

纳米抗体偶联药物的研究进展

张雪嫣, 周柏松, 刘玉林*

(长春生物制品研究所有限责任公司, 吉林 长春 130012)

摘要: 抗体偶联药物 (antibody-drug conjugate, ADC) 因其具有靶点清晰、特异性强等优点已成为临床上治疗多种疾病尤其是癌症的有效手段。但传统 ADC 中的单克隆抗体组织渗透能力差, 存在免疫原性和免疫毒性等风险, 且改造成本高。由驼科动物血液中提取的纳米抗体 (nanobody, Nb) 是目前已知具有完整抗原结合能力的最小抗体片段, 具有组织渗透能力强、免疫原性低、特异性强、稳定性高等优势, 可以代替传统单克隆抗体参与构建纳米抗体偶联药物 (nanobody-drug conjugate, NDC)。本文从纳米抗体结构优势、NDC 的构建、纳米抗体偶联物的应用三个方面进行综述与讨论, 以期 NDC 的研究与发展提供思路。

关键词: 纳米抗体; 抗体偶联药物; 纳米抗体偶联药物

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1210-08

Research progress on nanobody-drug conjugate

ZHANG Xue-yan, ZHOU Bai-song, LIU Yu-lin*

(Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Changchun 130012, China)

Abstract: Antibody-drug conjugate (ADC) has become an effective method for treating various diseases, especially cancer, due to its clear target and good selectivity in clinical practice. However, the monoclonal antibodies in traditional ADC have poor tissue permeability, high modification costs, pose risks such as immunogenicity and immunotoxicity. The nanobody (Nb) which is extracted from the blood of camel animals, is the smallest antibody fragment known to have complete antigen binding ability. It has advantages such as strong tissue permeability, strong specificity, low immunogenicity, and high stability, and can replace traditional monoclonal antibodies to participate in the construction of nanobody-drug conjugate (NDC). This article reviews and discusses the advantages of Nb structure, the construction and application of NDC in the hope of providing ideas for the research and development of NDC.

Key words: nanobody; antibody-drug conjugate; nanobody-drug conjugate

21 世纪初, 随着首个抗体药物偶联物 (antibody-drug conjugate, ADC) (商品名 Mylotarg, Pfizer 研发) 问世并被 FDA 批准用于治疗急性粒细胞白血病^[1], ADC 靶向治疗便成为了肿瘤研究领域的热点。但抗体分子作为生物大分子, 其本身存在一般生物大分子的毒性风险, 如抗体依赖性细胞介导细胞毒性 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)、补体依赖

性细胞毒性 (complement dependent cytotoxicity, CDC)、肾基底膜免疫复合物沉积等。这些毒性风险影响了 ADC 的稳定性, 参与构建的抗体免疫原性越强, ADC 的体内稳定性越弱^[2]。同时, 在 ADC 药物中, 抗体分子最重要的作用是靶向作用, 如果抗体选择性较差, 则会造成细胞毒药物投递到正常细胞中, 造成靶向毒性。所以构建 ADC 药物的理想抗体应兼具特异性和安全性。

近几十年, 纳米抗体 (nanobody, Nb) 逐渐进入了人们的视野。1989 年比利时科学家首次在骆驼血液

收稿日期: 2023-11-24; 修回日期: 2024-04-11.

基金项目: 吉林省科技发展计划基金项目 (20210204092YY).

*通讯作者 Tel: 17743444656, E-mail: liuyulin3@sinopharm.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1324

中发现纳米抗体^[3,4], 其是一种分子质量只有 15 kDa, 在羊驼外周血液中存在的天然缺失轻链的抗体, 该抗体只包含一个重链可变区 (V_{HH}) 和两个常规的 CH2 与 CH3 区, V_{HH} 是已知的可结合目标抗原的最小单位^[5]。纳米抗体具有溶解性好, 不易聚集, 耐高温、酸、碱等致变性条件的特点, 适合于原核表达和各种真核表达系统, 在保留了抗体特异性的同时兼具小分子药物的特点, 避免了生物大分子毒性的缺陷; 2007 年由 Ablynx 研发的首个纳米抗体进入临床试验^[6]; 国内, 康宁杰瑞制药于 2016 年申报 KN-035 产品 (PD-L1 靶点, 单链抗体 FC 融合) 临床试验, 并在 2021 年在中国获批上市 (全球首个皮下注射的纳米抗体药物)。利用纳米抗体取代传统抗体, 建立纳米抗体-药物偶联体系、研制纳米抗体偶联药物 (nanobody-drug conjugate, NDC) 成为研究的热点。与 ADC 相比, NDC 具有免疫原性弱、组织穿透能力强、稳定性高、生产成本低等优势。表 1 对比了 ADC 与 NDC 的特点。

Table 1 Comparison of ADC and NDC. ADC: Antibody-drug conjugate; NDC: Nanobody-drug conjugate; Nb: Nanobody; +: Weak; ++: Medium; +++: Second strong; ++++: Strong

Characteristic	ADC	NDC
Feature	Monoclonal antibody	Nb
Specificity	+++	++++
Immunogenicity	++++	+
Solubility	++	++++
Tissue penetration	+	++++
Drug delivery	+	++++
Stability	+	++++
Production costs	High	Low
Technology roadmap	Mature	Limited
Listed products	Multiple listed products	None listed product

1 纳米抗体的结构特点

纳米抗体的二级结构是由 9 条 β 折叠片段及连接的 loop 区通过一对二硫键形成的典型的 β -夹心结构 (图 1A), 其抗原结合区由 3 个互补性决定区 (complementarity determining region, CDR) 组成, CDR 区被 4 个相对保守的框架区 (framework regions, FR) 包围^[7]。特殊的结构特点增加了 NDC 对靶细胞的渗透能力, 易于穿透组织和血脑屏障^[8], 减小药物的损失, 降低服药剂量, 减小毒副作用。在传统抗体中, 抗原结合区域由 VH 与 VL 的 6 个 CDR 区组合而成^[9], 由于纳米抗体缺失 VL, 其抗原结合区仅由 3 个 CDR 区组成, 在空间上可呈突出的指状结构^[10]。如图 1B 所示, 纳米抗体可以利用指状结构, 识别一些常规抗体无法接近的抗原表位, 从而改变其活性^[11]。这个特点使 NDC 比 ADC 具有更强的特异性。

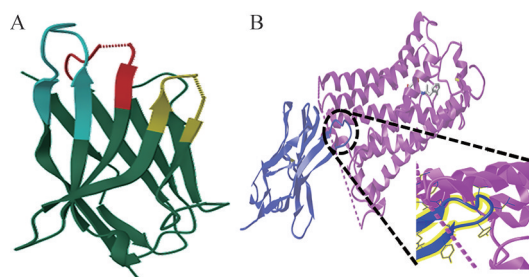


Figure 1 Structural characteristics of Nb (Green: FR area; Red: CDR1; Yellow: CDR2; Blue: CDR3). A: Nb β -sandwich structure; B: The CDR3 of the nanoantibody exhibits a finger-shaped structure that penetrates deeply β_2 adrenergic receptor active pockets and stabilize their active conformation (PDB ID: 3P0G). Nb: Nanobody

纳米抗体表面有数个疏水氨基酸残基被亲水氨基酸残基替换, 从而改变了其表面形状, 降低了聚集性, 使其具有更好的水溶性、亲水性^[10]。此外, 纳米抗体常在 CDR3 上形成另一对二硫键, 增强了 CDR 区的刚性, 使得纳米抗体的抗逆性和稳定性显著增强^[12]。因此, 纳米抗体具有稳定性好, 可用于正电子发射型计算机断层显像 (positron emission computed tomography, PET) 成像^[13]; 免疫原性低^[14]等优势。有些纳米抗体可以抵抗消化酶的降解; 或是耐受盐酸胍、尿素等变性剂; 或是经过高温处理而不变性^[15,16]。这些特性使 NDC 具有更好的环境耐受性, 抗逆性与稳定性大大增强, 并且具有耐受消化酶的特点, 一定程度上缓解了传统抗体偶联药物无法口服给药或口服给药困难的问题。

2 纳米抗体偶联药物的构建

NDC 的发展主要取决于其各个参数的优化, 在理想的情况下, 抗体应能特异性结合到目标蛋白或细胞上而不与其他细胞或蛋白结合。NDC 的连接方法决定了药物负载的化学计量和均匀性, 同时在药理学、活性及耐受性中扮演重要角色^[17]。纳米抗体以连接子与小分子药物相连, 共同构成一个完整的 NDC。

2.1 纳米抗体的筛选

设计 NDC 首先需要筛选出合适的纳米抗体, 作为载体负载偶联药物特异性地与靶细胞或靶蛋白结合。

蛋白展示平台构建纳米抗体文库, 从中筛选出目的抗体基因后进行重组表达是现在常用的方法。现有的蛋白展示平台有噬菌体展示、核糖体展示、大肠杆菌展示、酵母菌展示、哺乳动物细胞展示和反转录病毒展示等^[7]。这些不同的蛋白展示平台在一定程度上既有相似性和共通性, 又各有其优缺点和应用领域^[18]。

噬菌体展示技术是一种经典的表达技术, 该技术

是在1990年建立和发展起来的,是诸多蛋白展示平台中开发最早、技术最成熟、操作简单,并且是目前使用最广泛的展示平台^[19]。它是将外源抗体片段与噬菌体的衣壳蛋白融合,将其展示在噬菌体表面,筛选特异性抗原的抗体,通过原核表达可以大规模生产抗体^[20],为抗体的大量、快速生产提供了技术手段^[21]。常用的M13噬菌体(丝状噬菌体)结构如图2所示,含有5种结构蛋白,其中pIII蛋白和pVIII蛋白可用于外源蛋白展示,构建了pIII和pVIII展示系统^[22],pIII蛋白参与对宿主的识别和侵染,可在N端的柔性区插入并展示一些较大的多肽和蛋白质^[23]。主流纳米抗体文库一般选用M13噬菌体的pIII系统作为展示平台^[24]。

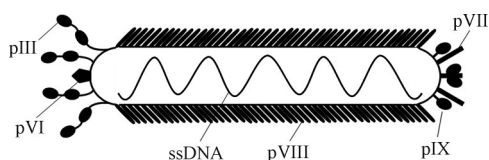


Figure 2 Schematic diagram of M13 phage structure

利用噬菌体展示技术筛选相应的纳米抗体是非常高效和快速的方法,免疫的方案可以缩短至6周以内^[25]。为了提高转化效率,噬菌粒载体pCOM3和pHEN被成功制得,并与辅助噬菌体联用于制备单价纳米抗体展示文库^[26]。构建的纳米抗体文库的大小及多样性是获得高亲和力纳米抗体的前提,此外,新鲜血液的采集和mRNA及cDNA制备的质量是构建高质量文库的关键^[27]。

除了噬菌体展示技术外,核糖体或mRNA展示技术、酵母或细菌表面展示技术和酵母双杂交筛选技术等^[28]也成功应用到抗体生产中。核糖体展示技术利用功能性蛋白质的相互作用,将mRNA与其转录翻译后正确折叠的蛋白质共同连接在核糖体上,形成“mRNA-核糖体-蛋白质”三元复合物,实现基因型与表型的偶联。核糖体展示技术具有全程在体外操作、多样性好的优势。已广泛应用于小分子抗体的筛选和进化^[29]。在酵母和细菌系统中,每一轮反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)后,可能会引入序列的微小突变,这样有利于筛选结合力更强的抗体^[30]。与其他筛选方法相比,利用细菌或酵母系统形成的展示技术建库简单、库容量较大,筛选简便,也是较为理想的筛选技术。

2.2 纳米抗体的表达纯化

纳米抗体的表达量依赖受体细胞的选择,大肠杆菌^[31]、毕氏酵母或HEK293细胞都是目前最常用的蛋白表达系统,由于其优良的表达能力,它们广泛应用于

重组蛋白尤其是药用重组蛋白的表达生产中^[32]。

相较毕氏酵母和HEK293细胞,大肠杆菌作为基因工程受体菌具有许多优点:①培养条件简单、培养周期短;②易于高密度发酵;③重组蛋白质表达水平极高;④极低培养成本等^[33]。因此,大肠杆菌成为纳米抗体表达纯化最常用的菌种。

2.3 连接子技术的选择

连接子是连接抗体与细胞毒药物的桥梁。NDC有多种连接形式,纳米抗体与细胞毒性药物之间可通过转氨酶SrtA、点击化学、马来酰亚胺与巯基反应等方式偶联^[34]。根据连接子性质差异可大致分为两类:可裂解连接子和不可裂解连接子,二者在传统ADC药物的第2、3代均有应用^[35],通常使用化学共价键如二硫键、肽键、硫醚键等实现抗体和毒性小分子药物的连接^[36],这类连接子属于可裂解连接子。另一种连接子其偶联的负载的释放并不依赖于血浆和某些胞质腔室性质的不同^[37],这类连接子被认为是不可裂解的连接子,不可裂解连接子所链接的抗体在靶细胞的溶酶体内水解后仍与药物共价连接^[38,39]。理想的连接物在外周血液循环中要足够稳定,避免因细胞毒分子释放而产生毒性。

2.3.1 可裂解连接子

可裂解连接子分为3种类型:

①酸依赖性脲键(代表性药物如Mylotarg);②氧化还原依赖的二硫键;③可酶切肽键^[35]。脲类连接子和二硫化物连接子在设计上利用了血浆与一些胞质腔室之间性质上的差异^[37]。促进脲连接子释放药物的胞内条件是内涵体和溶酶体的酸性环境^[40],而二硫化物连接子因其含有高浓度的巯基(如谷胱甘肽)将在细胞质中被还原^[39,41-43]。与之相比,利用基于肽的连接子技术可以更好地控制药物的释放^[37]。由于血液中存在内源性抑制剂,且血液pH高于溶酶体内pH,溶酶体蛋白水解酶在血液中的活性极低^[44],因此预计肽键具有良好的血清稳定性。根据临床前体内研究发现,肽连接子具有更高的循环内稳定性,且靶细胞内可实现药物的快速酶释放^[45]。2021年,Fan等^[46]开发了一种四价双互补位的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)特异性NDC,该NDC能够串联表达纳米抗体7D12和9G8,细胞毒性药物monomethyl auristatin E (MMAE)与7D12上的半胱氨酸偶联,如此构建的NDC由于拥有多个结合界面,可克服临床上出现的EGFR耐药性。2022年,Bao等^[34]利用一个八氨基酸肽链GGG-VC-PAB作为连接子,成功获得偶联细胞毒性药物MMAE的NDC:JVZ-0072-VC-PAB-MMAE,结果表明,该NDC具备特异性杀伤前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen,

PSMA) 阳性肿瘤细胞的能力。

2.3.2 不可裂解连接子 由不可裂解连接子(如硫醚键的代表性药物 Kadcyla) 参与的 ADC 细胞毒性药物的释放发生在进入溶酶体腔室之后, 通过胞内蛋白水解将抗体降解到氨基酸水平^[39], 这一过程释放出了药物衍生物, 这种衍生物由细胞毒性药物、连接子和与连接子共价连接的氨基酸残基所组成。只有当释放出的药物代谢产物能够作为细胞毒性药物的活性组分发挥作用时, 方可认为不可裂解的连接子已被成功利用^[38,43,47]。

不可裂解的连接子优势在于血液环境中更加稳定, 仅在溶酶体中切割释放细胞毒素, 安全性明显更好, 然而不可切割连接子通常会残留在细胞毒素上, 影响其杀伤活性及细胞穿透性, 因而对周围的异质性肿瘤细胞杀伤作用有限, 不能充分发挥旁观者效应^[35]。

传统的 ADC 是将药物偶联在抗体的赖氨酸残基或二硫键还原而产生的半胱氨酸残基上, 这种连接方式不仅会导致药物抗体偶联比(即每个抗体分子上偶联的药物数目, DAR) 不均一及连接位点不一致等问题, 而且通过打开的链间二硫键偶联会破坏抗体的完整性^[48-52]。这不仅制约了 NDC 的研发和生产, 还降低了 NDC 的疗效甚至产生未知的毒副作用。

近年来, 有研究者采用基因工程技术对抗体进行改造, 从而实现抗体与小分子药物的定点偶联, 所得到的偶联物不仅具有均一的偶联比还表现出极好的体内药动学性质, 大大提高了疗效^[53]。纳米抗体体内半衰期短, 传统连接物不能达到目的, 因此将纳米抗体进行改造以延长半衰期、加强药效的方法正逐渐成为研究 NDC 的新思路。

3 应用

3.1 纳米抗体的应用

纳米抗体由于其结构特点, 在疾病诊断和治疗等各方面的应用中发挥了独一无二的优势: ① 在组织中溶解度高^[54], 适合于分子影像诊断实体肿瘤^[55]; ② 可

以克服血脑屏障 (blood brain barrier, BBB), 为治疗脑部疾病提供解决方法^[56]; ③ 抗逆性强^[57], 可以实现口服给药、检测与鉴别较难检出的靶点及外来病原体或毒素^[58,59]; ④ 易于进行化学修饰^[60], 实现肿瘤细胞疗法上的应用; ⑤ 具有良好的肿瘤特异性, 可作为给药载体^[61,62]; ⑥ 易于定点偶联且可以通过原核表达系统大量制备, 可用于蛋白质纯化配体, 降低吸附剂成本^[63]。

纳米抗体可以作为蛋白药物, 比利时 Ablynx 公司的卡普赛单抗 (caplacizumab) 是全球第一个上市的纳米抗体药物, 已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 列入标准治疗方案中^[64,65]。中国康宁杰瑞公司开发的程序性细胞死亡配体-1 (programmed cell death 1 ligand, PD-L1) 纳米抗体 KN035 可用于治疗胆道癌, 已完成 III 期临床, 并于 2020 年 1 月被 FDA 授予孤儿药资格^[66,67]。

3.2 纳米抗体偶联药物的应用

在肿瘤治疗方面, 由于 ADC 可以特异性地向肿瘤部位输送强效的化疗药物的特点^[55], 已经有至少 9 种 ADC 已被批准用于癌症治疗^[68], 超过 100 种 ADC 正在进行临床试验, 更多的 ADC 也正处于临床前研发阶段^[69]。但由于 ADC 单克隆抗体分子尺寸较大, 难以从血管壁渗出和进入实体肿瘤的特点, 以纳米抗体代替单克隆抗体, 构建 NDC 药物, 为靶向癌症治疗中药物偶联提供了新的解决方案, 如表 2 列举的一些 NDC 研究进展实例。

2016 年, Fang 等^[70]通过将细胞毒性药物 DM1 偶联到靶向小鼠 III 类主要组织相容性复合体抗原 (the mouse major histocompatibility complex class III, MHC-III) 的纳米抗体 (VHH7) 上, 首次提出 NDC 的概念。通过 sortase 酶催化将甘氨酸修饰的美登素 (mertansine, DM1) 与 C 端含有 LPETGG-His₆ 标签的 VHH7 连接, 以位点特异性偶联的方式得到了偶联物 VHH7-DM1, 研究发现 VHH7-DM1 在动物水平上有效地抑制了肿瘤的生长和转移, 且没有明显的全身毒性。Stenton

Table 2 Examples of research progress on NDC. PDT: Photodynamic therapy; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; TIME: Tumor immune microenvironment; RII: Radioimmunoimaging; IL: Interleukin; IFN: Interferon

Name	Application area	Study phase	Targeted receptor
Nb-PS conjugates	PDT	Preclinical	Tumor cell
f ^[131I] SGMIB-2Rs15d	Cancer treatment	Preclinical	HER2
Pt-NGC, Pt-NGCA	Cancer treatment	Preclinical	HER2
ENb-TRAIL	Reshaping TIME	Preclinical	Tumor cell
IL 2-anti-PD-L1 VHH	Reshaping TIME	Preclinical	PD-L1
IFN γ -anti-PD-L1 VHH	Cancer treatment	Preclinical	PD-L1
VGRNb-PE	Cancer treatment, reshaping TIME	Preclinical	Tumor vasculature
[⁶⁸ Ga]Ga-THP-APN 09	RII	Recruitment	Solid tumor
PD-L2-Nb probe	RII	Recruitment	Solid tumor
CLDN18.2-Nb probe	RII	Recruitment	Solid tumor

等^[71]通过可剪切的双功能连接剂将抗HER2纳米抗体(2Rb17c)与聚乙二醇化的多柔比星前药结合,构建了一个NDC体系。该体系选择性地对HER2阳性的肿瘤细胞具有较高的毒性,产生了较好的治疗效果。铂类抗肿瘤药物由于存在非特异性的靶向作用,在给药时会产生严重的不良反应。Huang等^[72]构建了一种基于铂的肿瘤靶向治疗的NDC。利用纳米抗体的优点,实现了具有不同功能的蛋白质结构域的融合。双价的抗EGFR纳米抗体7D12-9G8可以特异性结合EGFR受体,并在融合蛋白C端引入C3-tag(Cys-Cys-Cys)进行位点特异性的铂药偶联,将铂类药物特异性地传递到EGFR阳性的肿瘤细胞中,选择性诱导细胞凋亡;钆结合蛋白ProCA32实现肿瘤MRI成像功能;抗血清白蛋白纳米抗体Alb1用来延长NDC在体内的保留时间,进一步增强了药效。该NDC的应用效果在细胞和动物模型上都得到了验证。这是关于多功能NDC的首次报道,不同功能的融合体现了纳米抗体在靶向给药应用中的优势,弥补了传统ADC的不足,为后续NDC的研究方向提供了新的可能。

除了靶向递送化疗药物外,纳米抗体还可与光敏剂(photosensitizer, PS)连接以增强PDT对肿瘤的特异性。Heukers等^[73]将光敏剂IRDye700DX与双价抗EGFR纳米抗体(7D12-9G8)偶联。基于细胞水平的检测结果表明,该NDC可特异性诱导EGFR阳性细胞的光毒性,并在药物低至纳摩尔浓度的条件下光照杀死肿瘤细胞。体内实验也表明,该NDC可选择性诱导小鼠肿瘤模型上的肿瘤细胞死亡。Beltrán Hernández等^[74]在研究中发现,由于7D12-PS的PDT作用导致肿瘤细胞坏死,而死亡细胞的损伤相关分子模式可导致抗肿瘤免疫。7D12-PS也会引起EGFR阳性细胞树突状细胞的成熟和CD4⁺T细胞的活化,表明纳米抗体-光敏剂模式的NDC不仅可以对原发肿瘤造成损伤,还可诱导机体免疫反应来对抗肿瘤转移和防止肿瘤复发。

除上述两种NDC,纳米抗体还可与放射性核素偶联用以靶向放射性核素治疗(targeted radionuclide therapy, TRNT),其是将细胞毒性放射性核素输送到癌细胞,同时将健康组织暴露在最低程度上。2017年,D'Huyvetter等^[75]报道了一种¹³¹I标记的抗HER2纳米抗体作为HER2过表达癌症治疗的治疗工具。小鼠模型中生物分布测定表明,¹³¹I-Nb在肿瘤中具有特异性积累和良好的滞留效应,能够显著延长小鼠的生存期,而且毒副作用较低。Pruszyński等^[76]通过p-SCN-Bn-DOTA连接²²⁵Ac和2Rsl5d构建了HER2靶向的TRNT,可定位于HER2过表达的SKOV-3肿瘤细胞,并在接触

周围健康组织最少的情况下提供较高的细胞致死能力。除此之外,纳米抗体与放射性核素偶联可用于实体肿瘤的RIT,3种用于免疫成像的NDC药物已进入临床阶段,它们的偶联方法均为与放射性核素连接,携带药物分别为氟代脱氧葡萄糖(fludeoxyglucose, 18F-FDG)、核素⁶⁸Ga-18F-FDG(表3)。

Table 3 Clinical typical examples of NDC

ClinicalTrials.gov ID	Application area	Linker	Drug
NCT05436093	RIT	Radiolabel	18F-FDG
NCT05156515	RIT	Radiolabel	Nuclide ⁶⁸ Ga
NCT05803746	RIT	Radiolabel	18F-FDG

这些结果表明,纳米抗体与放射性核素连接的NDC既可以有效用于靶向TRNT,也可以形成探针,用于肿瘤免疫成像,为NDC的应用提供更多可能。

除了在肿瘤治疗与成像方面的应用,在其他疾病治疗上,NDC同样是研究的热点。Zhao等^[77]设计并开发了一种基于刚性共轭聚合物的多价NDC,用以对阿尔茨海默症高效多靶点的治疗和干预,拓宽了NDC的应用领域,为其他疾病治疗和药物研究提供更多可能性。

4 总结与展望

NDC兼具ADC药物的高特异性和强效作用,又具备纳米抗体自身的小分子、易于修饰、免疫原性小等优势,是未来重组蛋白药物的新趋势。

NDC在许多方面得以应用:①与细胞毒性药物偶联治疗癌症;②与放射性小分子偶联用于成像;③重塑肿瘤免疫微环境;④延长小分子药物半衰期等。

基于纳米抗体的结构优势,NDC较传统抗体偶联物具有更小的空间结构、更强的靶细胞特异性和靶细胞渗透能力,穿透组织与血脑屏障的能力明显增加,能够更好地达到给药治疗的目的、减弱毒副作用。NDC还具有更强的环境耐受度,无论是储存运输条件、给药途径方面都有更多选择。这些特点配合经典的纳米抗体筛选技术(如噬菌体展示技术),高效的表达技术(如原核表达技术),搭配合适的连接子,获得的NDC具有均一的偶联比、更好的体内药动学性质、疗效有所提高、半衰期得以延长等优势。

但NDC在成药方面依然存在劣势,纳米抗体半衰期较短,以纳米抗体为基础的NDC虽然具有组织穿透性好的优势,但在体内很快会被清除代谢。目前已有策略用以延长NDC半衰期,如聚乙二醇法、多纳米抗体串联、融合白蛋白和融合Fc结构域^[78]等。除此之外,由于NDC在连接子与偶联方式上具有多种选择,因此需要进行大量预实验,使NDC的构建更加繁琐复

杂。但同样由于连接子的多种选择,使NDC具有更多可能性。

尽管纳米抗体在疾病治疗方面已经取得了一些成果,在重组蛋白药物研究中也已经逐步成为不可忽视的部分,由于ADC药物具有免疫原性过高,分子质量较大,对人体造成较为强烈的不良反应等缺点,未来以纳米抗体和新兴连接子为基础的NDC将具有巨大的发展前景。

作者贡献: 张雪嫣负责资料收集、文章撰写和文章修改;周柏松负责稿件审阅;刘玉林参与了稿件审阅。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Hassan HT. Antibody-drug conjugate (ADC) treatment of leukaemia [J]. *Leuk Res*, 2023, 131: 107078.
- [2] Duerr C, Friess W. Antibody-drug conjugates-stability and formulation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 139: 168-176.
- [3] Tang HP, Gao Y, Han JY. Application progress of the single domain antibody in medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 4176.
- [4] Kolmar H, Grzeschik J, Könnig D, et al. Construction of semisynthetic shark vNAR yeast surface display antibody libraries [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2702: 227-243.
- [5] Tu Z, Xu Y, He QH, et al. Construction of alpaca-derived naive single-domain antibody phage display library by semi-nested PCR [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2010, 31: 299-303.
- [6] Li RF. Generation of Nanobody Recognizing Human CD147 Antigen and Its Functional Study (抗CD147纳米抗体的制备及其功能研究) [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2018.
- [7] Huang CD. Screening and Immobilizing of Anti- β 2M Nanobody for Preparation of High-Performance Immunosorbent (抗 β 2M纳米抗体的筛选及其偶联制备高性能免疫吸附剂研究) [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020.
- [8] Bates A, Power CA. David vs. Goliath: the structure, function, and clinical prospects of antibody fragments [J]. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8: 28.
- [9] Zhu G. Preparation of Nanobodies Against NP Protein of Swine Influenza Virus (H3N2) and Establishment and Evaluation of Blocking ELISA Method (猪流感病毒(H3N2)NP蛋白纳米抗体的制备及阻断ELISA方法的建立与评价) [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2019.
- [10] Fernández-Quintero ML, DeRose EF, Gabel SA, et al. Nanobody paratope ensembles in solution characterized by MD simulations and NMR [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 5419.
- [11] Mafí A, Kim SK, Goddard WA 3rd. The G protein-first activation mechanism of opioid receptors by Gi protein and agonists [J]. *QRB Discov*, 2021, 5: 2: e9.
- [12] Mei YX, Chen YZ, Sivaccumar JP, et al. Research progress and applications of nanobody in human infectious diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 13: 963978.
- [13] Zhao TH, Lu TF, Chen YY, et al. Progress in the application of molecular imaging technology in tumor diagnosis and treatment [J]. *China Mod Doct (中国现代医生)*, 2022, 60: 137-142.
- [14] Kazemi-Lomedasht F, Muylderms S, Habibi-Anbouhi M, et al. Design of a humanized anti vascular endothelial growth factor nanobody and evaluation of its *in vitro* function [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21: 260-266.
- [15] He XT, Dong JX, Shen X, et al. Advances on the relationship between stability and structure of nanobody [J]. *Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展)*, 2022, 49: 1004-1017.
- [16] Jin BK, Odongo S, Radwanska M, et al. Nanobodies: a review of generation, diagnostics and therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 5994.
- [17] Aggarwal D, Yang J, Salam MA, et al. Antibody-drug conjugates: the paradigm shifts in the targeted cancer therapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1203073.
- [18] Zhao YJ, Wang Y, Su WJ, et al. Construction of synthetic nanobody library in mammalian cells by dsDNA-based strategies* [J]. *Chembiochem*, 2021, 22: 2957-2965.
- [19] Garg P. Filamentous bacteriophage: a prospective platform for targeting drugs in phage-mediated cancer therapy [J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15: S1-S10.
- [20] Nagy-Fazekas D, Stráner P, Ecsédi P, et al. A novel fusion protein system for the production of nanobodies and the SARS-CoV-2 spike RBD in a bacterial system [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2023, 10: 389.
- [21] Wang HN, Liu XJ, Gao XT, et al. Prokaryotic expression and neutralization activity detection of SARS-CoV-2 neutralizing nanobody [J]. *Curr Biotechnol (生物技术进展)*, 2022, 12: 754-759.
- [22] Tong Z, Silo-Suh LA, Kalalah A, et al. Efficient affinity-tagging of M13 phage capsid protein IX for immobilization of protein III-displayed oligopeptide probes on abiotic platforms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 1201-1209.
- [23] Kulkarni A, Mochnáčová E, Majerova P, et al. Single domain antibodies targeting receptor binding pockets of NadA restrain adhesion of *Neisseria meningitidis* to human brain microvascular endothelial cells [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 573281.
- [24] Liu WS, Song HP, Chen Q, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies [J]. *Mol Immunol*, 2018, 96: 37-47.
- [25] Zhu Y. Screening Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 and Its Mutant Strains Using a Fully Synthesized Nanoantibody Library (利用全合成纳米抗体文库筛选SARS-CoV-2及其突变株的中和抗体) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2023.
- [26] Kellmann SJ, Hentrich C, Putyrski M, et al. SpyDisplay: a versatile phage display selection system using SpyTag/SpyCatcher technology [J]. *MAbs*, 2023, 15: 2177978.

- [27] Velazquez EJ, Cress JD, Humpherys TB, et al. Selection of human single domain antibodies (sdAb) against thymidine kinase 1 and their incorporation into sdAb-Fc antibody constructs for potential use in cancer therapy [J]. *PLoS One*, 2022, 17: e0264822.
- [28] De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools [J]. *Trends Biotechnol*, 2014, 32: 263-270.
- [29] Wang XY, Han QX, Wang ZS, et al. Construction and screening of SARS-CoV-2 ribosomal display nanobody library [J]. *J Pathog Biol (中国病原生物学杂志)*, 2022, 17: 249-253.
- [30] Linciano S, Pluda S, Bacchin A, et al. Molecular evolution of peptides by yeast surface display technology [J]. *Medchemcomm*, 2019, 10: 1569-1580.
- [31] Gao XJ, Nasiba Abuduwahapu, Ma XL, et al. Improved pharmacokinetics of nanobody against CD47 by fusion to albumin binding domains [J]. *J Xinjiang Univ(Nat Sci Ed Chin Engl) (新疆大学学报)*, 2021, 38: 69-75.
- [32] Guo WM, Chen YJ, Zhou YH, et al. A comparative study on the expression, purification and functional characterization of antiserum carcinoembryonic antigen nanobody-fusion Fc-fragment in *pichia pastoris* and HEK293 cell [J]. *Sci Technol Eng J (科学技术与工程)*, 2018, 18: 30-35.
- [33] Miao CY, Du L, Wang JQ, et al. Soluble expression strategies for production of recombinant proteins in *escherichia coli* [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2023, 43: 33-45.
- [34] Bao YK. Production of Multivalent Anti-PSMA Nanobodies and the Toxicity Evaluation of Nanobody-Drug Conjugate (靶向 PSMA 多价纳米抗体的制备及其偶联药物的毒性评价) [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [35] Bian L. Development progress and challenges of antibody conjugated drugs [J]. *China Prescr Drug (中国处方药)*, 2023, 21: 184-187.
- [36] Zhu QW, Zhou JQ. The research and development of antibody drug conjugates (ADCs) and discussion on its key influencing factors [J]. *Pharm Biotechnol (药物生物技术)*, 2016, 23: 431-436.
- [37] Laurent D. *Antibody-Drug Conjugates* [M]. Beijing: Sciencepress, 2020: 60-84.
- [38] Doronina SO, Mendelsohn BA, Bovee TD, et al. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17: 114-124.
- [39] Tang HC, Liu Y, Yu ZJ, et al. The analysis of key factors related to ADCs structural design [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 373.
- [40] Sheyi R, de la Torre BG, Albericio F. Linkers: an assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 396.
- [41] Meister A, Anderson ME. Glutathione [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 711-760.
- [42] Kostova V, Désos P, Starck JB, et al. The chemistry behind adcs [J]. *Pharmaceutics (Basel)*, 2021, 14: 442.
- [43] Jeon EJ, Han JH, Seo Y, et al. Implementation of systematic bioanalysis of antibody-drug conjugates for preclinical pharmacokinetic study of ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in rats [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15: 756.
- [44] Tundo GR, Sbardella D, Santoro AM, et al. The proteasome as a druggable target with multiple therapeutic potentialities: cutting and non-cutting edges [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 213: 107579.
- [45] Sun XH, Tang X, Hu R, et al. Biosynthetic bifunctional enzyme complex with high-efficiency luciferin-recycling to enhance the bioluminescence imaging [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 130: 705-714.
- [46] Fan JS, Zhuang XL, Yang XY, et al. A multivalent bipolaropic EGFR-targeting nanobody drug conjugate displays potent anticancer activity in solid tumor models [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 320.
- [47] Jackson CP, Fang ST, Benjamin SR, et al. Evaluation of an ester-linked immunosuppressive payload: a case study in understanding the stability and cleavability of ester-containing ADC linkers [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2022, 75: 128953.
- [48] Jin YM, Edalati Zakeri S, Bahal R, et al. New technologies bloom together for bettering cancer drug conjugates [J]. *Pharmacol Rev*, 2022, 74: 680-711.
- [49] Xu HJ, Gan L, Han Y, et al. Site-specific labeling of an anti-MUC1 antibody: probing the effects of conjugation and linker chemistry on the internalization process [J]. *RSC Adv*, 2019, 9: 1909-1917.
- [50] Ebrahimi SB, Samanta D. Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 2411.
- [51] Hershman RL, Rezhdo A, Stieglitz JT, et al. Engineering proteins containing noncanonical amino acids on the yeast surface [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2491: 491-559.
- [52] Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC toxicity and strategies to increase ADC tolerability [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15: 713.
- [53] von Witting E, Hober S, Kanje S. Affinity-based methods for site-specific conjugation of antibodies [J]. *Bioconjug Chem*, 2021, 32: 1515-1524.
- [54] Schumacher D, Helma J, Schneider AFL, et al. Nanobodies: chemical functionalization strategies and intracellular applications [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57: 2314-2333.
- [55] Cramer K, Bolender AL, Stockmar I, et al. Visualization of bacterial protein complexes labeled with fluorescent proteins and nanobody binders for STED microscopy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3376.
- [56] Širochmanová I, Čomor L, Káňová E, et al. Permeability of the blood-brain barrier and transport of nanobodies across the blood-brain barrier [J]. *Folia Vet*, 2018, 62: 59-66.
- [57] Ji FL, Ren J, Vincke C, et al. Nanobodies: from serendipitous

- discovery of heavy chain-only antibodies in camelids to a wide range of useful applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2446: 3-17.
- [58] Garcia-Calvo E, García-García A, Rodríguez S, et al. Production and characterization of novel Fabs generated from different phage display libraries as probes for immunoassays for gluten detection in food [J]. *Foods*, 2023, 12: 3274.
- [59] Sánchez-Jiménez MM, de la Cuesta Zuluaga JJ, Garcia-Montoya GM, et al. Diagnosis of human and canine brucella canis infection: development and evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant brucella proteins [J]. *Heliyon*, 2020, 6: e04393.
- [60] Li L. Conjugation of Oxaliplatin with PEGylated-Nanobody for Enhancing Tumor Targeting and Prolonging Circulation (奥沙利铂偶联 PEG 化的纳米抗体用于增强肿瘤靶向和延长循环时间) [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2021.
- [61] Sachdev S, Cabaltega CC, Cheloha RW. Strategies for targeting cell surface proteins using multivalent conjugates and chemical biology [J]. *Methods Cell Biol*, 2021, 166: 205-222.
- [62] Zhu LP, Li JN, Guo Z, et al. Synergistic combination of targeted nano-nuclear-reactors and anti-PD-L1 nanobodies evokes persistent T cell immune activation for cancer immunotherapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20: 521.
- [63] Asaadi Y, Jouneghani FF, Janani S, et al. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments [J]. *Biomark Res*, 2021, 9: 87.
- [64] Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019 [J]. *MAbs*, 2019, 11: 219-238.
- [65] Hanlon A, Metjian A. Caplacizumab in adult patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. *Ther Adv Hematol*, 2020, 11: 2040620720902904.
- [66] Shimizu T, Nakajima TE, Lu N, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of KN035, the first subcutaneously administered, novel fusion anti-PD-L1 antibody in Japanese patients with advanced solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: 2609.
- [67] Zhang F. Structural Mechanisms of PD-L1 and CTLA-4 Antibodies Mediated Tumor Immunotherapy (PD-L1 抗体和 CTLA-4 抗体介导肿瘤免疫治疗的结构生物学机制研究) [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018.
- [68] Coats S, Williams M, Kebble B, et al. Antibody-drug conjugates: future directions in clinical and translational strategies to improve the therapeutic index [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 5441-5448.
- [69] Deonarain MP, Yahioglu G, Stamati I, et al. Small-format drug conjugates: a viable alternative to ADCs for solid tumours? [J]. *Antibodies (Basel)*, 2018, 7: 16.
- [70] Fang T, Duarte JN, Ling JJ, et al. Structurally defined α MHC-III nanobody-drug conjugates: a therapeutic and imaging system for B-Cell lymphoma [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 2416-2420.
- [71] Stenton BJ, Oliveira BL, Matos MJ, et al. A thioether-directed palladium-cleavable linker for targeted bioorthogonal drug decaging [J]. *Chem Sci*, 2018, 9: 4185-4189.
- [72] Huang H, Wu TT, Shi HD, et al. Modular design of nanobody-drug conjugates for targeted-delivery of platinum anticancer drugs with an MRI contrast agent [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55: 5175-5178.
- [73] Heukers R, van Bergen en Henegouwen PM, Oliveira S. Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10: 1441-1451.
- [74] Beltrán Hernández I, Angelier ML, Del Buono D'Ondes T, et al. The potential of nanobody-targeted photodynamic therapy to trigger immune responses [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 978.
- [75] D'Huyvetter M, De Vos J, Xavier C, et al. ^{131}I -labeled anti-HER2 camelid sdAb as a theranostic tool in cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 6616-6628.
- [76] Pruszynski M, D'Huyvetter M, Bruchertseifer F, et al. Evaluation of an anti-HER2 nanobody labeled with ^{225}Ac for targeted α -particle therapy of cancer [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15: 1457-1466.
- [77] Zhao LY, Meng FL, Li YJ, et al. Multivalent nanobody conjugate with rigid, reactive oxygen species scavenging scaffold for multi-target therapy of alzheimer's disease [J]. *Adv Mater*, 2023, 35: e2210879.
- [78] Zhang L. Porcine IgG Chimeric PRRSV Nsp9 Nanobody Inhibits Virus Replication (猪 IgG Fc 嵌合 PRRSV Nsp9 纳米抗体抑制病毒复制的研究) [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2021.