

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.001

· 专家论坛 ·

## 纳米抗体在肿瘤诊断和治疗中的应用及其前景

王冠<sup>1,2</sup>, 徐文娟<sup>3,Δ</sup>, 姜国胜<sup>4</sup> (1. 中国科学院大学, 北京 100049; 2. 中国科学院精密测量科学与技术创新研究院 武汉物理与数学研究所, 湖北 武汉 430071; 3. 烟台普罗吉医学检测有限公司 医学检验中心, 山东 烟台 264006; 4. 滨州医学院 免疫与生物技术转化研究院, 山东 烟台 264003)



**姜国胜** 博士, 教授, 博士生导师。现任滨州医学院免疫与生物技术转化研究院院长, 曾任山东省医学科学院基础医学研究所所长、国家中医药管理局免疫药理学实验室主任、国家卫生部生物技术药物重点实验室副主任、山东省免疫靶向药物工程技术研究中心主任。国家“万人计划”高层次人才特殊支持计划领军人才, 国家“万人计划”科技部创新创业领军人才, 山东省“泰山学者”特聘专家, 山东省有突出贡献中青年专家, 山东省优秀科技工作者, 山东省卫生科技创新人才, 山东省“1020工程”杰出学科带头人。兼任中国免疫学会常务理事、中国医药生物技术学会常务理事、中国免疫学会血液免疫专业委员会副主任委员、山东省医药生物技术学会理事长、山东免疫学会前任理事长。主要从事肿瘤生物治疗与定向诱导分化的研究。先后承担国家新药创制重大专项、国家科技支撑项目、国家自然科学基金等国家级项目10余项, 承担省部级计划项目40余项。在*Nat Immunol*、*Nat Commun*、*Cell Mol Immunol*等杂志发表SCI收录论文50余篇。获得省部级科技进步三等及以上奖励11项、山东省医学科技进步一等奖等4项。获得国家发明专利7项、国家III类医疗器械注册1项, 在研纳米抗体等国家I类新药4项、III类医疗器械4项。

**[摘要]** 纳米抗体(Nb)最早发现于羊驼的外周血液中, 与传统抗体相比, Nb具有体积小、稳定性好、免疫原性低、组织渗透性强、易于通过基因工程生产等特点, 是目前已知最小的功能性抗原特异性结合片段, 因此Nb近年来被认为是一种极具开发价值的蛋白质, 在基础研究、新药研发、疾病治疗等多个领域得到了广泛的应用。本文重点综述Nb的结构特点和生化特性、在肿瘤诊断和治疗等领域的研究进展, 同时预测Nb的应用前景。

**[关键词]** 纳米抗体; 肿瘤; 诊断; 治疗; 应用

**[中图分类号]** R730.4; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)10-1053-09

## Application and prospect of nano-antibody in the diagnosis and treatment of cancers

WANG Guan<sup>1,2</sup>, XU Wenjuan<sup>3,Δ</sup>, JIANG Guosheng<sup>4</sup> (1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Innovation Academy for Precision Measurement Science and Technology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China; 3. Medical Laboratory Center, Yantai Protgen Medical Testing Co., Ltd., Yantai 264006, Shandong, China; 4. Institute of Immunology and Biotechnology Transformation, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong, China)

**[Abstract]** Nano-antibodies (Nbs) were first discovered in the peripheral blood of alpacas. Compared with traditional antibodies, Nbs have the characteristics of small volume, good stability, strong tissue permeability, and easy production through microbial systems, etc. They are currently the smallest known functional antigen-specific binding fragments. Therefore, Nbs have been considered as valuable proteins in recent years and widely used in many fields, such as basic research, new drug development, disease treatment and so on. This article reviews the structural and biochemical properties of Nbs and the research progress on Nbs in the fields of tumor diagnosis

**[基金项目]** 国家十二五“重大新药创制”科技重大专项(No. 2013ZX09103003-002); 国家“十一五”重大新药创制科技重大专项子课题(No. 2009ZX09503-010); 国家自然科学基金资助项目(No. 30771103, No. 81172792, No. 81101605, No. 81573467)。Project supported by the National “12th Five-Year” Plan for Major New Drug Creation Science and Technology (No. 2013ZX09103003-002), and National “Eleventh Five-Year Plan” Major New Drug Creation Technology Sub-project (No. 2009ZX09503-010), and the National Natural Science Foundation of China (No. 30771103, No. 81172792, No. 81101605, No. 81573467)

**[作者简介]** 王冠(1995-), 男, 博士生, 主要从事纳米抗体的研究, E-mail:2897315873@qq.com; 徐文娟(1985-), 女, 硕士生, 主要从事医学检验技术开发研究, E-mail:xuwj@diagnostics.cn。Δ为并列第一作者

**[通信作者]** 姜国胜(JIANG Guosheng, corresponding author), E-mail:jianggsh@hotmail.com

and treatment, as well as their application prospect.

**[Key words]** nano-antibody; tumor; diagnosis; treatment; application

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(10): 1053-1061. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.10.001]

自1975年单克隆抗体开始成功应用于疾病诊断与治疗,尤其是20世纪80年代后的新型基因工程抗体不断出现以来,以嵌合抗体、人源化抗体、全人源抗体和小型化基因工程抗体等为主的新型抗体逐渐表现出了优异的应用潜力。但是,它们在稳定性、表达产量、蛋白酶抵抗性和聚合性等方面依然存在着诸多问题。1993年发现的纳米抗体(nano-antibody, Nb)则似乎能够较好地克服上述问题。Nb是羊驼外周血液中存在一种天然缺失轻链的抗体,与传统抗体IgG相比,这种抗体只包含一个重链可变区VHH和两个常规的CH2和CH3恒定结构域区,分子量只有传统抗体的一半<sup>[1-2]</sup>。其克隆得到只含重链可变区抗体被称为单域抗体(single domain anti-body, ScAb)或Nb,具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及抗原结合活性<sup>[3-4]</sup>。因其特异性强、亲和性好、稳定性高等优点,在抗体领域中已经取得了令人瞩目的成就。其已经被广泛应用于生物化学机制、结构生物学,以及肿瘤等疾病的诊断和治疗中。本文将就Nb的基本特性及其在肿瘤诊疗方面的研究进展进行评价,并展望其应用前景。

## 1 Nb概况

Nb是目前已知最小的天然功能性抗原特异性结合片段,由大约120个氨基酸组成,晶体直径2.5 nm,长度4 nm,分子量只有 $(12\sim 15)\times 10^3$ <sup>[4]</sup>。相对于传统的单克隆抗体mAb( $15\times 10^4$ )、Fab片段( $55\times 10^3$ )或者scFv( $28\times 10^3$ ),Nb的分子量更小。因此具有更强、更快的组织透过能力,能够到达实体瘤等致密组织发挥作用<sup>[5-6]</sup>。同时,由于肾的滤过作用,Nb在血液中的半衰期也相对更短,在某些情况下能够避免毒性的积累<sup>[7]</sup>。

Nb由3个抗原互补决定区(complementarity determining region, CDR)和4个框架区域(frame region, FR)组成。其中,3个CDR是Nb与抗原的结合区域,而传统抗体需要6个CDR来维持与抗原的结合。相比于单克隆抗体,Nb展示出相当甚至更强的抗原结合能力<sup>[8-9]</sup>。此外,Nb的CDR1和CDR3的氨基酸序列更长,在一定程度上弥补了由于轻链缺失而导致抗原结合能力的损失。在接受抗原刺激后,Nb的产生主要依赖于体细胞超突变,因此更长的CDR序列也意味着更多的抗体多样性。晶体学研究表明,更长的CDR3区域赋予Nb更强的抗原结合能力,从而能够结合传统抗体无法到达的抗原表位<sup>[10]</sup>。序列比对

显示,Nb与人源免疫球蛋白IgG的VH结构域高度同源,仅FR2和CDR3区域存在显著差异。之前有研究表明,Nb反复给药并不会引起任何体液和细胞免疫反应<sup>[11-13]</sup>,但长期重复使用Nb药物是否引起其产生对机体的免疫原性仍有待研究<sup>[14]</sup>。

在传统抗体中,VH与VL相互作用的FR2区域存在大量的疏水残基<sup>[15]</sup>。在缺失轻链VL的情况下,VH表面的疏水残基暴露,在体外很容易产生聚集<sup>[16]</sup>。这些疏水残基在VHH中被亲水残基取代,降低了VHH的聚集能力,同时提高了VHH的水溶性。此外,Nb还具有极高的稳定性,能够在一些极端条件下保持活性。在37℃下放置1周,Nb能够维持80%活性<sup>[17]</sup>。在90℃变性之后,Nb能够重新恢复天然的活性构象<sup>[18]</sup>。Nb还能够抵御变性剂、蛋白酶以及极端pH的影响<sup>[8]</sup>。传统单克隆抗体的生产需要真核表达系统,并且过程复杂、代价昂贵。而Nb能够在微生物系统中大量生产。在抗体筛选方面,除了传统免疫接种的方法,利用天然抗体文库以及体外合成的抗体文库生产Nb,能够克服免疫接种的缺点,是未来抗体筛选的新途径<sup>[19-20]</sup>。Nb由于具有分子量小、水溶性高、稳定性强、抗原识别能力强、易于生产等特点,在肿瘤的诊断与治疗方面比其他抗体更具优势。近几年,Nb在肿瘤诊断与治疗的研究上也的确取得了较大的进展,显示出较好的应用前景。

## 2 Nb在肿瘤诊断中的应用

由于Nb具有分子小的特点,其能够在肿瘤组织中有效渗透,因此可以作为很好的示踪剂。如果将不同的标记分子与Nb偶联在一起,可实现不同肿瘤的示踪。例如,酶示踪剂、放射性核素、荧光基团或生物素等,理论上均能够用于肿瘤组织活体成像<sup>[21]</sup>,而目前的实际研究结果也证实了其可行性。例如表皮生长因子受体(EGFR)能够表达在不同的上皮细胞肿瘤,与皮肤、肺、头颈部肿瘤直接相关<sup>[22]</sup>,是用于肿瘤定位的最佳生物标志物之一。GAINKAM等<sup>[23]</sup>将放射性核素<sup>99m</sup>Tc标记EGFR,采用正电子发射断层成像/单光子发射计算机断层成像(PET/SPET)技术实现了活体肿瘤成像,用于厄洛替尼治疗后肿瘤反应的无创监测。人表皮生长因子受体2(HER2)是另外一种与乳腺癌相关的肿瘤标志物<sup>[24]</sup>。在HER2过表达的异体移植小鼠模型中,<sup>177</sup>Lu-Nb标记的HER2展示出肿瘤组织的快速示踪。在38个靶向HER2的Nb中筛选了

其中的2Rs15d用于分期临床试验,在胰腺患者中的PET成像中得到了肯定<sup>[25]</sup>。此外,部分学者利用Nb与近红外(NIR)染料结合,能够对HER2阳性的肿瘤进行成像。如DEBIE等<sup>[26]</sup>将NIR荧光染料偶联到Nb2Rs15d纳米抗体上,在异体移植小鼠模型体内实现了肿瘤成像,并具有快速、特异、高对比度的优势。MOVAHEDI等<sup>[27]</sup>利用<sup>99m</sup>Tc标记了抗巨噬细胞甘露糖受体的Nb,发现其能够进入肿瘤乏氧区域,有望用于乏氧组织的显像。与单克隆抗体相比,利用分子量较小的Nb进行示踪,不仅表现出快速的抗原靶向性,增强造影的成像信号,并且能够从血液中快速清除,减少标记片段在肝中的积累。另外,以Nb为基础的PSA、CEA和MUC1等传统肿瘤特异性抗原的示踪检测,在不同肿瘤定位中也发挥了重要的临床诊断价值。如部分学者采用二价抗体能有效减少Nb在非靶区(如胰腺、肺组织等)的滞留,并能避免与Nb竞争体内结合位点。有关以Nb为基础的肿瘤标志物免疫检测方法的建立正在逐步走向市场。

### 3 Nb在肿瘤治疗中的应用

传统抗体在肿瘤诊断和治疗领域发挥了巨大的作用,并开启了靶向治疗的时代,目前已经成为临床靶向治疗的主要方法之一,取得了较大的社会和经济效益。传统的抗体包含Fc结构域,癌细胞可以被抗体依赖的细胞介导的细胞毒性效应(ADCC)以及补体依赖的细胞毒性效应(CDC)等杀死<sup>[28-29]</sup>。然而,传统抗体的分子量高达 $150 \times 10^3$ ,穿透能力差,有时难以到达靶组织。相对而言,Nb分子量小,很容易穿透屏障到达癌变组织。目前,根据Nb的上述特性,已经开发出针对不同肿瘤(B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性胶质瘤、结肠癌、肝癌和乳腺癌等)的Nb药物<sup>[30]</sup>,较广泛地涉及到肿瘤的示踪诊断、直接靶向治疗、治疗载体等。

#### 3.1 针对经典靶标的肿瘤治疗

由于Nb具有独特的药理和理化性质,可作为治疗人类疾病的新一代药物。Nb能够有效结合蛋白表面的空腔<sup>[31-32]</sup>。此外,Nb可以在细胞内表达作为胞内抗体,用于靶向细胞内的抗原<sup>[33]</sup>。Nb在极端条件下具有较高的稳定性,能够透过血脑屏障<sup>[34]</sup>。由于其对胃蛋白酶的抵抗性可以口服给药治疗胃肠道疾病。而且Nb很容易被设计成多价或多特异性结构,用于开发特异性和高效的治疗药物。目前Nb除了在微生物感染、治疗神经退行性疾病、抗炎症和免疫调节方面的应用外,在肿瘤诊疗方面的研究成果尤为突出。

EGFR几乎在大部分肿瘤中都有高比例的表达,

从VHH Nb库中筛选出的EGFR特异性抗体,可以阻碍EGF与其受体结合,从而阻断EGFR介导的信号转导和细胞增殖<sup>[13]</sup>。其多价抗体可以进一步提高EGFR Nb的亲合力<sup>[14]</sup>。同时,为了延长其在体内的半衰期,EGFR的2价Nb或者与小鼠血清白蛋白偶联在一起,能更好地抑制肿瘤的生长<sup>[15]</sup>。将EGFR Nb融合到聚乙二醇(PEG)脂质体的表面形成一个新的多价抗体,体外的细胞实验表明它能抑制肿瘤细胞的增殖;而在小鼠体内能靶向与肿瘤细胞中的EGFR结合,下调EGF的表达<sup>[17]</sup>。前列腺特异性抗原(PSA)是早期前列腺癌检测使用最广泛的靶标。SAERENS研究组<sup>[18-19]</sup>获得的高亲和力PSA Nb,可以区分不同PSA的亚型。癌胚抗原(CEA)在上皮来源癌细胞中均高表达,而在正常细胞中不表达或低水平表达。CEA Nb与 $\beta$ 内酰胺酶融合,将 $\beta$ 内酰胺酶定位于肿瘤内部,通过催化 $\beta$ 内酰胺类抗肿瘤前药生成具有细胞毒性的药物,在原位杀伤肿瘤。这种抗体依赖的酶前药治疗系统可引起特定的移植瘤衰退或治愈,对肿瘤治疗具有很强的靶向性<sup>[20]</sup>。另外,MAI研究组<sup>[21]</sup>筛选获得的CEA6(CEA的一种变体)Nb与传统抗体相比,在肺癌的临床诊疗方面更加敏感。黏蛋白1(mucins 1, MUC1)不仅在多种肿瘤组织中过量表达,而且糖基化不完全使正常情况下隐蔽的表位暴露,这成为免疫诊断和治疗攻击的靶点。RAHBARIZADEH研究组首次从免疫库中筛选得到MUC1的Nb<sup>[22]</sup>在大肠杆菌<sup>[23]</sup>、毕赤酵母<sup>[24]</sup>、烟草<sup>[25]</sup>和中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞<sup>[26]</sup>中都有良好的表达,并成功验证该抗体与肿瘤相关肽呈现良好的特异性。

然后,他们利用MUC1的Nb构建嵌合抗原受体修饰的T细胞(CAT-T细胞),并将此T细胞导入到肿瘤细胞中以发挥它的细胞免疫作用<sup>[35]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 $\alpha$ )是调控机体内环境氧稳态的重要转录因子,通过下游靶基因调控血管新生及糖代谢等环节,促进肿瘤细胞的增殖和转移。GROOT课题组<sup>[36]</sup>从非免疫的驼源Nb文库中筛选得到针对HIF-1 $\alpha$ 氧依赖降解区域(oxygen-dependent domain, ODD)的特异性抗体,该抗体通过与HIF-1 $\alpha$ 的ODD位点结合,从而下调了HIF-1对靶基因的转录活性。此后,他们又用HIF-1 $\alpha$ 特异性Nb对HIF-1的条件性失活做了深入的研究,结果表明该抗体可能结合到了HIF-1 $\alpha$ 的转录活化结构域(transcription activation domain, TAD)使其转录下游基因功能失效;也有可能与von Hippel-Lindau蛋白(pVHL)的功能相似而促进了HIF-1 $\alpha$ 的降解,为肿瘤的生物治疗提供了一种可能<sup>[37]</sup>。从非免疫的驼源Nb文库中筛选得到针对Per-Arnt-

Sim-B 结构域(PAS-B)的特异性抗体,可以介导HIF-1 $\alpha$ 与HIF-1 $\beta$ 二聚化以及与下游靶基因的结合<sup>[38]</sup>,通过HIF-1 $\alpha$ 纳米抗体与PAS-B的活性位点的结合,减少HIF-1(只有HIF-1 $\alpha$ 与HIF-1 $\beta$ 二聚化并与靶基因结合后才有对靶基因的转录激活活性)的量,从而抑制肿瘤的增殖及转移。另外,靶向肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其受体(c-Met)、靶向尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)、靶向G蛋白偶联趋化因子受体(G-protein-coupled chemokine receptor)CXCR7、靶向血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)及VEGF受体2(VEGFR2)的Nb均能发挥抑制肿瘤的作用。

因为同时靶向2个或以上不同肿瘤相关抗原的多价抗体理论上能在一定程度上提高抗肿瘤的效率。Anti-VEGF与anti-血管生成素2(angiopoietin 2, NG2)Nb偶联的多价Nb效果均优于它们单独的单价Nb。Anti-EGFR的Nb与2个anti-HER2偶联形成的多价抗体MaAbNA正在进行体内验证<sup>[39]</sup>。Anti-EGFR的Nb与高渗透性的肿瘤特异性结合多肽iRGD融合而成的重组蛋白,既提高了抗肿瘤效力,又提高了肿瘤组织的渗透率<sup>[40]</sup>。其次,通过信号序列的引导,将Nb直接进行体内靶向递送也成为提高Nb疗效的途径之一。例如将anti-CapG Nb与EspF(E. coli-secreted protein F)的信号序列T3S相连,通过具有III型蛋白分泌的细菌对肿瘤细胞进行胞内递送<sup>[41]</sup>,或通过SP-神经激肽-1(neurokinin-1)受体通路进行肿瘤细胞内的靶向递送等,都取得了良好的效果。

### 3.2 针对其他新型靶标的肿瘤治疗

除了上述常见肿瘤靶标外,其他新型靶标也为Nb治疗提供了依据。例如,受体趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)是趋化因子CXCL12的受体,CXCL12又称基质细胞衍生因子1(stromal cell derived factor-1, SDF-1),CXCR4 Nb能抑制CXCR4/CXCL12轴的形成<sup>[42]</sup>,从而抑制肿瘤细胞的增殖。内皮糖蛋白endoglin(CD105)Nb使endoglin介导的信号转导受阻,从而抑制肿瘤血管内皮细胞增殖和新生血管形成<sup>[43]</sup>;异构核糖核蛋白K(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP-K)Nb通过控制其与肿瘤恶化相关基因的表达穿梭,来抑制肿瘤细胞的侵袭以转移<sup>[44]</sup>;G肌动蛋白Nb可控制G肌动蛋白聚集而抑制信号转导<sup>[45]</sup>;整合素VLA-3 Nb可抑制VLA-3连接的细胞-基质黏附<sup>[46]</sup>。B细胞活化因子(BAFF)的增加似乎在多种B细胞疾病中发挥作用。抗BAFF的Nb在体外能够降低癌细胞的增殖<sup>[47]</sup>。

抗BAFF/CD20双特异性的Nb能够提高治疗B细胞疾病的组织靶向性,改变慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者对CD20抗体治疗的耐药性。CD38是一种细胞表面抗原,在包括多发性骨髓瘤在内的许多血液病中都有大量表达,已被证明是该疾病免疫治疗的一个有用靶点。一些Nb能够以剂量依赖的方式抑制或增强CD38酶活性,并在小鼠异种移植模型中有效靶向肿瘤细胞CD38<sup>[48]</sup>。由于其高水溶性,Nb能够与人源IgG1的铰链、CH2和CH3结构域构成嵌合抗体,这种嵌合抗体具有诱导经典Fc介导的细胞毒性效应<sup>[49]</sup>。虽然Nb在肿瘤治疗领域已经取得了巨大的进步,但Nb药物的免疫原性、靶向性、半衰期还需要进一步优化。

### 3.3 用作新型药物递送载体

虽然Nb没有Fc效应器,不像传统抗体那样产生ADCC等细胞毒作用,但是由于其具备高特异性和较强的组织穿透力,故而可以做为载体携带细胞毒药物,增强杀伤肿瘤的作用。例如VEGFR2 Nb关联铜绿假单胞菌外毒素产生了较好的抑癌作用<sup>[50]</sup>,主要组织相容性复合体(MHC)-II Nb关联微管聚合抑制剂DM1也有良好的治疗效果<sup>[51]</sup>。神经干细胞(neural stem cell, NSC)转染了编码二价抗EGFR Nb和细胞毒性TRAIL的重组蛋白,明显降低恶性胶质瘤细胞的生存能力<sup>[52]</sup>。一个HER2特异Nb装备一个可以招募抗二硝基苯基抗体的分子可以引发肿瘤细胞的破坏<sup>[53]</sup>。抗体导向的酶催化前体药物疗法(antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)实验中,发现anti-CEA的Nb将偶联的 $\beta$ -内酰胺酶定向传递至CEA<sup>+</sup>肿瘤细胞表面,激活抗癌前体药物头孢菌素氮芥,从而提高抗癌药物对肿瘤细胞的选择性<sup>[54]</sup>。装载激酶的抑制剂与Nb结合也是一种治疗思路。将抗胰岛素样生长因子1R(IGF-1R)激酶抑制剂AG538封装在抗EGFR纳米抗体脂质体中,这种双重激活Nb脂质体能同时阻止EGFR和IGF-1R的激活,对肿瘤增殖具有明显的抑制作用<sup>[56-57]</sup>。将靶标EGFR的Nb进行生物素酰化并与包裹着链霉亲和素的胶粒偶联,可以直接靶向EGFR阳性的肝肿瘤细胞<sup>[58]</sup>。靶向plexinD1(一种在肿瘤血管表达的穿膜蛋白)Nb修饰的肿瘤血管靶向聚合酶和耦合HER2纳米抗体的聚合酶<sup>[59-60]</sup>。另外,由于细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)能迅速被细胞所接纳,EV可做为新的系统转运细胞内生物“货物”,然而它们无法特异性靶向细胞并会被快速清除<sup>[61]</sup>。因此将耦合一个EGFR特异性Nb的聚乙二醇(PEG)化胶束与EV孵育,致使Nb-PEG胶束嵌入EV膜。这样既不改变其形态学和生物物理特征,又能有效靶向肿瘤细胞且延长EV的循

环时间<sup>[62-64]</sup>。

因此,Nb在作为药物传递系统方面,能够发挥重要作用。即采用化学的方法将Nb与药物传递分子结合起来,就可以利用Nb的特异性将被密封包裹着的药物传递到作用部位。这种方法可以避免普通给药方式给全身带来的毒性反应,并且可以让具有疏水性的药物以亲水结构进行运输。此外,可以采用这样的方式进行大剂量给药,从而避免多次给药产生的免疫原性<sup>[6,22]</sup>。Nb本身可抑制肿瘤生长,再加上其他药物的作用,相当于Nb拥有双重功能。

### 3.4 应用于放射性核素与光动力联合的放射免疫疗法(RIT)

目前用于临床的放射核素主要为 $\beta$ -衰变核素,有<sup>90</sup>钇(<sup>90</sup>Y)、<sup>131</sup>碘(<sup>131</sup>I)与<sup>177</sup>镥(<sup>177</sup>Lu)等,但也有 $\alpha$ -衰变核素开始使用。经FDA批准的核素标记anti-CD20单抗药物(<sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetan,替伊莫单抗)已经上市,还有用于治疗实体瘤和血液恶性肿瘤44种该类物质处于临床试验中。普通放射性抗体药物用于RIT时,其半衰期长的优点反而为核素带来了不良的药代动力特性,且对肿瘤渗透性差,也限制了其靶向作用。通过对比,放射性标记Nb的靶向性更好,且能从血液中快速清除<sup>[65]</sup>。<sup>177</sup>Lu标记靶向M蛋白(M蛋白为恶性浆细胞产生的单抗)Nb正在尝试用于治疗多发性骨髓瘤,以期抑制疾病的进展<sup>[66]</sup>。用制备了<sup>177</sup>Lu标记靶向HER2的2Rs15d,双功能接头1B4M-DTPA中金属结合区域与放射性核素连接,化学活性区域与Nb连接。为避免Nb在肾脏组织富集导致辐射损伤,与血浆扩容剂琥珀酰明胶(Ge-lofusin)共同给药,几乎能彻底阻断HER2<sup>+</sup>荷瘤小鼠中肿瘤的生长,给药组与未给药组小鼠之间的无事件生存率(event-free survival,EFS)具有显著性差异。相对于RIT中放射性核素杀死癌细胞,光动力疗法(photodynamic therapy,PDT)是通过激活光敏剂(photosensitizer,PS)引发光化学反应破坏肿瘤细胞。PDT的优势在于能够进行精确有效的治疗,产生的副作用较小。目前处于研究前沿的PS为枝状金纳米颗粒(branched gold NP),由于其巨大的吸收截面,NP在激光照射后会通过产热破坏肿瘤细胞。Anti-HER2与枝状NP连接会导致纳米颗粒在HER2阳性肿瘤细胞表面的富集,可有效提高光热抗癌剂的靶向性。Anti-EGFR单价或多价Nb与可追踪PS(IRDye-700DX)的连接应用中将分子成像与肿瘤治疗进行结合,是PDT技术应用于临床的重大进展<sup>[67]</sup>。

### 3.5 修饰免疫效应细胞的抗肿瘤作用

Nb不仅可以通过直接抗肿瘤、药物载体效应或放射核素治疗,还可以发挥免疫效应细胞的调控作

用。根据免疫效应细胞上的Fc $\gamma$ R能够介导细胞毒作用的理论,部分学者从骆驼免疫文库中分离的两个能特异性结合Fc $\gamma$ RIIIa的Nb(C21和C28),间接介导NK细胞的ADCC作用。如将该Nb与anti-CEA(anti-carcino embryonic antigen,anti-CEA)Nb相连,能通过NK细胞在体外溶解CEA<sup>+</sup>肿瘤细胞,也可在CEA<sup>+</sup>肿瘤移植小鼠体内抑制肿瘤的生长,为抗肿瘤Nb的开发提供了新的思路<sup>[68-69]</sup>。

CAR-T细胞疗法是肿瘤免疫疗法的研究热点之一,具有治疗血液肿瘤的良好前景,其通过对患者自身的T细胞进行基因改造,使得它们更好地攻击癌细胞。与传统抗体比较,Nb在构建CAR-T过程中更具有优势。由于目前CAR中识别抗原的结合部位大多基于鼠源抗体的scFv进行设计,具有较高的免疫原性,Nb可以降低该种免疫源性<sup>[70]</sup>。利用Nb作为连接或靶向部分获得的嵌合抗原受体T细胞也是规避肿瘤逃逸的有效途径之一。同时发现,Nb为基础的CAR-T能够更好地发挥T细胞免疫疗法的优势(如有效的肿瘤渗透、诱导细胞因子释放、细胞毒性效应)及Nb的治疗优势(如体积小、免疫原性低、肿瘤相关抗原的高特异性)。如将特异靶向HER2的Nb与细胞内转导信号(CD3 $\zeta$ 、OX40、CD28)相连构建的重组T细胞可实现体外高效表达<sup>[71]</sup>;靶向黑色素分化抗原糖蛋白100(melanocyte differentiation antigen glycoprotein 100)Nb的CAR能在体内抑制黑色素瘤的发展<sup>[72]</sup>。

但是,CAR-T细胞并不擅长清除实体瘤,因为人们在实体瘤中很难找到可以作为安全靶标的肿瘤特异性蛋白。针对CAR-T细胞尚不能用于实体瘤的现状,美国波士顿儿童医院和麻省理工学院的研究人员拟根据Nb的特点来解决这一难题,可以让CAR-T细胞疗法在实体瘤中发挥作用<sup>[73]</sup>。Nb的一种有用的独特性质是增强的靶向能力,通过其携带显像剂,从而能够准确地可视化观察转移性肿瘤。JAILKHANI及其团队<sup>[74]</sup>将这些Nb引导到肿瘤细胞外基质(extracellular matrix,ECM)或者作为ECM的靶向显像剂,主要针对包围着癌细胞的肿瘤微环境。有学者<sup>[75]</sup>构建的CAR-T细胞上镶嵌着识别肿瘤微环境中特定蛋白的Nb,这些Nb携带的信号引导它们杀死它们能够结合的细胞。例如一种称为E11B的蛋白是纤连蛋白的变体,仅在为肿瘤提供营养物的新生血管中发现。另一种是PD-L1,它是一种免疫抑制蛋白,被大多数肿瘤用于沉默邻近的T细胞。利用这些相对特异的抗原制备Nb,制备基于Nb的CAR-T细胞。通过在两种不同的黑色素瘤小鼠模型中进行测试,这些细胞可以杀死肿瘤细胞,显著减缓肿瘤生长并

改善这些小鼠的存活,并且没有产生明显的副作用。靶向EIIIB可能以一种减少肿瘤血液供应的方式损害血管,同时让它们对肿瘤药物更具渗透性。初步表明开发出的这种方法可能对许多实体瘤,如在胰腺癌和胆管癌模型中可以取得较理想的结果。

尽管CAR-T可有效诱导T细胞攻击肿瘤细胞,但同时可以产生例如细胞因子风暴综合征等副作用。为了进一步减少这种副作用并提高疗效,有学者<sup>[76]</sup>研发了一种T细胞抗原偶联剂,可以偶联内源性TCR的嵌合抗原,即嵌合性TAC-T(T cell antigen coupler-T cell)。其主要包括3个关键部分的设计,一是胞外的抗原结合域改为如Nb,第2部分为胞外的anti-CD3 scFv,第3部分为穿膜的CD4结构域连接蛋白激酶LCK。这种设计更类似于TCR,受体改造的结果是对T细胞的激活保持在正常的范围。在实体瘤模型中,TAC-T细胞相比基于CD28提供第二信号活化的CAR-T细胞展示出更强的抗肿瘤效应、更低的细胞毒副作用、更快的肿瘤穿透能力,以及更高的治疗指数。根据TAC-T细胞的疗效,以及Nb的生物特性,基于Nb的TAC-T样细胞也可能会产生更为理想的治疗效果。

#### 4 Nb用于肿瘤诊疗存在的问题

虽然目前的研究结果表明Nb用于肿瘤的诊断和治疗具有巨大的潜力<sup>[77]</sup>,但是Nb在肿瘤诊断与治疗方面依然存在着诸多问题:(1)从特异性Nb获得的角度上来讲,免疫动物的费用和筛选过程相对复杂且成本较高;(2)部分研究者构建的VHH文库是野生型的,即库的来源是非免疫的骆驼的淋巴细胞,往往难以得到具有高度特异性的Nb;(3)用于肿瘤诊断与治疗的靶标大多位于细胞内,需要进行体内转染介导内源性Nb表达,其转染效率较低;(4)Nb的临床安全性问题,主要包括驼源的Nb在人体内是否会产生免疫应答,以及肾小球滤过导致载体核素或药物诱发肾脏毒性等问题,其关系到能否大规模用于肿瘤的诊断与治疗;(5)其没有ADCC和CDC作用等缺点,也需要进一步改善或克服;(6)人源化和大规模基因工程生产的难题。

#### 5 展望

由于Nb具有稳定性强、可溶性好、免疫原性低、容易表达等特性,决定了它们在肿瘤的诊断及治疗方面具有巨大的潜力。随着上述问题的逐一解决,Nb将在肿瘤诊疗中发挥越来越重要的作用,并有望在某些方向上获得突破。分子克隆技术及噬菌体展示技术的优化将促进Nb文库的构建及特异性Nb的

筛选获取。人源化Nb的改进将进一步降低Nb的免疫原性,提高安全性与有效性。其较强的组织穿透力将便于渗透实体肿瘤,尤其是局部微环境的干预治疗。基于Nb的示踪剂将提高临床肿瘤的影像学诊断水平,指导肿瘤的精准诊断和个性化治疗。携带核素、毒素或化疗药物的纳米载体,将为肿瘤患者提供更多的治疗手段。基于Nb的CAR-T或TAC-T将成为传统CAR-T的替代或换代产品。总之,Nb不仅在肿瘤生物标志物检测和示踪中发挥越来越重要的作用,也将在替代传统靶向抗体药物、ADC药物、融合蛋白、肿瘤局部干预治疗以及实现口服抗体治疗等方面实现新的突破。

#### [参考文献]

- [1] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448. DOI:10.1038/363446a0.
- [2] HARMSSEN M M, RUULS R C, NIJMAN I J, et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features[J]. *Mol Immunol*, 2000, 37(10): 579-590. DOI:10.1016/s0161-5890(00)00081-x.
- [3] LI C, TANG Z R, HU Z X, et al. Natural single-domain antibody-nanobody: A novel concept in the antibody field[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(1): 1-19. DOI:10.1166/jbn.2018.2463.
- [4] SALVADOR J P, VILAPLANA L, MARCO M P. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(9): 1703-1713. DOI:10.1007/s00216-019-01633-4.
- [5] HU Y Z, LIU C X, MUYLDERMANS S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1442. DOI:10.3389/fimmu.2017.01442.
- [6] ABULROB A, SPRONG H, VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P, et al. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells[J]. *J Neurochem*, 2005, 95(4): 1201-1214. DOI:10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x.
- [7] KRASNIQI A, D'HUYVETTER M, DEVOOGDT N, et al. Same-day imaging using small proteins: clinical experience and translational prospects in oncology[J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(6): 885-891. DOI:10.2967/jnumed.117.199901.
- [8] DUMOULIN M, CONRATH K, VAN MEIRHAEGHE A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability[J/OL]. *Protein Sci*, 2002, 11(3): 500-515[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2373476/>. DOI: 10.1110/ps.34602.
- [9] VUCHELEN A, O'DAY E, DE GENST E, et al. (1)H, (13)C and (15)N assignments of a camelid nanobody directed against human alpha-synuclein[J]. *Biomol NMR Assign*, 2009, 3(2): 231-233. DOI: 10.1007/s12104-009-9182-4.
- [10] DE GENST E, SILENCE K, DECANNIERE K, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(12): 4586-

- 4591[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1450215/>. DOI:10.1073/pnas.0505379103.
- [11] MUYLDERMANS S. Nanobodies: natural single-domain antibodies [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 775-797. DOI:10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- [12] BANNAS P, HAMBACH J, KOCH-NOLTE F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1603[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5702627/>. DOI:10.3389/fimmu.2017.01603.
- [13] KAZEMI-LOMEDASHT F, BEHDANI M, RAHIMPOUR A, et al. Selection and characterization of specific nanobody against human immunoglobulin G[J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2015, 34(3): 201-205. DOI:10.1089/mab.2014.0086.
- [14] VAIJAYANTHIMALA V, CHENG P Y, YEH S H, et al. The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an in vivo contrast agent[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(31): 7794-7802. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.06.084.
- [15] TEPLYAKOV A, OBMOLOVA G, MALIA T J, et al. Structural diversity in a human antibody germline library[J/OL]. *MABs*, 2016, 8(6): 1045-1063[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968113/>. DOI:10.1080/19420862.2016.1190060.
- [16] BARTHELEMY P A, RAAB H, APPLETON B A, et al. Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(6): 3639-3654. DOI:10.1074/jbc.M708536200.
- [17] ARBABI GHARROUDI M, DESMYTER A, WYNS L, et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies[J]. *FEBS Lett*, 1997, 414(3): 521-526. DOI:10.1016/S0014-5793(97)01062-4.
- [18] PÉREZ J M, RENISIO J G, PROMPERS J J, et al. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(1): 74-83. DOI:10.1021/bi0009082.
- [19] LIU W S, SONG H P, CHEN Q, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies[J]. *Mol Immunol*, 2018, 96: 37-47. DOI:10.1016/j.molimm.2018.02.012.
- [20] WANG Y Z, FAN Z, SHAO L, et al. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications[J/OL]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 3287-3303[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4959585/>. DOI:10.2147/IJN.S107194.
- [21] DEKEMPENEER Y, KEYAERTS M, KRASNIQI A, et al. Targeted alpha therapy using short-lived alpha-particles and the promise of nanobodies as targeting vehicle[J/OL]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(8): 1035-1047[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940885/>. DOI:10.1080/14712598.2016.1185412.
- [22] GAINKAM L O, HUANG L, CAVELIERS V, et al. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two <sup>99m</sup>Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT[J]. *J Nucl Med*, 2008, 49(5): 788-795. DOI:10.2967/jnumed.107.048538.
- [23] GAINKAM L O, KEYAERTS M, CAVELIERS V, et al. Correlation between epidermal growth factor receptor-specific nanobody uptake and tumor burden: a tool for noninvasive monitoring of tumor response to therapy[J]. *Mol Imaging Biol*, 2011, 13(5): 940-948. DOI:10.1007/s11307-010-0428-4.
- [24] WU X Y, LIU H J, LIU J Q, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 41-46. DOI:10.1038/nbt764.
- [25] D'HUYVETTER M, VINCKE C, XAVIER C, et al. Targeted radionuclide therapy with A <sup>177</sup>Lu-labeled anti-HER2 nanobody[J/OL]. *Theranostics*, 2014, 4(7): 708-720[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038753/>. DOI:10.7150/thno.8156.
- [26] DEBIE P, VAN QUATHAM J, HANSEN I, et al. Effect of dye and conjugation chemistry on the biodistribution profile of near-infrared-labeled nanobodies as tracers for image-guided surgery[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(4): 1145-1153. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.6b01053.
- [27] MOVAHEDI K, SCHOONOOGHE S, LAOUI D, et al. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4165-4177. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-2994.
- [28] ORTHMANN A, PEIKER L, FICHTNER I, et al. Improved treatment of MT-3 breast cancer and brain metastases in a mouse xenograft by LRP-targeted oxaliplatin liposomes[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12(1): 56-68.
- [29] PONDMAN K M, TSOLAKI A G, PAUDYAL B, et al. Complement deposition on nanoparticles can modulate immune responses by macrophage, B and T cells[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12(1): 197-216.
- [30] ALLEGRA A, INNAO V, GERACE D, et al. Nanobodies and cancer: current status and new perspectives[J]. *Cancer Investig*, 2018, 36(4): 221-237. DOI:10.1080/07357907.2018.1458858.
- [31] PAALANEN M M I, EKOKOSKI E, EL KHATTABI M, et al. The development of activating and inhibiting camelid VHH domains against human protein kinase C epsilon[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 42(4): 332-339. DOI:10.1016/j.ejps.2010.12.012.
- [32] MARSCHALL A L, DÜBEL S. Antibodies inside of a cell can change its outside: Can intrabodies provide a new therapeutic paradigm?[J/OL]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016, 14: 304-308[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990636/>. DOI:10.1016/j.csbj.2016.07.003.
- [33] VERCRUYSSSE T, PARDON E, VANSTREELS E, et al. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production [J/OL]. *J Biol Chem*, 2010, 285(28): 21768-21780[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2898381/>. DOI:10.1074/jbc.M110.112490.
- [34] VANDENBROUCKE K, DE HAARD H, BEIRNAERT E, et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis[J]. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(1): 49-56. DOI:10.1038/mi.2009.116.
- [35] TU Z, CHEN Q, LI Y P, et al. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk[J]. *Anal Biochem*, 2016, 493: 1-7. DOI:10.1016/j.ab.2015.09.023.
- [36] HE T, ZHU J, NIE Y, et al. Nanobody technology for mycotoxin detection in the field of food safety: current status and prospects[J/OL]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(5): E180[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983236/>. DOI:10.3390/toxins10050180.

- [37] TANG X Q, LI P W, ZHANG Q, et al. Time-resolved fluorescence immunochromatographic assay developed using two idiotypic nanobodies for rapid, quantitative, and simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in maize and its products[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(21): 11520-11528. DOI:10.1021/acs.analchem.7b02794.
- [38] PINTO TORRES J E, GOOSSENS J, DING J Z, et al. Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active Trypanosoma congolense infections[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9019[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5998082/>. DOI:10.1038/s41598-018-26732-7.
- [39] DING L, TIAN C P, FENG S, et al. Small sized EGFR1 and HER2 specific bifunctional antibody for targeted cancer therapy[J/OL]. *Theranostics*, 2015, 5(4): 378-398[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4329502/>. DOI:10.7150/thno.10084.
- [40] SHA H Z, ZOU Z Y, XIN K, et al. Tumor-penetrating peptide fused EGFR single-domain antibody enhances cancer drug penetration into 3D multicellular spheroids and facilitates effective gastric cancer therapy[J/OL]. *J Control Release*, 2015, 200: 188-200[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008032/>. DOI:10.1016/j.jconrel.2014.12.039.
- [41] VAN IMPE K, BETHUYNE J, COOL S, et al. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(6): R116[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979033/>. DOI:10.1186/bcr3585.
- [42] QIU Y L, LI P, DONG S, et al. Phage-mediated competitive chemiluminescent immunoassay for detecting Cry1Ab toxin by using an anti-idiotypic camel nanobody[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(4): 950-956. DOI:10.1021/acs.jafc.7b04923.
- [43] ZAFRA O, FRAILE S, GUTIÉRREZ C, et al. Monitoring biodegradative enzymes with nanobodies raised in Camelus dromedarius with mixtures of catabolic proteins[J]. *Environ Microbiol*, 2011, 13(4): 960-974. DOI:10.1111/j.1462-2920.2010.02401.x.
- [44] PAALANEN M M I, EKOKOSKI E, EL KHATTABI M, et al. The development of activating and inhibiting camelid VHH domains against human protein kinase C epsilon[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 42(4): 332-339. DOI:10.1016/j.ejps.2010.12.012.
- [45] MARSCHALL A L, DÜBEL S. Antibodies inside of a cell can change its outside: Can intrabodies provide a new therapeutic paradigm?[J/OL]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016, 14: 304-308[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990636/>. DOI:10.1016/j.csbj.2016.07.003.
- [46] VANDENBROUCKE K, DE HAARD H, BEIRNAERT E, et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis[J]. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(1): 49-56. DOI:10.1038/mi.2009.116.
- [47] WU W, LI S H, ZHANG W J, et al. A novel VHH antibody targeting the B cell-activating factor for B-cell lymphoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9481-9496[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4100105/>. DOI:10.3390/ijms15069481.
- [48] FUMEY W, KOENIGSDORF J, KUNICK V, et al. Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38<sup>+</sup> tumors in mouse models in vivo[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14289[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5662768/>. DOI:10.1038/s41598-017-14112-6.
- [49] BANNAS P, KOCH-NOLTE F. Perspectives for the development of CD38-specific heavy chain antibodies as therapeutics for multiple myeloma[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2559[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6232533/>. DOI:10.3389/fimmu.2018.02559.
- [50] 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[J]. *N Biotechnol*, 2013, 30(2): 205-209. DOI:10.1016/j.nbt.2012.09.002.
- [51] FANG T, DUARTE J N, LING J J, et al. Structurally defined  $\alpha$ MHC-II nanobody-drug conjugates: A therapeutic and imaging system for B-cell lymphoma[J/OL]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(7): 2416-2420[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820396/>. DOI:10.1002/anie.201509432.
- [52] VAN DE WATER J A, BAGCI-ONDER T, AGARWAL A S, et al. Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(41): 16642-16647[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3478609/>. DOI:10.1073/pnas.1202832109.
- [53] GRAY M A, TAO R N, DEPORTER S M, et al. A nanobody activation immunotherapeutic that selectively destroys HER2-positive breast cancer cells[J/OL]. *ChemBioChem*, 2016, 17(2): 155-158[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5199233/>. DOI:10.1002/cbic.201500591.
- [54] CORTEZ-RETAMOZO V, BACKMANN N, SENTER P D, et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2853-2857.
- [55] SHARIFZADEH Z, RAHBARIZADEH F, SHOKRGOZAR M A, et al. Genetically engineered T cells bearing chimeric nanoconstructed receptors harboring TAG-72-specific camelid single domain antibodies as targeting agents[J]. *Cancer Lett*, 2013, 334(2): 237-244. DOI:10.1016/j.canlet.2012.08.010.
- [56] MENZEL S, RISSIEK B, HAAG F, et al. The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs[J]. *FEBS J*, 2013, 280(15): 3543-3550. DOI:10.1111/febs.12313.
- [57] ORTHMANN A, PEIKER L, FICHTNER I, et al. Improved treatment of MT-3 breast cancer and brain metastases in a mouse xenograft by LRP-targeted oxaliplatin liposomes[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12(1): 56-68.
- [58] BAXEVANIS C N, PAPAMICHAIL M. Targeting of tumor cells by lymphocytes engineered to express chimeric receptor genes[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(10): 893-903. DOI:10.1007/s00262-004-0523-y.
- [59] ROTMAN M, WELLING M M, BUNSCHOTEN A, et al. Enhanced glutathione PEGylated liposomal brain delivery of an anti-amyloid single domain antibody fragment in a mouse model for Alzheimer's disease[J]. *J Control Release*, 2015, 203: 40-50. DOI:10.1016/j.jconrel.2015.02.012.
- [60] LEVITES Y, JANSEN K, SMITHSON L A, et al. Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice[J/OL]. *J Neurosci*, 2006, 26(46): 11923-11928[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6674861/>. DOI:10.1523/



- JNEUROSCI.2795-06.2006.
- [61] PONDMAN K M, TSOLAKI A G, PAUDYAL B, et al. Complement deposition on nanoparticles can modulate immune responses by macrophage, B and T cells[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12(1): 197-216.
- [62] ALIRAHIMI E, KAZEMI-LOMEDASHT F, SHAHBAZZADEH D, et al. Nanobodies as novel therapeutic agents in envenomation [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(12): 2955-2965. DOI:10.1016/j.bbagen.2018.08.019.
- [63] TALELLI M, OLIVEIRA S, RIJCKEN C J, et al. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1255-1260. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.064.
- [64] SHISHIDO T, AZUMI Y, NAKANISHI T, et al. Biotinylated bionocapsules for displaying diverse ligands toward cell-specific delivery[J]. *J Biochem*, 2009, 146(6): 867-874. DOI: 10.1093/jb/mvp134.
- [65] 王志明, 杨立霞. 纳米抗体应用于肿瘤治疗的研究现状[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(4): 431-436. DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002158.
- [66] ZAMEER A, KASTURIRANGAN S, EMADI S, et al. Anti-oligomeric A $\beta$  single-chain variable domain antibody blocks A $\beta$ -induced toxicity against human neuroblastoma cells[J]. *J Mol Biol*, 2008, 384(4): 917-928. DOI:10.1016/j.jmb.2008.09.068.
- [67] ROTMAN M, WELLING M M, BUNSCHOTEN A, et al. Enhanced glutathione PEGylated liposomal brain delivery of an anti-amyloid single domain antibody fragment in a mouse model for Alzheimer's disease[J]. *J Control Release*, 2015, 203: 40-50. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.02.012.
- [68] BEHAR G, SIBÉRI S, GROULET A, et al. Isolation and characterization of anti-Fc $\gamma$ RIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2008, 21(1): 1-10. DOI:10.1093/protein/gzm064.
- [69] ROZAN C, CORNILLON A, PÉTIARD C, et al. Single-domain antibody-based and linker-free bispecific antibodies targeting Fc $\gamma$ RIII induce potent antitumor activity without recruiting regulatory T cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(8): 1481-1491. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-12-1012.
- [70] SHARIFZADEH Z, RAHBARIZADEH F, SHOKRGOZAR M A, et al. Genetically engineered T cells bearing chimeric nanoconstructed receptors harboring TAG-72-specific camelid single domain antibodies as targeting agents[J]. *Cancer Lett*, 2013, 334(2): 237-244. DOI:10.1016/j.canlet.2012.08.010.
- [71] JAMNANI F R, RAHBARIZADEH F, SHOKRGOZAR M A, et al. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(1): 378-386. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.09.029.
- [72] ZHANG G, WANG L, CUI H L, et al. Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor[J]. *Sci Rep*, 2015, 4: 3571. DOI:10.1038/srep03571.
- [73] XIE Y J, DOUGAN M, JAILKHANIN, et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(33): 16656[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697796/>. DOI:10.1073/pnas.1912487116.
- [74] JAILKHANI N, INGRAM J R, RASHIDIAN M, et al. Noninvasive imaging of tumor progression, metastasis, and fibrosis using a nanobody targeting the extracellular matrix[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(28): 14181-14190[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628802/>. DOI: 10.1073/pnas.1817442116.
- [75] XIE Y J, DOUGAN M, JAILKHANI N, et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(16): 7624-7631[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6475367/>. DOI: 10.1073/pnas.1817147116.
- [76] HELSEN C W, HAMMILL J A, LAU V W C, et al. The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3049[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6076291/>. DOI:10.1038/s41467-018-05395-y.
- [77] DE MEYER T, MUYLDERMANS S, DEPICKER A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools[J]. *Trends Biotechnol*, 2014, 32(5): 263-270. DOI:10.1016/j.tibtech.2014.03.001.

[收稿日期] 2019-08-30

[修回日期] 2019-09-19

[本文编辑] 党瑞山