的 B 细胞扩增全部重链抗体 VH 基因构建的单域抗体文库。从天然库中筛选获得高亲和力单域抗体的成功率基本与库容成正比, 理论上只要所构建的抗体库库容和多样性足够大 ($>10^9$ CFU/mL), 即可从中筛选到针对各种靶抗原的高亲和力单域抗体, 甚至是针对哺乳动物中高度保守的抗原(类似自身抗原)的单域抗体。尽管天然库已具有较高多样性, 但由于在实际建库操作中, 会因抗体基因家族的偏向性以及先天免疫耐受导致的克隆缺失等原因导致克隆多样性的降低。直接采用基因合成方法构建

的合成单域抗体库可通过调节抗体分子中抗原结合区域附近的骨架区域来进一步提高库的多样性, 也可直接基于人源化的 VHH 分子骨架进行合成构建。Moutel 等新近采用全合成的方法构建了人源化的通用单域抗体库 NaLi-H1, 库容达到 3×10^9 CFU/mL, 并从中成功筛选到若干针对不同靶标的高亲和力单域抗体(亲和力达到 10^{-9} CFU/mL– 10^{-10} mol/L)^[17]。

噬菌体展示技术筛选抗体的流程一般包括以下几点(图 2): 1) 抗体基因片段的获取。取羊驼或鲨鱼的外周血, 采用淋巴细胞分离液分离得到淋巴细胞, 提取淋巴细胞的总 RNA, 通过 RT-PCR 逆转录成 cDNA, 采用巢式 PCR 两步法扩增 VHH 基因, 最后将 VHH 基因克隆到噬菌体载体上, 克隆构建完成后可用二代测序的方法来质控文库质量。2) 目的基因的淘选。先将噬菌体文库与不带有目的抗原的封闭液共孵育, 进行负选, 减少非特异性反应, 提高抗体淘选的效率。再将抗原固定到固相载体上(聚苯乙烯板或者磁珠)进行淘选。淘选一般要进行多轮, 每轮淘选后可采用 Phage-ELISA 检测, 直到能检测到明显的富集效果。3) 抗体的表达纯化。将目的抗体基因序列克隆到表达载体上, 可以通过原核表达系统或真核表达系统进行表达。

2.2 基于酵母表面展示技术的单域抗体筛选

酵母属于真核的单细胞生物, 用于抗体展示技术的酵母一般是酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 这种酵母有大约 200 nm 厚的细胞壁, 出芽的酵母细胞壁表面有凝集素蛋白, 可以与相对交配型的酵母上的 Aga2p 蛋白结合, 单域抗体便是以融合蛋白的形式与 Aga2p 蛋白融合表达并展示于酵母细胞表面^[18-20]。

酵母展示抗体库的筛选方法一般采用磁珠辅助的细胞分选(MACS)和流式细胞分选(FACS), MACS 的主要作用是为了减少非特异性结合, 通

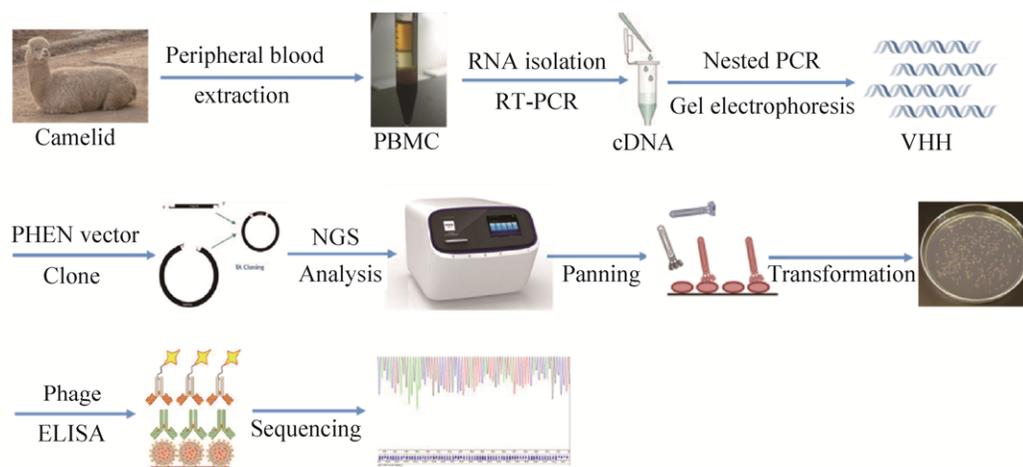


图 2 噬菌体抗体库的建立和筛选流程

Fig. 2 Process of the establishment and selection of phage display antibody library.

常会在 MACS 筛选过后的基础上进行多轮的 FACS 筛选^[20-21]。

相比于噬菌体展示技术，酵母展示技术既有优势也有不足。一方面酵母属于真核细胞，抗体的翻译后修饰与哺乳动物细胞类似，糖基化后的抗体稳定性高，同时也避免在哺乳动物表达系统中可能存在的未知情况。其次酵母展示技术采用的是流式细胞分选的方法，整个筛选过程的可控性更高^[16]。但另一方面酵母抗体库的库容一般比噬菌体抗体库的小，最高到 1×10^9 CFU，但随着技术的优化，已有报道酵母抗体库的库容可以提高到 10^{10} CFU 水平^[22]，而噬菌体抗体库的库容可以高达 10^{11} CFU。同时酵母展示技术在筛选低聚物的抗原时效果可能不理想，因为每一个酵母细胞上会同时展示 1×10^4 到 1×10^5 个抗体片段^[20]，因此一个酵母细胞可能同时共价结合多个抗原，这样便会导致筛选到的抗体的亲和力可能不如预期。

2.3 基于细菌展示技术的单域抗体筛选

大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* 除了用于噬菌体文库的构建外，其本身也可以作为抗体展示的载体。*E. coli* 属于革兰氏阴性菌，除了有细菌内膜，在细胞壁外还有一层细菌外膜。抗体片段通

常展示在 *E. coli* 细菌的内膜，通过抗体的 Fc 段与膜上的脂蛋白结合，这种展示和表达方式称为锚定周质表达 (Anchored periplasmic expression, APEX)。但由于 *E. coli* 细菌细胞壁和外膜的存在，因此细菌需要通透处理成原生质球的形式才能与抗原结合^[23-24]。利用外膜展示抗体的技术也被报道过，例如 Salema 等将抗体片段展示在自转运蛋白 (EhaA autotransporter) 或紧密黏附素 (Intimin) 上，这两种蛋白来源于 *E. coli* O157:H7 (EHEC) 细菌的外膜，且可以在 *E. coli* K-12 细菌中表达和展示^[25-27]。革兰氏阳性菌中的肉葡萄球菌 *Staphylococcus carnosus* 也可以用于抗体展示，该方法是通过肉葡萄球菌的蛋白 A 上的细胞壁锚定区域 (Cell-wall anchoring domain) 将抗体片段从细胞膜内转运到膜外并锚定在细胞壁上^[28]。细菌展示技术的筛选方法一般采用流式细胞分选 (FACS) 的方式，同时也会结合磁珠辅助的细胞分选 (MACS)。

3 单域抗体的应用

3.1 单域抗体在显微镜学中的应用

因为单域抗体体积小，已经有许多研究证实

了将单域抗体带上标签后, 可以用作纳米级的检测工具。例如, 针对 GFP 和 RFP 等荧光蛋白的单域抗体在标记上有机染料后可用于超分辨率显微镜成像^[29-30]。2012 年, Ries 等利用该方法对稳定表达 tubulin-YFP 的 Ptk2 细胞进行成像, 并最终将分辨率提高到 (26.9 ± 3.7) nm (细胞微管蛋白的直径为 25 nm)^[29], 而如果用传统的抗体, 分辨率只能达到 45 nm 左右。Chamma 等将 GFP 的单域抗体应用于活细胞成像和双色荧光成像系统。他们利用单域抗体去活体标记轴突蛋白-1 β , 然后用双色成像系统去观察神经细胞间的跨突触连接^[31]。GFP 和 RFP 的单域抗体还可以用于研究亚细胞上的超微结构, 例如核孔复合物和胞膜窖, 与间接的抗体免疫化学方法不同, 利用单域抗体染色可以更好地模拟这些超微结构的真实情况^[32-33]。

3.2 单域抗体用于结构生物学研究

单域抗体结合抗原可以稳定抗原的结构, 并且单域抗体本身分子量小, 对抗原的影响小, 所以单域抗体被用于稳定一些结构不稳定的蛋白, 辅助解析蛋白的结构。G 蛋白偶联受体 GPCRs (G protein coupled receptors) 是一大类膜蛋白受体的简称, 是最著名的药物靶标分子。它参与了很多细胞信号转导的过程, 可以调节人体许多生理机能。相同的 GPCRs 可以结合不同亲和力的激动剂分子, 并激活不同的下游信号通路。为了更好地理解不同的激动剂分子为何可以激活相同的受体, GPCRs 的晶体结构解析是非常重要的手段。 β_2 肾上腺素受体 (β_2 -adrenoceptor, β_2 AR) 是 GPCRs 的成员, 它可以被许多天然激动剂, 如肾上腺素 (Adrenaline) 等低亲和力地结合并激活, 但不稳定。 β_2 AR 也可以和 BI-167107 (Boehringer Ingelheim) 等商品化激动剂高亲和力地结合并维持稳定的激活状态。G 蛋白可以通过与 β_2 AR 结合并增强其与激动剂之间的亲和力。Nb80 是一株来源于美洲驼 (Llama) 的单域抗体, 它可以与

β_2 AR 结合并表现出和 G 蛋白一样的性质^[34-35]。Rasmussen 等利用 Nb80 与 β_2 AR 的变体 β_2 AR-T4L (第 3 个胞内环被替换成 T4 溶菌酶) 结合形成的复合物 β_2 AR-T4L-Nb80 成功地解析了 BI-167107 激活下的 β_2 AR 晶体结构, 分辨率为 3.5 \AA ^[34]。之后, Ring 等通过酵母展示技术筛选不同的 Nb80 变体, 并成功得到了一株 Nb6B9 抗体, 这株抗体可以将 BI-167107 激活下的 β_2 AR 晶体结构分辨率提高到 2.8 \AA , 同时也解析了羟苄基异丙肾上腺素 (hydroxybenzyl isoproterenol, HBI) 和 adrenaline 这两类低亲和力激动剂结合下的 β_2 AR 的晶体结构, 分辨率分别为 3.1 \AA 和 3.2 \AA ^[36]。Staus 等还发现了一株可以显著降低 β_2 AR 与激动剂亲和力的抗体 Nb60, 进一步扩大了 β_2 AR 的变构潜力^[37]。

3.3 单域抗体用于医学诊断

虽然传统的单克隆抗体在标记了放射性元素 (99mTc 或 68Ga) 后可以用于医学诊断和显影, 但是由于抗体的分子量大, 一方面组织的穿透性不好, 成像组织受限, 另一方面半衰期长, 无法在短时间内被清除。单域抗体分子量小, 可以更快速地进入组织, 缩短检测时间。同时半衰期短只有 1-2 h, 不会长时间滞留在组织中。Balhuizen 等利用放射性同位素 99mTc 标记的单域抗体追踪胰腺内分泌细胞, 因为胰腺内分泌细胞的二肽基肽酶 6 (DPP6) 的表达量远高于其周围的组织细胞, 所以可以通过筛选针对 DPP6 的单域抗体来实现对胰腺内分泌细胞的定位追踪, 并且在过继转移了表达 DPP6 的 Kelly 神经母细胞瘤细胞的免疫缺陷小鼠模型上验证了该方法的可行性^[38]。PD-1/PD-L1 抗体药物是当前备受瞩目且前景较好的肿瘤治疗手段, 但是有一部分病人对该类药物无应答, 如果能在治疗前预测到患者对该类药物的应答效果, 将更有利于对症下药。Broos 等通过筛选针对 PD-L1 的单域抗体并标记 99mTc 同位素, 最终发现了两株可以与 PD-L1 表达的肿瘤

细胞反应而与 PD-L1 缺失的肿瘤细胞不反应的单域抗体 C3 和 E2, 并且证明这两株抗体标记的同位素与 PD-L1 的表达量存在明显的剂量效应关系^[39], 这也就说明了单域抗体可以用于肿瘤微环境中目的分子的成像分析。

3.4 单域抗体介导的药物传递

目前已有文章报道针对肿瘤特异抗原的单域抗体可用于介导药物特异性地识别肿瘤, 从而减少药物对正常细胞的非特异性细胞毒性。单域抗体没有 Fc 段, 因此可以避免被 Fc 介导的清除作用降解, 同时也不会诱发免疫反应^[40]。针对肿瘤组织而言, 血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)是很好的抗体靶标, 因此该类的报道较多^[41-45]。例如 Ahani 等首先构建了外膜包被 Sindbis virus E2 糖蛋白 (cSVE2s), 内部包裹针对肿瘤血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2 或 KDR) 的慢病毒的假病毒, 然后将针对 VEGFR2 的单域抗体 p2.2-Nb 与 cSVE2s 连接, 通过单域抗体的靶向作用将假病毒带入肿瘤组织^[41]。Deng 等通过将针对 VEGFR 的单域抗体与南瓜蛋白 (cucurmosin) 连接, 利用 cucurmosin 蛋白的促凋亡作用来杀伤肿瘤, 作者直接采用原核表达系统表达了该重组蛋

白, 并在体外验证了该重组蛋白的抗肿瘤效应^[46]。除了针对 VEGFR 分子外, 还有针对肿瘤其他相关分子靶标的单域抗体被报道, 例如 CD7 (TP-40), CD7 分子主要表达于急性淋巴细胞白血病的 T 细胞, 针对 CD7 分子的抗毒素已经被证明对 CD7+恶性肿瘤病人具有潜在治疗效果, Tang 等将针对 CD7 的单域抗体和毒素假单胞菌外毒素 A (Pseudomonas exotoxin A, PE38) 偶联, 同样采用原核表达系统表达该重组蛋白, 并在 CD7 阳性的白血病细胞系 Jurkat 和 CEM 细胞以及 T 细胞急性淋巴细胞白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 和急性粒细胞白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 细胞上验证了其可以显著促进这类细胞的凋亡^[47]。

3.5 单域抗体用于疾病治疗

单域抗体和传统抗体一样可以用于疾病的治疗, 但因为单域抗体发展得比较晚, 因此目前用于疾病治疗的单域抗体数量不多, 而且多数还处于临床研究阶段, 如表 1 所示, 目前仅有一株单域抗体 caplacizumab (ALX-0081) 完成了三期临床研究, caplacizumab 是一株可用于治疗获得性血栓性血小板减少性紫癜 (TTP) 的单域抗体, 它

表 1 目前用于疾病治疗的单域抗体的临床研究阶段情况

Table 1 The present clinical stage of therapeutic nanobodies

Product	Target	Indication	Stage	Company
Caplacizumab (ALX-0081)	vWF	aTTP	Filing	Ablynx
Vobarilizumab	IL-6R	SLE	Phase II	Ablynx
Vobarilizumab	IL-6R	RA	Phase II	Ablynx
ALX-0171	RSV	RSV	Phase II	Ablynx
Ozorralizumab	TNF- α	RA	Phase II	Taisho
ALX-1141/M6495	ADAMTS-5	Osteoarthritis	Phase I	Merck
ALX-0716/M1095	IL-17A/IL-17F	Psoriasis	Phase I	Merck
BI 655088	CX3CR1	Chronic kidney disease	Phase I	BI
BI 836880	VEGF/Ang2	Oncology	Phase I	BI
KN035	PD-L1	Tumors	Phase I	Alphamab

aTTP is short for acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, Vwf is short for von Willebrand Factor, SLE is short for Systemic Lupus Erythematosus, RA is short for Rheumatoid Arthritis, RSV is short for Respiratory Syncytial Virus, BI is short for Boehringer-Ingelheim.

的靶标分子是血管性血友病因子, 通过与该因子结合, 抑制该因子和血小板之间的相互作用, 从而防止血小板的聚集^[48-49]。II 期临床的结果显示相比于安慰剂, caplacizumab 可以显著缓解急性发作的 TTP, 说明了 caplacizumab 对病人的血小板有保护作用, 但是 caplacizumab 也同时增加了病人的出血倾向^[50-52]。ALX-0171 是一株针对呼吸道合胞体病毒的具有潜在治疗效果的单域抗体, 相比于传统的帕利珠单抗, 这株单域抗体在 A 型和 B 型的病毒株中展现出更好的体外中和活性, 同时针对病毒的复制也显示出更好的抑制效果^[13]。同样值得关注的是 KN035 单域抗体, KN035 是我国第一个自主研发的 PD-L1 单域抗体药物, 它可以诱导机体产生强烈的 T 细胞应答并抑制肿瘤的生长。对 KN035 与 PD-L1 的复合物进行晶体结构解析发现 KN035 可以竞争性地封闭 PD-L1 与 PD1 的几个关键结合位点, 例如 Ile54、Tyr56 和 Arg113^[53]。在 2017 年 1 月, KN035 获得临床批准并在 3 月底开始了第一例临床试验。

4 总结与展望

单域抗体相比传统抗体而言不仅拥有更优的理化性质, 而且表达和筛选也更加简便。从单域抗体被发现至今已经有 20 多年, 这 20 年里单域抗体在生物学和医学领域中实现了多方面的应用, 不仅促进了某些技术的更新, 同时也为疾病的治疗和诊断提供了新的可能性。

虽然单域抗体为抗体研究提供了新的突破口, 但也仍然存在一些问题。一方面单域抗体的半衰期短, 虽然适用于分子显影, 但是如果作为药物治疗的话, 可能会导致其过早的被系统代谢, 不仅无法起到长期的保护作用, 同时也会增加肾脏的代谢压力。另一方面, 单域抗体虽然筛选和表达相对简单, 但如果要获得理想的具有很好应用价值的单域抗体是一个非常繁琐的过程, 噬菌体抗体文库的筛选无法避免丝状噬菌体表面易与

抗原结合带来的假阳性, 酵母和细菌抗体文库库容小等都是单域抗体筛选的难点。

单域抗体在未来势必还会有更大的应用。1) 单域抗体可用于双特异性抗体的构建, 双特异性抗体是一类可以同时特异性结合两种不同抗原的人工改造抗体, 在肿瘤免疫和自身免疫治疗中有非常广阔的应用前景, 单域抗体易于改造和表达的特性在这领域中必然会发挥重要的功能^[54]。2) 随着胞内抗体技术的发展, 以胞内分子为靶标的抗体治疗成为了可能^[55], 而单域抗体在这方面有着得天独厚的优势, 一方面单域抗体分子量小, 入胞的效率远高于传统抗体, 而传统抗体的入胞一般也会采用 scFv (单链抗体可变区) 的形式^[56-57]以减小抗体分子量。另一方面因为胞内抗体必须要在高还原性的胞内环境中保持活性, 因此往往需要对抗体进行适当的改造。单域抗体易于改造并且可以用原核表达系统获得的优势将会展现强大的利用价值。我们团队也在尝试筛选针对乙型肝炎病毒核心颗粒 HBcAg 的单域抗体, 并希望通过已有的抗体入胞技术将其导入细胞内, 观察其对胞内病毒复制的影响。3) 利用全合成的天然单域抗体合成库筛选抗体的方式不仅可以减少动物免疫的步骤, 而且有利于筛选某些构象特异和细胞表面特异的抗原分子^[17]。随着建库技术的更新, 更高的抗体库库容会有利于建立更加广泛通用的天然抗体库。

REFERENCES

- [1] Liu Z, Gunasekaran K, Wang W, et al. Asymmetrical Fc engineering greatly enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effector function and stability of the modified antibodies. *J Biol Chem*, 2014, 289(6): 3571-3590.
- [2] Kinder M, Greenplate AR, Strohl WR, et al. An Fc engineering approach that modulates antibody-dependent cytokine release without altering cell-killing functions. *MAbs*, 2015, 7(3): 494-504.

- [3] Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognt*, 1999, 12(2): 131–140.
- [4] Blanc MR, Anouassi A, Ahmed AM, et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54(4): 207–212.
- [5] De Simone EA, Saccodossi N, Ferrari A, et al. Development of ELISAs for the measurement of IgM and IgG subclasses in sera from llamas (*Lama glama*) and assessment of the humoral immune response against different antigens. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 126(1/2): 64–73.
- [6] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995, 374(6518): 168–173.
- [7] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82(1): 775–797.
- [8] Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol*, 2000; 37(10): 579–590.
- [9] Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci*, 2002, 11(3): 500–515.
- [10] Hussack G, Hirama T, Ding W, et al. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS ONE*, 2011, 6(11): e28218.
- [11] Hussack G, Mackenzie CR, Tanha J. Characterization of single-domain antibodies with an engineered disulfide bond//Saerens D, Muyldermans S, Eds. *Single Domain Antibodies*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 911: 417–429.
- [12] Saerens D, Conrath K, Govaert J, et al. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *J Mol Biol*, 2008, 377(2): 478–488.
- [13] Detalle L, Stohr T, Palomo C, et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 60(1): 6–13.
- [14] Crasson O, Rhazi N, Jacquin O, et al. Enzymatic functionalization of a nanobody using protein insertion technology. *Protein Eng Des Sel*, 2015, 28(10): 451–460.
- [15] De Genst E, Chan PH, Pardon E, et al. A nanobody binding to non-amyloidogenic regions of the protein human lysozyme enhances partial unfolding but inhibits amyloid fibril formation. *J Phys Chem B*, 2013, 117(42): 13245–13258.
- [16] Sheehan J, Marasco WA. Phage and yeast display. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(1): AID-0028–2014.
- [17] Moutel S, Bery N, Bernard V, et al. NaLi-H1: a universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife*, 2016, 5: e16228.
- [18] Gera N, Hussain M, Rao BM. Protein selection using yeast surface display. *Methods*, 2013, 60(1): 15–26.
- [19] Lipke PN, Kurjan J. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1): 180–194.
- [20] Boder ET, Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Price JV. Engineering antibodies by yeast display. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 526(2): 99–106.
- [21] Chao G, Lau WL, Hackel BJ, et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 755–768.
- [22] Benatuil L, Perez JM, Belk J, et al. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng Des Sel*, 2010, 23(4): 155–159.
- [23] Mazor Y, van Blarcom T, Mabry R, et al. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(5): 563–565.
- [24] Harvey BR, Georgiou G, Hayhurst A, et al. Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from *Escherichia coli*-expressed libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9193–9198.

- [25] Salema V, Marín E, Martínez-Arteaga R, et al. Selection of single domain antibodies from immune libraries displayed on the surface of *E. coli* cells with two β -domains of opposite topologies. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75126.
- [26] Salema V, López-Guajardo A, Gutierrez C, et al. Characterization of nanobodies binding human fibrinogen selected by *E. coli* display. *J Biotechnol*, 2016, 234: 58–65.
- [27] Salema V, Mañas C, Cerdán L, et al. High affinity nanobodies against human epidermal growth factor receptor selected on cells by *E. coli* display. *MAbs*, 2016, 8(7): 1286–1301.
- [28] Fleetwood F, Devoogdt N, Pellis M, et al. Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(6): 1081–1093.
- [29] Ries J, Kaplan C, Platonova E, et al. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods*, 2012, 9(6): 582–584.
- [30] Beghein E, Gettemans J. Nanobody technology: a versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration. *Front Immunol*, 2017, 8: 771.
- [31] Chamma I, Letellier M, Butler C, et al. Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin. *Nat Commun*, 2016, 7: 10773.
- [32] Platonova E, Winterflood CM, Junemann A, et al. Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods*, 2015, 88: 89–97.
- [33] Szymborska A, de Marco A, Daigle N, et al. Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging. *Science*, 2013, 341(6146): 655–658.
- [34] Rasmussen SGF, Choi HJ, Fung JJ, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature*, 2011, 469(7329): 175–180.
- [35] Saleh N, Ibrahim P, Clark T. Differences between G-protein-stabilized agonist-GPCR complexes and their nanobody-stabilized equivalents. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(31): 9008–9012.
- [36] Ring AM, Manglik A, Kruse AC, et al. Adrenaline-activated structure of β_2 -adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature*, 2013, 502(7472): 575–579.
- [37] Staus DP, Strachan RT, Manglik A, et al. Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature*, 2016, 535(7612): 448–452.
- [38] Balhuizen A, Massa S, Mathijs I, et al. A nanobody-based tracer targeting DPP6 for non-invasive imaging of human pancreatic endocrine cells. *Sci Rep*, 2017, 7: 15130.
- [39] Broos K, Keyaerts M, Lecocq Q, et al. Non-invasive assessment of murine PD-L1 levels in syngeneic tumor models by nuclear imaging with nanobody tracers. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 41932–41946.
- [40] Hu YZ, Liu CX, Muyldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol*, 2017, 8: 1442.
- [41] Ahani R, Roohvand F, Cohan RA, et al. Sindbis virus-pseudotyped lentiviral vectors carrying VEGFR2-specific nanobody for potential transductional targeting of tumor vasculature. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(11): 738–747.
- [42] Behdani M, Zeinali S, Karimipour M, et al. Development of VEGFR2-specific Nanobody *Pseudomonas* exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *N Biotechnol*, 2013, 30(2): 205–209.
- [43] Wang YY, Wang YD, Chen GJ, et al. Quantum-dot-based theranostic micelles conjugated with an Anti-EGFR nanobody for triple-negative breast cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(36): 30297–30305.
- [44] Ma L, Gu K, Zhang CH, et al. Generation and characterization of a human nanobody against VEGFR-2. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(6): 857–864.
- [45] Farasat A, Rahbarizadeh F, Hosseinzadeh G, et al. Affinity enhancement of nanobody binding to EGFR: in silico site-directed mutagenesis and molecular dynamics simulation approaches. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, 35(8): 1710–1728.
- [46] Deng CM, Xiong JN, Gu XF, et al. Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific

- nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency *in vitro*. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 38568–38580.
- [47] Tang JL, Li JL, Zhu XJ, et al. Novel CD7-specific nanobody-based immunotoxins potently enhanced apoptosis of CD7-positive malignant cells. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34070–34083.
- [48] Bartunek J, Barbato E, Heyndrickx G, et al. Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a nanobody directed towards von Willebrand factor. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013, 6(3): 355–363.
- [49] Momi S, Tantucci M, Van Roy M, et al. Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs. *Blood*, 2013, 121(25): 5088–5097.
- [50] Peyvandi F, Scully M, Hovinga JAK, et al. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 2016, 374(6): 511–522.
- [51] Peyvandi F, Scully M, Hovinga JAK, et al. Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 2017, 15(7): 1448–1452.
- [52] Holz JB. The TITAN trial—assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Apher Sci*, 2012, 46(3): 343–346.
- [53] Zhang F, Wei HD, Wang XX, et al. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov*, 2017, 3: 17004.
- [54] de Bruin RCG, Veluchamy JP, Loughheed SM, et al. A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of V γ 9V δ 2-T cells. *Oncoimmunology*, 2017, 7(1): e1375641.
- [55] Shin YJ, Park SK, Jung YJ, et al. Nanobody-targeted E3-ubiquitin ligase complex degrades nuclear proteins. *Sci Rep*, 2015, 5: 14269.
- [56] Ordóñez A, Pérez J, Tan L, et al. A single-chain variable fragment intrabody prevents intracellular polymerization of Z α_1 -antitrypsin while allowing its antiproteinase activity. *FASEB J*, 2015, 29(6): 2667–2678.
- [57] Thammasit P, Sangboonruang S, Suwanpairoj S, et al. Intracellular acidosis promotes mitochondrial apoptosis pathway: role of EMMPRIN down-regulation *via* specific single-chain Fv intrabody. *J Cancer*, 2015, 6(3): 276–286.

(本文责编 郝丽芳)