

纳米抗体技术及其在疾病诊断和治疗中的应用*

周陶然 詹守斌 翟飞 汪洋** 易军**

(南京理工大学生物工程系, 南京 210094)

摘要 单克隆抗体具有特异性结合抗原的能力, 已被广泛应用于疾病诊断及治疗领域. 但因单克隆抗体的组织渗透能力较差、体内的保留时间较长以及制备过程繁琐, 从而限制了其在临床中的应用. 自 1993 年首次报道在骆驼体内天然存在的单链抗体(HCAb)以来, 由于其可变区 VHH(纳米抗体)具有体积小、溶解度高、特异性强以及可在细菌中大量表达等优点, 较之传统单克隆抗体, VHH 在疾病的诊断及药物开发等医学领域具有更广阔的应用前景. 本文综述了: 纳米抗体的骨架区及互补决定区与传统抗体重链相应区间的结构比较; 纳米抗体库的构建以及运用噬菌体展示技术对 VHH 库的筛选; 纳米抗体技术在疾病诊断中的应用及其用于分子显像的优势, 以及纳米抗体作为抗肿瘤免疫偶联物的靶向组分在癌症治疗领域中的最新进展.

关键词 单链抗体, 纳米抗体, 纳米抗体库构建, 免疫诊断与治疗

学科分类号 Q816, R446.61

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0181

免疫球蛋白(immunoglobulin G, IgG)是由浆细胞分泌的, 能对细菌、病毒等抗原进行特异性识别和结合. 随着单克隆抗体技术、分子工程和噬菌体展示技术的持续发展, 单克隆抗体在免疫试剂、分子显像等疾病诊断方面具有广泛应用前景, 并且单克隆抗体药物也已用于心血管病、自身免疫性疾病以及恶性肿瘤等疾病的临床治疗^[1-3]. 如, 抗癌药物赫赛汀是一种针对乳腺癌 HER2 的曲妥珠单克隆抗体, 通过阻止人体表皮生长因子(EGF)与 HER2 的结合, 从而抑制癌细胞生长, 该抗癌药物仅 2013 年销售额就高达 65.6 亿美元.

Köhler 和 Milstein^[4]在 1975 年创建了单克隆抗体技术: 通过免疫哺乳动物产生能分泌特异性抗体的浆细胞, 与骨髓瘤细胞融合, 筛选得到所需细胞株, 进而获得单克隆抗体. 传统抗体制备过程中不仅需要大量免疫哺乳动物, 且需要经过高亲和/特异性分离等繁琐步骤, 导致单克隆抗体生产成本高、耗时长, 不利于大规模生产. 通过基因工程技术在细菌中表达抗原结合区域(Fab)和单链抗体可变区(scFv), 以降低生产成本、提高生产效率. 但这些方法生产的 Fab 和 scFv 抗体普遍存在溶解度低以及片段无法正确折叠/重组等问题, 无法满足

大规模工业生产的要求.

20 世纪 90 年代, Hamers-Casterman 等^[5]在骆驼科动物的血清中发现了一种缺乏轻链的特殊抗体, 称之为单链抗体(HCAb), 该结构后来在鲨鱼、蝠鲼和鳐鱼等软骨鱼类的体内也有发现. HCAb 不仅完整保留了抗原结合区域结构, 而且保持了与抗原绑定的高亲和力. 同软骨鱼类相比, 骆驼抗体恒定区与人类的较为相似, 容易进行动物免疫实验, 因此, 目前纳米抗体技术研究主要集中在骆驼科单链抗体及其派生物.

1 纳米抗体结构

传统的 IgG 由 2 条重链和 2 条轻链构成, 2 条重链之间以及重链和轻链之间通过二硫键进行连接(图 1). 轻链和重链都由可变区和恒定区结构组成, 重链的恒定区为 CH1、CH2、CH3, 可变区为 VH,

* 国家自然科学基金资助项目(21271104, 21671103, 31300111).

** 通讯联系人. Tel: 025-84303273

易军. E-mail: yijun@njust.edu.cn

汪洋. E-mail: wangyang@njust.edu.cn

收稿日期: 2016-05-26, 接受日期: 2016-09-04

轻链的恒定区为 CL, 可变区为 VL. 可变区中的部分氨基酸容易发生突变, 称为高变区, 由其组成的抗原结合片段位于抗体两臂的末端, 决定了 IgG 的抗原特异性. 与传统 IgG 相比, 在骆驼中发现的单链抗体(HCAb)缺少轻链和重链 CH1, 只含有重链 CH2、CH3 和可变区. HCAb 的抗原结合部分仅由重链可变区构成, 称为纳米抗体(VHH 或 Nb), 尺寸大约是传统抗体(Ab)的 1/10(Nbs: 15 ku;

Abs: 150 ku). VHH 主要依靠 3 个区域与抗原分子结合, 称为互补决定区(CDR1、CDR2、CDR3), 也称之为高变区(HV1、HV2、HV3), 其氨基酸序列具有很强的突变性. 高变区之间区域的氨基酸序列变化较小, 称为骨架区(FR1、FR2、FR3、FR4), 骆驼 VHH 骨架区序列与人 VH 相比同源性超过 80%^[8].

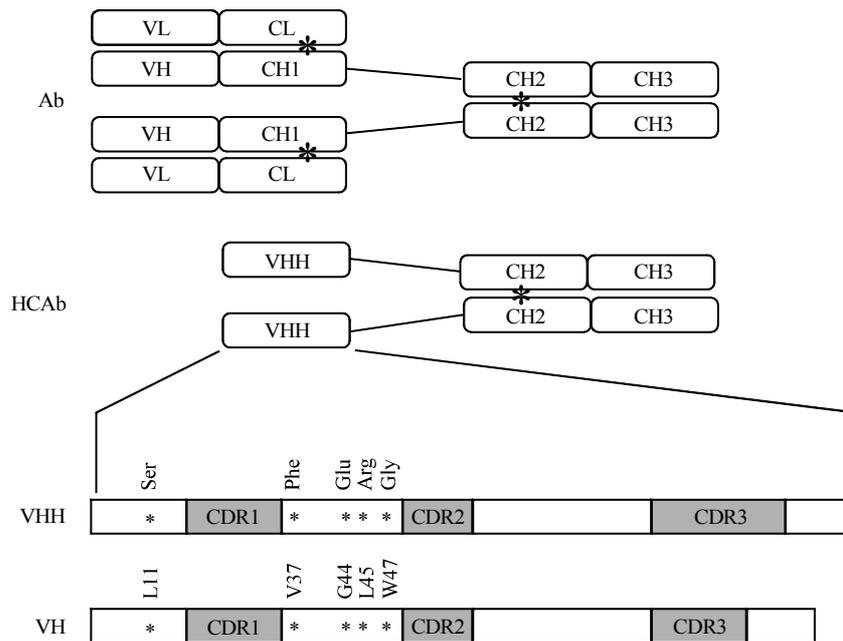


Fig. 1 Schematic representation of the conventional antibody (Ab), heavy-chain only antibody (HCAb), variable domain of the heavy chain of HCAb (VHH), and variable domain of the heavy chain of Ab (VH)

图 1 传统抗体、单链抗体及其重链可变区简略结构对比示意图

VHH 及 VH 框架图中的白色代表蛋白质结构的框架区域, 灰色代表绑定互补区域. 传统抗体中 CL-CH1 间星号及仅单链抗体中 CH2-CH2 间星号表示二硫键.

1.1 VH 和 VHH 的结构差异

1.1.1 骨架区保守序列差异

在传统 IgG 重链可变区结构中的 Gly44、Leu45 和 Trp47 这 3 个位点位于 VH 和 VL 的交界处, 形成疏水界面, 有助于 VH 和 VL 连接. 但 VHH 缺少相应的 VL 导致上述位点暴露在溶剂中, 1994 年, Davies 和 Riechmann^[9]实验结果显示如果没有 VL 的存在, 溶液中 VH 蛋白质浓度超过 1 g/L 时会发生聚集沉淀. 而当骆驼源化该区域(Gly44Glu-Leu45Arg(或 Leu45Cys)-Trp47Gly)后蛋白质聚集程度显著降低, 说明这些位点处于蛋白质表面, 改为亲水性残基可增加 VH 溶解度. 此外, 在单峰驼 VHH-FR2 区域中 Leu11 被替代成 Ser11. 传统 VH

中 Leu11 位于抗原结合表位, 会与重链 CH1 区间接触, 是 VH 和 CH1 间球窝式结构的一部分, 有利于抗体的肘部运动. 但 VHH 中没有 CH1 结构, Leu11 没有存在的必要, 替代为亲水性氨基酸 Ser11 对于溶解度的提高具有重大意义.

1.1.2 互补决定区结构差别

除了上面提到的骨架区保守氨基酸差异, VHH 与 VH 在高变区(hypervariable, HV)的显著差异主要体现在残基数量及区域结构的不同. 首先, VHH-HV1 的残基数扩大到 27~35, 增加的残基 27~30 构成新的 β 转角, 对 VHH 的溶解度提升有一定的帮助. 此外, 溶解酵素和核糖核酸酶 A 的 VHH 晶体结构显示 HV1 长度的增加不仅会对其环

结构产生一定的影响还能提高 VHH 绑定抗原的能力^[10]。其次, 研究结果显示, 部分骆驼 HV2 区间存在与人、鼠相似的发卡结构, 而其他 HV2 的氨基酸残基数增加, 表现出特殊构象, 形成多个 β 转角^[11-12]。VHH 与 VH 最显著、最重要的差异在于 HV3。虽然不同长度的 VHH-HV3 都有发现, 单峰驼中长度为 16~18 个氨基酸, 频率最高, 明显长于人和鼠中 VH-HV3 的平均长度。更长的 HV3 区域扩大了抗原结合位点的实际表面, 弥补了先天缺失的 VL 所能提供的抗原结合表面, 使得 VHH-CDR 部分可进入抗原活性中心识别 VH 无法识别的位点。通常蛋白质内部氨基酸多为脂溶性, 由此可解释为何骆驼的 VHH-HV 中脂溶性氨基酸 Ala、Ile、Leu 和 Val 多于鼠的 VH-HV(图 2c 针对碳酸酐酶 VHH 的 CDR3 表面静电分布显示为中性)^[12]。

1.2 VHH 的结构功能特性

图 2a 为抗 SLC26 转运蛋白 VHH 与抗钾离子

通道蛋白 Fab 的 VH 部分三级结构比较, 图 2b 和图 2c 分别为 2 抗体蛋白表面静电图^[13-14]。由图可见, VHH 和 VH 蛋白的三级结构大体相同, 都由 2 组反向平行 β 折叠片层形成类桶装结构(高度为 4~5 nm, 直径为 2~3 nm), 与抗原结合的 3 个 CDR 区间位于同一侧, 靠近氮端。但两者表面静电分布却有明显差别, VH 表面极性残基比较集中(如 CDR3 区), 在 FR2 区间($\beta 3$ - $\beta 4$ 折叠)的几个保守氨基酸为疏水性, 表面静电势显中性; 而相对应的 VHH 表面静电图显示亲水性残基较分散。由此可以阐明单独表达 VH 结构域时蛋白易聚合形成包涵体, 而 VHH 的溶解度高、稳定性好的原因。VHH 作为最小抗原绑定单位, 其分子质量约为常规抗体的 1/10, 结构简单, 因此具备较好的组织穿透能力以到达肿瘤病灶, 而过多的 VHH 能较快由肾脏清除体外, 同时, VHH 具有对人体的免疫原性较弱的优势。

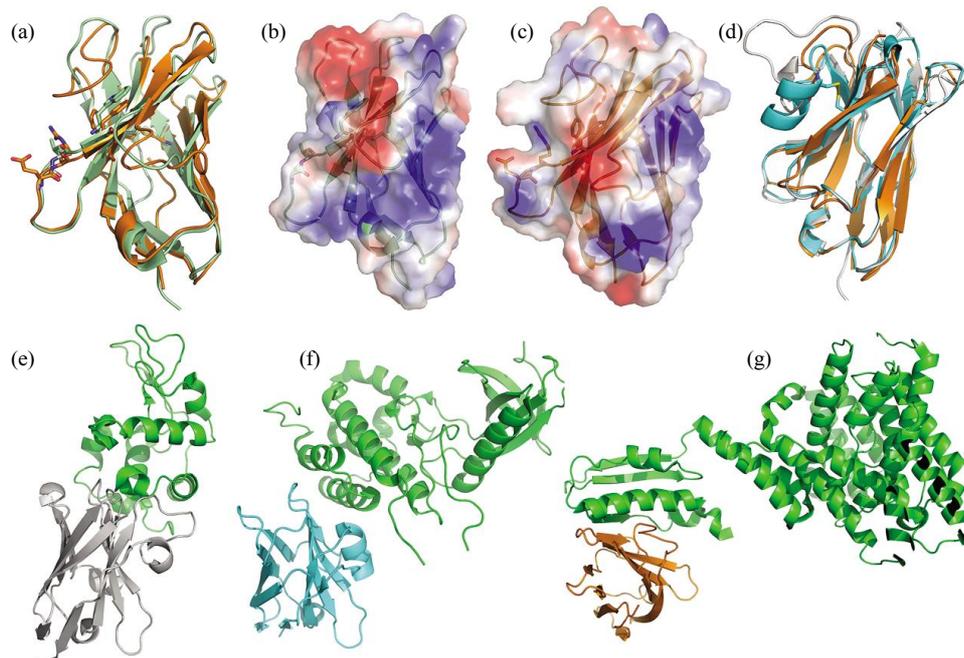


Fig. 2 Cartoon illustrations and electrostatics plots of selected VHH and VH crystal structures

图 2 Fab 抗体 VH 蛋白和 VHH 蛋白三级结构及两者结构比较

Fab 抗体 VH 部分(浅绿色, 1R3J)和 VHH 蛋白三级结构比较(橙色, 5DA0) (a)。Fab 抗体 VH 部分结构及其表面静电分布(蓝色为正电荷分布, 红色为负电荷分布) (b)。VHH 结构及其表面静电分布(c)。针对不同抗原的 3 种 VHH 蛋白三级结构比较(d)。VHH-lysozyme (灰色, 4I0C) (e)。VHH-GAK(青色, 4Y8D) (f)以及 VHH-SLC26(橙色, 5DA0) (g)蛋白与各自抗原(溶菌酶、细胞周期蛋白 G 相关激酶、SLC26 转运蛋白)的晶体结构模型。

图 2d 为针对不同抗原的 3 种 VHH 结构比较, 图 2e、2f、2g 分别为抗溶菌酶、抗细胞周期蛋白 G 相关激酶及抗 SLC26 转运蛋白的 VHH 及其相对

应的抗原构图(其中抗原显示为绿色)。由图 2 可见, VHH 结构最大差异在于高变区间的残基数量以及结构不同, 例如抗溶菌酶的 VHH 通过 CDR2、

CDR3 都参与抗原绑定且 CDR2 环伸入溶菌酶结构空腔(图 2e)^[15], 而抗 SLC26 的 VHH 与抗原结合方式除了由 16 个残基组成的 VHH-CDR3 环形成一个大的无定形卷曲部分与抗原表面结合外, 还存在 CDR2 和部分 FR2 区间与抗原平行绑定(图 2g). 相较于传统抗体, VHH 高变区间结构更为灵活、构型更多, 可识别抗原的不同构型及不同表位, 具有更广泛的抗原结合方式. 此外, 抗细胞周期蛋白 G 相关激酶的 VHH 在结构上除了保留与 VH 相似的二硫键(Cys22-Cys93)外, 同时在 FR2 和 CDR3 之间新增了一个二硫键(Cys47-Cys99), 并且 CDR3 区间因增加一个 α 螺旋而表现出新的环构型(图 2f), 由此稳定并束缚该纳米抗体的抗原绑定区结构^[16-17].

2 纳米抗体来源及纳米抗体库构建

单链抗体最先在骆驼科动物体内发现, 主要由免疫单峰驼和羊驼等骆驼科动物获得. 免疫过程为期 5~6 周, 第 1 周注射与完全佐剂混合的抗原, 接下来每周注射 1 次等体积混合不完全佐剂的抗原以刺激骆驼产生抗原特异性的、高亲和性的抗体. 此外, 还可以通过一次使用多种抗原免疫骆驼来减少成本, 提高制备效率. 最终免疫的效果往往由抗原性质决定, 相较于非极性半抗原, 体积较大的抗原能够引起更强的免疫反应^[5, 10, 18].

2.1 VHH 的制备

2.1.1 血浆中提取

单峰驼血清中 IgG 的总量约为 5~10 g/L, 其中 IgG1 为传统抗体, IgG2 和 IgG3 为单链抗体. IgG1 和 IgG3 通过亲和吸附绑定于蛋白 G 亲和色谱柱(IgG2 不与蛋白 G 亲和柱绑定), 而后用 150 mmol/L NaCl, 0.58% 醋酸(pH 4.5)的缓冲液淋洗分离出 IgG3, 第一步中的洗脱液再次通过蛋白 G 亲和色谱柱以确保吸附其中剩余的少量 IgG1 和 IgG3. 收集仅含 IgG2 的流出液, 采用蛋白 A 亲和色谱柱分离纯化^[19]. 纯化后的 IgG2 和 IgG3 通过蛋白酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶等)酶解其 VHH 和 CH2 之间的铰链, 再用蛋白 A 凝胶过滤亲和色谱绑定酶解所得的 CH 部分, 而 VHH 随着淋洗液流出, 达到分离纯化目的, 即从血清中纯化得到 VHH^[10].

2.1.2 VHH 重组及库的筛选

免疫建库法主要包括免疫骆驼、提取 VHH 基因、建立特异性纳米抗体库以及运用噬菌体展示技术对库进行筛选 4 大步骤(图 3). 首先, 从已免疫

的单峰驼中抽取 20~30 ml 外周血, 获取效应 B 细胞并从中提取总 RNA, 运用逆转录 PCR 技术获取 cDNA. 由于 VHH 片段 PCR 扩增过程中可能引入 VH 基因, 直接影响到纳米抗体库的构建筛选^[18], 故需设计合适引物以扩增高纯度 VHH 片段. 利用抗体不同的同型, 如 IgG1 与 IgG2、IgG3 的铰链存在较大差异的特点, van der Linden 等^[20]设计一套引物可扩增出所有种类骆驼的 VHH 部分, 而 Maass 等^[21]设计了仅针对羊驼的 VHH 区间的引物. 另一种 VHH 片段扩增方法利用了 VHH 与 VH 基因差异性(图 1)以及所有的 VHH 基因具有相同的外显子和同源序列的特性. 采用巢式 PCR 技术, 先用一对引物将 VHH 至 CH2 以及 VH 至 CH2 之间的片段扩增, 得到不含有 CH1 或含 CH1 两种不同长度的 DNA 片段, 通过琼脂糖凝胶电泳可以将不含 CH1 的 HCAb 重链部分分离出来(约 600 bp), 接下来利用一对含限制性内切酶位点的巢式引物, 将针对性扩增 VHH 片段. 该方法可用于单峰驼、无峰驼、双峰驼以及羊驼 IgG3 中 VHH 片段的扩增^[22]. 将 PCR 扩增所得 VHH 基因转入特定的表达载体中, 便得到了包含完整抗原绑定区域的 VHH 库. 相较于传统抗体建库, VHH 库的建立过程更加简单, 所需的库容量也更小, 约 $10^6 \sim 10^7$ 个克隆(传统抗体至少需要 10^{10} 个克隆)^[10].

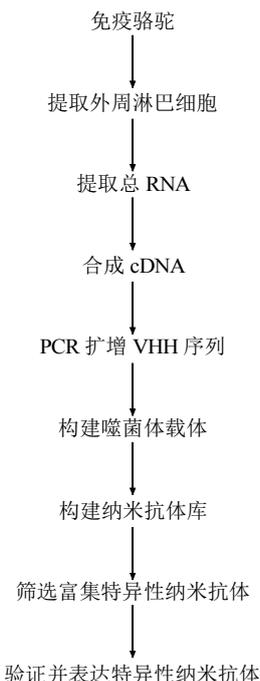


Fig. 3 Framework for the generation of VHHs

图 3 VHH 制备流程

目前 VHH 库的筛选方法除了利用酶联免疫法对细胞表达产物进行筛选外, 通过选用线性噬菌体(包括 M13、f1、Fd、f10 等株型^[23]) 进行噬菌体展示以筛选阳性克隆的方法更为常用^[24]. 该方法首先用辅助噬菌体超感染大肠杆菌 VHH 库建立噬菌体展示库, 在大肠杆菌中扩大培养后分离得到在衣壳蛋白上展示 VHH 蛋白的噬菌体. 接下来用固定的抗原对噬菌体进行筛选, 洗去未与抗原绑定的噬菌体, 而与抗原绑定的噬菌体通过低 pH 和高浓度尿素洗脱, 中和后重新感染细菌. 该筛选操作过程可以进行多次循环(一般为 2~3 次)以获得高亲和和特异性 VHH. 通过基因工程将 VHH 克隆至表达载体, 表达纯化后得到可溶性 VHH 蛋白. 从免疫的动物中获得血样到最终得到高亲和的抗原特异性 VHH 抗体整套操作作用时仅 3 个月不到, 与传统单克隆抗体的制备、筛选过程相比更加简便高效.

2.1.3 人工合成 VHH 库的构建

对于毒性太强、不具免疫原性、提取量不足而不能产生免疫反应的抗原, 是无法通过传统免疫法制备抗体. 而利用简并密码子 NNK(随机改变库的寡核氨酸)增加 VHH 中 CDR3 核苷酸多样性, 并通过重叠延伸 PCR 技术, 重组、扩增目的基因, 可构建针对上述特殊抗原的 VHH 库^[25-28].

3 纳米抗体技术在疾病诊断与治疗中的应用

利用纳米抗体对抗原的特异性和高亲和性, 在疾病诊断中, 纳米抗体技术多采用酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)进行检测. 在基本的酶联免疫法中, 聚苯乙烯和聚氯乙烯常作为固相载体用于抗原的固相化, 该类载体对蛋白质有较强的吸附能力, 并能保留抗原原有的免

疫学活性. 由于抗原通过疏水基团间非特异性的物理吸附被固定在载体上, 为避免干扰物质的再吸附, 常用高浓度牛血清蛋白和脱脂奶粉作为封闭溶液填充载体空隙, 并用洗涤液洗涤去除杂质和未结合蛋白. 选用高效灵敏的酶(如: HRP 和葡萄糖氧化酶)和高纯度的抗体制备酶标抗体, 不仅保留了抗体的免疫活性, 同时具备酶的高效催化能力. 加入酶标抗体进行反应稳定后, 用洗涤液洗涤, 最后加入酶底物进行检测. 常用的 HRP 显色底物是以四甲基联苯胺(TMB)为氢供体、双氧水为氢受体, 二者按一定比例混合后作为 TMB 工作液, 用硫酸终止酶催化后, 底物从蓝色变成黄色, 可在最适吸收波长 450 nm 处定量分析.

除了上述提及的酶联免疫基本构建方法, 实际使用中较为广泛的是双抗体夹心法, 对应纳米抗体的“三明治”结构(即 Nb I - 抗原 - Nb II 形式), 此结构包含了两种能和抗原不同表位结合的纳米抗体. 纳米抗体“三明治”结构已用于多种疾病的诊断(表 1). 将 Nb I 固定于载体上(用于捕获待测抗原)的方式存在以下两种: a. 磁珠纳米颗粒键合, 即将金属氧化物的纳米颗粒和磁性颗粒结合, 利用共价键键合绑定 Nb I^[29]; b. 生物酰化处理, 即融合表达 Nb I 与生物酰素, 利用生物酰素与链霉亲和素的结合能力间接绑定 Nb I^[25].

针对 Nb I 捕获的抗原, 通过加入 Nb II 用于间接检测抗原的浓度. 其中对于 Nb II 浓度的检测方法多样, 较为常见和简易的方法为酶标法^[26-27, 30]. 除此之外, 可利用具有较高灵敏度的纳米金属或是金属氧化物与 Nb II 的绑定^[31-32], 检测 Nb II 上标记物反应前后的电化学性质变化进而计算出 Nb II 的浓度. Li^[33]报道了还可采用光敏平板, 配合金属氧

Table 1 Examples of diagnostic applications of nanobodies

表 1 纳米抗体在疾病诊断中的应用

疾病	抗原	检测标记物	检测手段	检测限	参考文献
H5N1 流感	H5N1	HRP	ELISA	14.1 μg/L	[29]
H3N2 流感	H3N2	HRP	ELISA	50 μg/L	[25]
人类营养状况	人类前清蛋白	HRP	ELISA	0.01 μg/L	[26]
细菌感染	人类原降钙素	HRP	ELISA	10 μg/L	[27]
肿瘤细胞的缺氧状况	碳酸酐酶 X	HRP	ELISA	NR*	[30]
心血管疾病	载脂蛋白 -A1	Ag NPs	ECL	0.02 ng/L	[31]
细菌感染	人类原降钙素	Cd@TeSiO ₂	ECL	1 μg/L	[32]
急性肾功能衰竭	中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白	Biotinylated Nb	PCE	0.6 ng/L	[33]

HRP: 辣根过氧化物酶; Ag NPs: 纳米银颗粒; Biotinylated Nb: 生物酰化纳米抗体; ELISA: 酶联免疫; ECL: 电化学发光; PCE: 光电化学; NR: 未报道.

化物修饰的 Nb II, 检测反应前后在光照下呈现出的不同电信号, 依次检测即可计算出相应的 Nb II 浓度.

3.1 纳米抗体在肿瘤诊断中的应用

表皮生长因子接受子(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种跨膜糖蛋白, 可促进细胞增殖, 抑制细胞的程序性凋亡, 使癌细胞具攻击性, 更容易发生转移, 过量表达于乳腺癌、脑癌等实体肿瘤中. 研究表明, 作为 EGFR 家族代表之一的 HER2 在 20%~30%的乳腺癌、4%~6%的非小细胞肺癌、20%~24%的胃癌以及结肠癌和卵巢癌中都会过度表达^[34]. 因此 EGFR 家族蛋白常作为抗癌研究的靶标热点. 目前, 临床上采用以放射性元素或其他方法标记的单克隆抗体作为显像剂的分子显像技术确定病人体内肿瘤分布情况. 但单克隆抗体在血液中的保留时间过长, 导致检测背景值过高, 显像效果不理想. 而针对肿瘤的特异性纳米抗体可以更好地渗入癌变组织, 识别传统抗体无法靶向的活性位点, 是理想的显像剂载体^[35].

近红外(near-infrared, NIR)波长范围(650~800 nm)内的光被人体组织吸收的较少, 穿透性较好, 且其非特异性背景信号较低, 故可作为癌症检测的重要显像手段. van Driel 等^[35]使用 NIR 荧光 -FLARE 显像系统进行小鼠体内口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)的显像研究. 耦合了荧光团 IRDye800-CW 的纳米抗体可以特异性靶向并绑定 OSCC 中过量表达的 EGFR, 能清晰地显示 OSCC 及颈部淋巴结的转移情况, 在临床上有着十分可观的应用前景.

超声分子成像技术采用特异性抗体标记的显像分子探针, 通过超声检测显像剂在目标部位的聚集情况, 获得分子或活细胞层面上的影像. 肿瘤中新生血管的最大孔径为 380~700 nm, 而广泛使用的超声显像剂直径为 1~10 μm , 难以到达肿瘤部位. Fan 等^[36]研究结果显示, 通过将生物素标记的抗前列腺特异性膜 (prostate-specific membrane antigen, PSMA)的纳米抗体与超声纳米泡耦合方法, 可构建能高效绑定小鼠体内前列腺癌细胞的超声显像分子(平均直径为 487.60 ± 33.55 nm).

赫赛汀(曲妥珠单抗)是治疗乳腺癌的首个分子靶向药物, 主要针对 HER2 阳性的癌症病人, 但对 HER2 表达较少或表达多样化的病人治疗效果较差, 且其价格昂贵, 长期使用会使患者产生耐药性, 用曲妥珠单抗治疗前需准确测定患者体内

HER2 表达情况. Pruszyński^[34]研究表明, 放射性碘化试剂 SGMIB 标记针对 HER2 的 Nb(5F7GGC)为显像剂(5F7GGC-125/131I-SGMIB)注入异种移植小鼠, 肿瘤吸收 2 h 达到峰值, 且肿瘤与正常组织吸收比值可达到 50:1, 能准确反应癌症中 HER2 表达情况. 此外, 由于纳米抗体能更快地被正常组织清除, 可与半衰期较短的放射性核素 ⁶⁸Ga、¹⁸F 或 ²¹¹At 结合, 用于分子显像或靶向治疗^[37].

3.2 纳米抗体在肿瘤治疗中的应用

化学药物疗法是临床上常用的肿瘤治疗方法之一, 烷化剂、抗代谢药物、抗癌抗生素等化疗药物在体内杀伤肿瘤细胞的同时, 也会对正常细胞产生非特异性毒性. 用于治疗结肠癌和直肠癌的第三代铂类抗癌药物奥沙利铂在体内有 50%与红细胞结合, 从而造成一定的周围神经毒性. 相较于“裸药”, 纳米抗体与高分子液泡/脂质体耦合的药物载体可以提高药物溶解度、稳定性; 利用纳米抗体靶向传递药物; 通过改变高分子液泡/脂质体的双亲结构达到控制药物释放的目的^[38]. der Meel 等^[39]报道了将类胰岛素生长因子 1 接受子(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)抑制剂(AG538)封闭在脂质体内, 并将其与抗 EGFR 的 Nb(EGa1)耦合形成 EGa1-AG538-liposomes 结合物. 研究结果显示, 该药物载体可达到同时阻遏 EGFR 和活化 IGF-1R 的双重效果, 有效抑制肿瘤细胞扩散, 是治疗由 EGFR 和 IGF-1R 过度表达引起肿瘤的理想药物.

放射性免疫治疗(RIT)在癌症治疗中应用广泛, 当采用传统单克隆抗体 mAb 作为放射性元素载体时, 因其大分子量造成药物在肿瘤区间分布、吸收缓慢并对肿瘤的渗透性不理想, 而降低了 RIT 效率. D'Huyvetter^[40]报道 ¹⁷⁷Lu 标记的抗 HER2 的纳米抗体可有效抑制小鼠体内过量表达 HER2 肿瘤的增长, 且不会非特异性辐射健康组织, 同时组织病理学数据显示其对肾脏无毒性, 证明该放射源标记的纳米抗体可用于放射性靶向治疗.

光动力疗法(PDT)因其创伤小、选择性强、适用性范围广等优点在肿瘤治疗中有良好应用. PDT 是指将光敏剂(PS)静脉注射到病人体内, 经光照活化后的 PS 使体内 O₂ 形成活性氧物质, 穿透肿瘤细胞线粒体膜或核膜, 造成 DNA 和蛋白质的损伤. 但是疏水性的 PS 分子在体内容易聚集, 并具有脱靶毒性, 从而破坏正常细胞. Heukers^[41]通过筛选纯化出高特异性针对 EGFR 的 Nb, 并以此构建

Nb-PS 偶联物, 使 PS 能更快更均匀地分布在肿瘤内, 从而能快速高效地靶向杀死肿瘤细胞, 在肿瘤治疗中有十分广阔的应用前景.

Nb 不仅是抗癌药物载体的重要组成部分, 也可直接作为药物治疗肿瘤. Farajpour^[42]通过噬菌体建库、筛选、纯化得到针对人体血管内皮生长因子(VEGF)的 Nb. 体外细胞实验显示, 不同于传统单抗以空间位阻的方式阻碍 VEGF 与接受子结合的方式, Nb 可靶向单抗无法识别的活性位点, 即 VEGF 与接受子的结合位点, 进而抑制 VEGF 引导的内皮细胞增生.

3.3 纳米抗体在非洲锥虫病诊断治疗中的应用

人类非洲锥虫病(human African trypanosomiasis, HAT)是一种通过采采蝇的叮咬传播, 由布氏锥虫引起的慢性感染病, 导致 36 个非洲国家超过 6000 万人口受到威胁. 现在该病的诊断主要是采用间接酶联法或间接荧光法检测血清中的抗体, 这种方式无法区分被测对象处于新近感染或已治愈中的哪种情形. 相比之下, 以抗原为对象进行检测准确度更高. 然而, 锥形虫拥有庞大的编码可变表面糖蛋白(variant surface glycoprotein, VSG)的基因组, 可激活不同 VSG 基因产生不断变化的糖蛋白以躲避宿主免疫系统, 增加了以 VSG 作为抗原检测锥虫病的难度.

Obishakin^[43]的研究表明, 非洲锥虫病的致病原锥形虫的鞭毛杆蛋白(paraflagellar rod protein, PFR)可以成为诊断该病的有效抗原. 实验采用 T. Evansi STIB 以及 4 种不同 T. Evansi 伊式锥虫混

合裂解液免疫骆驼, 并构建特异性 Nb 库. 经纯化、筛选得到的 Nb392 用荧光染料 ALEXA 标记, 通过免疫荧光检测方法以及 RNAi 技术确认 Nb392 可以特异性结合鞭毛蛋白 PFR1. Caljon 等^[44]用采采蝇唾腺膜蛋白膜提取物免疫骆驼, 构建特异性纳米抗体库. 经筛选得到的 TsalNb5 和 TsalNb11 与辣根过氧化物酶(HRP)耦合, 用于竞争性免疫分析. 结果显示 TsalNb5 以及 TsalNb11 能够特异性识别采采蝇, 而不与厩螫蝇、马蝇等其他品种发生交叉反应. 上述方法不仅可对采采蝇唾液蛋白进行微量检测, 也可作为非洲锥虫病病原体通过载体传播过程的风险指标, 有利于对该病传播途径的干预和控制.

纳米抗体除用于非洲锥虫病的检测外, 也可作为药物载体靶向特定位点从而在该病的治疗中发挥重要作用. 由于锥形虫具有上述不断改变 VSG 的特性, 针对该病的疫苗难以制成, 故控制非洲锥虫病只能通过化学治疗得以实现. 但是, 用以治疗该病的药物种类少且副作用大, 仅有 5 种药物在临床上被使用, 戊烷脒(pentamidine)是其中之一. 其主要用于冈比亚布氏锥虫引起的 HAT 第一阶段的治疗. Arias 等^[45-46]构建了 Nb-pentamidine-PLGA 药物载体复合物, 该纳米颗粒利用 NbAn33 靶向锥形虫表面相对保守的糖磷脂酰肌醇(GPI)免疫表位, 以及聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)包裹戊烷脒, 通过锥形虫表面鞭毛口袋的胞吞作用摄入药物从而起到治疗作用, 大大增加了戊烷脒的药效.

Table 2 Examples of nanobody-based delivery systems

表 2 纳米抗体载体系统的应用

疾病	目标抗原	添加融合剂	参考文献
人类非洲锥虫病	PFR	ALEXA Fluor 488	[43]
人类非洲锥虫病	Saliva of Glossina	HRP	[44]
人类非洲锥虫病	GPI	PLGA-PEG-Pentamidine	[45]
口腔鳞状细胞癌	EGFR	IRDye800CW	[35]
前列腺癌	PSMA	Nanobubbles	[36, 47]
乳腺癌	HER2	[¹³¹ I]-IB-Mal-D-GEER	[37]
乳腺癌	HER2	*I-SGMIB	[34]
卵巢癌	HER2	¹⁷⁷ Lu	[40]
头颈部鳞状细胞癌	EGFR	Liposomes loaded with AG538	[39]
头颈部鳞状细胞癌	EGFR	PS	[41]

PFR: 鞭毛杆蛋白; Saliva of Glossina: 采采蝇唾腺膜蛋白膜提取物; GPI: 糖磷脂酰肌醇; EGFR: 跨膜糖蛋白; PSMA: 抗前列腺特异性膜; HER2: 人类表皮生长因子受体 2.

4 纳米抗体技术应用展望

从 1993 年报道首个在骆驼体内天然存在的单链抗体的发现以来, 重链可变区(又称纳米抗体)由于具有分子质量小、结构稳定、溶解度高、对抗原的高亲和力以及能在微生物中高量表达等特性, 结合噬菌体展示技术, 日渐成熟的纳米抗体技术已被广泛应用于酶联免疫、生物传感器检测等研究领域。目前纳米抗体技术主要用于疾病的体外诊断, 但已有纳米抗体药物处在临床二期实验的相关报道^[48-49], 如 Ablynx 公司研制的 ALX-0061 通过与 IL-6(促炎细胞因子)特异性结合从而完全抑制由 IL-6 引起的风湿性关节炎炎症。随着纳米抗体在分子显像剂、药物载体等方面的发展, 我们有理由相信纳米抗体技术将会在人类癌症等疾病的临床诊断和治疗中发挥越来越重要的作用。此外, 纳米抗体还可作为研究工具用于: a. 与固相载体相连用于捕获目标蛋白辅助蛋白质的分离纯化^[5]; b. 以共结晶方式获得常规方法无法得到的难溶蛋白质晶体^[22]; c. 进入细胞核内与转录因子结合从而驱动 DNA 的转录^[50]。纳米抗体可以构建成双价(针对同一抗原)或双特异性(针对不同抗原)抗体^[51], 这将提供一种即插即用的检测手段, 有利于纳米抗体技术广泛地应用于疾病的临床快速诊断。

参 考 文 献

- [1] Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging?. *Theranostics*, 2014, **4**(4): 386-398
- [2] Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, *et al.* Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, **10** (1): 161-174
- [3] D'Huyvetter M, Xavier C, Caveliers V, *et al.* Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin Drug Del*, 2014, **11**(12): 1939-1954
- [4] Siontorou CG. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine*, 2013, **8**(1): 4215-4227
- [5] De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol*, 2014, **32**(5): 263-270
- [6] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, **256**(5517): 495-497
- [7] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, **363**(6428): 446-448
- [8] Harmsen M M, De Haard H J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **77**(1): 13-22
- [9] Davies J, Riechmann L. 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *Febs Lett*, 1994, **339**(3): 285-290
- [10] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol*, 2001, **74**(4): 277-302
- [11] Chothia C, Lesk A M, Gherardi E, *et al.* Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol*, 1992, **227**(3): 799-817
- [12] Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, *et al.* Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng*, 1994, **7** (9): 1129-1135
- [13] Zhou Y F, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol*, 2003, **333**(5): 965-975
- [14] Gorbunov D, Sturlese M, Nies F, *et al.* Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters. *Nat Commun*, 2014, **5**(4): 3622-3622
- [15] De Genst E, Chan P H, 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] Nguyen V K, Hamers R, Wyns L, *et al.* Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*, 2000, **19**(5): 921-930
- [17] Kovackova S, Chang L, Bekerman E, *et al.* Selective inhibitors of cyclin G associated kinase (GAK) as anti-hepatitis C agents. *J Med Chem*, 2015, **58**(8): 3393-3410
- [18] Davies J, Riechmann L. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology (N Y)*, 1995, **13**(5): 475-479
- [19] Twair A, Al-Okla S, Zarkawi M, *et al.* Characterization of camel nanobodies specific for superfolder GFP fusion proteins. *Mol Biol Rep*, 2014, **41**(10): 6887-6898
- [20] van der Linden R, de Geus B, Stok W, *et al.* Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods*, 2000, **240**(1-2): 185-195
- [21] Maass D R, Sepulveda J, Pernthaner A, *et al.* Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods*, 2007, **324**(1-2): 13-25
- [22] Pardon E, Laeremans T, Triest S, *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc*, 2014, **9**(3): 674-693
- [23] Arap MA. Phage display technology - Applications and innovations. *Genet Mol Biol*, 2005, **28**(1): 1-9
- [24] 杜东霞, 张 冉. 辅助噬菌体在噬菌体展示中的应用及研究进展. *微生物学通报*. 2009, **36**(2): 261-266
- [25] Du D X, Zhang R. *Microbiology*, 2009, **36**(2): 261-266
- [26] Zhu M, Hu Y, Li G, *et al.* Combining magnetic nanoparticle with biotinylated nanobodies for rapid and sensitive detection of influenza H3N2. *Nanoscale Res Lett*, 2014, **9**(1): 528
- [26] Ma L, Sun Y, Kang X, *et al.* Development of nanobody-based flow

- injection chemiluminescence immunoassay for sensitive detection of human prealbumin. *Biosens Bioelectron*, 2014, **61**(6): 165–171
- [27] Yan J, Wang P, Zhu M, *et al.* Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naive Nanobody phage display library. *J Nanobiotechnology*, 2015, **13**(1): 33
- [28] Yan J, Li G, Hu Y, *et al.* Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med*, 2014, **12**(1): 343
- [29] Zhu M, Gong X, Hu Y, *et al.* Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *J Transl Med*, 2014, **12**(1): 352
- [30] Araste F, Ebrahimizadeh W, Rasooli I, *et al.* A novel VHH nanobody against the active site (the CA domain) of tumor-associated, carbonic anhydrase isoform IX and its usefulness for cancer diagnosis. *Biotechnol Lett*, 2014, **36**(1): 21–28
- [31] Wang H, Li G, Zhang Y, *et al.* Nanobody-based electrochemical immunoassay for ultrasensitive determination of apolipoprotein-A1 using silver nanoparticles loaded nanohydroxyapatite as label. *Anal Chem*, 2015, **87**(22): 11209–11214
- [32] Li H, Sun Y, Elseviers J, *et al.* A nanobody-based electrochemiluminescent immunosensor for sensitive detection of human procalcitonin. *Analyst*, 2014, **139**(15): 3718–3721
- [33] Li H, Mu Y, Yan J, *et al.* Label-free photoelectrochemical immunosensor for neutrophil gelatinase-associated lipocalin based on the use of nanobodies. *Anal Chem*, 2015, **87**(3): 2007–2015
- [34] Pruszyński M, Koumariou E, Vaidyanathan G, *et al.* Improved tumor targeting of anti-HER2 nanobody through N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate radiolabeling. *J Nucl Med*, 2014, **55**(4): 650–656
- [35] van Driel PB, van der Vorst JR, Verbeek FP, *et al.* Intraoperative fluorescence delineation of head and neck cancer with a fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Int J Cancer*, 2014, **134**(11): 2663–2673
- [36] Fan X, Wang L, Guo Y, *et al.* Ultrasonic nanobubbles carrying anti-PSMA nanobody: construction and application in prostate cancer-targeted imaging. *PLoS One*, 2015, **10**(6): e0127419
- [37] Pruszyński M, Koumariou E, Vaidyanathan G, *et al.* Targeting breast carcinoma with radioiodinated anti-HER2 Nanobody. *Nucl Med Biol*, 2013, **40**(1): 52–59
- [38] Zou T, Dembele F, Beugnet A, *et al.* Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *J Biotechnol*, 2015, **214**(20): 147–155
- [39] van der Meel R, Oliveira S, Altintas I, *et al.* Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment. *J Control Release*, 2012, **159**(2): 281–289
- [40] D'Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, *et al.* Targeted radionuclide therapy with A Lu-177-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*, 2014, **4**(7): 708–720
- [41] Heukers R, van Bergen en Henegouwen P M, Oliveira S. Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. *Nanomedicine*, 2014, **10**(7): 1441–1451
- [42] Farajpour Z, Rahbarizadeh F, Kazemi B, *et al.* A nanobody directed to a functional epitope on VEGF, as a novel strategy for cancer treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **446**(1): 132–136
- [43] Obishakin E, Stijlemans B, Santi-Rocca J, *et al.* Generation of a nanobody targeting the paraflagellar rod protein of trypanosomes. *PLoS One*, 2014, **9**(12): e115893
- [44] Caljon G, Hussain S, Vermeiren L, *et al.* Description of a nanobody-based competitive immunoassay to detect tsetse fly exposure. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, **9**(2): e0003456
- [45] Arias J L, Unciti-Broceta J D, Maceira J, *et al.* Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. *Journal of Controlled Release*, 2015, **197**(197): 190–198
- [46] Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, *et al.* Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies - African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem*, 2004, **279**(2): 1256–1261
- [47] Yin T, Wang P, Zheng R, *et al.* Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors. *Int J Nanomedicine*, 2012, **7**(2): 895–904
- [48] Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, *et al.* The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody (R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2015, **17**(1): 135
- [49] Momi S, Tantucci M, Van Roy M, *et al.* Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs. *Blood*, 2013, **121**(25): 5088–5097
- [50] Nguyen-Duc T, Peeters E, Muyldermans S, *et al.* Nanobody(R)-based chromatin immunoprecipitation/micro-array analysis for genome-wide identification of transcription factor DNA binding sites. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(5): e59
- [51] Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, *et al.* Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem*, 2001, **276**(10): 7346–7350

Current Status of Nanobody Technology: Applications in Disease Diagnosis and Therapy*

ZHOU Tao-Ran, ZHAN Shou-Bin, ZHAI Fei, WANG Yang**, YI Jun**

(Department of Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract Monoclonal antibody (mAb) technology has become a powerful tool in the field of tumor-targeted diagnosis and therapy due to its antigen-binding specificity and capacity. However, the drawbacks of mAbs include weak tumor penetration, poor solubility and long retention time *in vivo*, thus limiting its clinical applications. Recently, single domain antigen-binding fragments known as “nanobodies” or as VHH were cloned from the naturally occurring heavy-chain-only antibodies in Camelid. The beneficial features such as small size, high solubility and stability, robust specificity, and good expression in microorganisms enable the nanobody technology to be used in a broad range of applications in fundamental research, biotechnology, disease diagnosis and therapy. In this review, we outline the current status of nanobody research including 1) the similarities and differences of nanobodies compared with conventional antibody fragments, 2) the framework of VHH production from camel immunization, VHH repertoire construction, VHH biopanning, and purification of recombinant VHH, and 3) the competitive advantages of nanobody-based delivery systems in molecular imaging and tumor-targeted cancer treatment over the conventional antibody usage.

Key words heavy chain antibody (HCAb), nanobody (Nb), VHH repertoire construction, immunodiagnostics and immunotherapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0181

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21271104, 21671103, 31300111).

**Corresponding author. Tel: 86-25-84303273

YI Jun. E-mail: yijun@njust.edu.cn

WANG Yang. E-mail: wangyang@njust.edu.cn

Received: May 26, 2016 Accepted: September 4, 2016