

DOI: 10.13376/j.cblls/2022054

文章编号: 1004-0374(2022)04-0468-09

纳米抗体在癌症治疗中的研究进展

周慧慧^{1,2,3}, 陈曲^{1,3,4}, 杨晓梅^{1,3*}, 卢小玲^{1,3,4*}

(1 广西医科大学广西纳米抗体研究重点实验室, 南宁 530021; 2 广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用协同创新中心, 南宁 530021; 3 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021; 4 广西医科大学口腔医学院, 南宁 530021)

摘要: 纳米抗体是一种单域抗体, 具有体积小 (~15 kDa)、稳定性好、易于加工和修饰、循环半衰期短、组织穿透性高、特异性和亲和力高等优点。因此, 纳米抗体在疾病治疗研究中极具吸引力。癌症是严重危害人类健康的一类疾病, 其治疗方法多种多样, 其中靶向治疗逐渐成为癌症治疗的重要疗法之一。该文回顾并展望了纳米抗体结合不同技术平台在癌症靶向治疗领域的应用。

关键词: 纳米抗体; 单域抗体; 癌症; 靶向治疗

中图分类号: R730.5 **文献标志码:** A

Recent advances in nanobody based therapeutics in cancer

ZHOU Hui-Hui^{1,2,3}, CHEN Qu^{1,3,4}, YANG Xiao-Mei^{1,3*}, LU Xiao-Ling^{1,3,4*}

(1 Key Laboratory for Nanobody Research of Guangxi, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 Collaborative Innovation Centre of Regenerative Medicine and Medical BioResource Development and Application, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3 International Nanobody Research Center of Guangxi, Nanning 530021, China; 4 College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Nanobodies are single-domain antibodies, with many properties such as small size (~15 kDa), stability, ease of labeling and engineering for diverse formats, short circulatory half-life, high tissue penetration, high specificity, and high affinity. Therefore, it is very attractive in the research of disease treatment. Cancer is a kind of disease which seriously endangers human health. There are many treatments for cancer, among which targeted therapy has become one of the most important treatments in cancer treatment. This article reviews and prospects applications of nanobodies combined with different technology platforms in the field of cancer targeted therapy.

Key words: nanobody; single-domain antibody; cancer; targeted therapy

在骆驼科动物^[1]和软骨鱼类^[2-3]体内发现的重链抗体 (heavy chain antibodies, HcAb) 为抗体研究领域开启了一个新纪元。HcAb 天然缺失轻链, 但仍然具有与抗原结合的能力, 其结合抗原的区域为可变区域片段 (variable domain of heavy chain-only antibody, VHH); 研究人员通过基因工程技术获得了 VHH, 其也被称为纳米抗体 (nanobody, Nb) 或单域抗体 (single-domain antibody, sdAb)^[4]。随后, Arbabi Ghahroudi 等^[5]成功构建了高度稳定表达骆驼来源的可溶性 Nb 的大肠杆菌, 为其开展商业应用提供了基础。自从被发现以来, Nb 被广泛应用于临床治疗领域 (表 1)^[6]。Caplacizumab 是迄今首个获批上市的 Nb

药物, 于 2018 年在欧盟获批, 随后又在美国、加拿大和澳大利亚等其他国家获批, 其适应症是获得性血栓性血小板减少性紫癜 (acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, aTTP), 其获批上市开创了 Nb 药物在临床应用的里程碑^[7]。随后, 恩维达 (恩沃利单抗注射液; 研发代号: KN035) 于 2021 年被我国国家药品监督管理局批准上市。恩维达目前被

收稿日期: 2021-12-28; 修回日期: 2022-02-24

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFE0117300)

*通信作者: E-mail: luxiaoling@gxmu.edu.cn (卢小玲); 260718428@qq.com (杨晓梅)

表1 Nb在癌症治疗药物中的开发情况

名称	靶点	适应症	研究机构	临床阶段(NCT编号)
恩沃利单抗(KN035)	PD-L1	微卫星不稳定性高, 泛瘤种(>15种实体瘤)	江苏康宁杰瑞生物制药有限公司	已上市
BI836880	Angiopoietin/VEGF	实体瘤	勃林格殷格翰	I 期临床试验(NCT02674152)
KN046	PD-L1/CTLA4	鳞状非小细胞肺癌	江苏康宁杰瑞生物制药有限公司	III 期临床试验(NCT04474119)
KN046	PD-L1/CTLA4	晚期肝癌	江苏康宁杰瑞生物制药有限公司	I 期临床试验(NCT04601610)
KN035	PD-L1	肝细胞性肝癌	湖南肿瘤医院	I 期临床试验(NCT03101488)
			苏州大学第一附属医院	
			复旦大学附属中山医院	
			军事医学科学院附属医院	
BCMA nanobody CAR-T细胞	CD8/4-1BB	复发/难治性骨髓瘤	郑州大学附属肿瘤医院	I 期临床试验(NCT03664661)
			河南肿瘤医院	
CD7 CAR-T细胞	CD7	T淋巴瘤/淋巴瘤	郑州大学第一附属医院	I 期临床试验(NCT04004637)
CD19/CD20 CAR-T细胞	CD19/CD20	B淋巴细胞白血病	郑州大学附属肿瘤医院	I 期临床试验(NCT03881761)
CD22 CAR-T cells	CD22	B淋巴细胞白血病	安徽省立医院	I 期临床试验(NCT03999697)
			博生吉医药科技(苏州)有限公司	
α PD1-MSLN-CAR T细胞	PD-1	大肠癌/卵巢癌	上海市第十人民医院	I 期临床试验早期(NCT04503980)
			上海细胞治疗集团	
α PD1-MSLN-CAR T细胞	PD-1	大肠癌	上海细胞治疗集团	I 期临床试验(NCT05089266)
α PD1-MSLN-CAR T细胞	PD-1	非小细胞肺癌/间皮瘤	华中科技大学同济医学院	I 期临床试验早期(NCT04489862)
γ T细胞注射剂	/	B淋巴细胞白血病	苏州大学第一附属医院	I 期临床试验早期(NCT04439721)
BCMA CAR-T细胞	BCMA	复发和难治性多发性骨髓瘤	普瑞金(深圳)生物技术有限公司	I 期临床试验早期(NCT03661554)
131 I-SGMIB Anti-HER2 VHH1	HER2	乳腺癌	布鲁塞尔大学	I 期临床试验(NCT02683083)

用于微卫星高度不稳定 (microsatellite instability high, MSI-H) 晚期结直肠癌和 MSI-H 晚期胃癌及 DNA 错配修复功能缺陷 (defective mismatch repair, dMMR) 晚期实体瘤的治疗^[8], 其上市无疑为癌症患者带来了新的希望, 也证明了 Nb 药物在肿瘤治疗方面的独特价值。本文将对 Nb 的新型筛选方法、结构特点及其在癌症治疗中的应用进行综述。

1 Nb的筛选方法

目前 Nb 主要通过免疫骆驼后采用噬菌体展示技术分离获得^[9], 这种方法相对直接, 但通过骆驼获取 Nb 的成本较高, 难以实现大规模研究和生产^[10]。于是, 有研究人员培育了能够通过 B 细胞产生 Nb 的转基因小鼠, 作为抗原免疫获得 Nb 的替代宿主^[11-12]。Janssens 等^[11] 构建了骆驼/人抗体杂交基因序列并嵌入小鼠骨髓瘤细胞基因组中, 注射该骨髓瘤细胞的小鼠在受到抗原刺激后成功表达了功能性 Nb。Xu 等^[12] 利用 CRISPR-Cas9 技术在小鼠胚胎干细胞中插入从羊驼、单峰骆驼和双峰骆驼中选出的 Nb 基因序列, 代替小鼠重链可变区 (variable heavy-chain domain, VH) 位点, 同时去除重链恒定区 (constant heavy-chain domain, CH) 外显子以避免抗体重链的错误折叠, 从而培育出了能在 B 细胞产生 Nb 的小鼠 (纳米小鼠), 该小鼠体内的 B 细胞可以产生高度特异性的 Nb, 有望促进 Nb 的广泛应用。此外, 还有针对靶蛋白 Nb 的体外筛选方法, 如合成或半合成的 cDNA 展示库技术^[13-14], 但该方法需要很大容量的基因文库和极其复杂的选

择程序, 且获得的 Nb 亲和力通常较低, 与靶标的结合解离常数为 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L, 因此目前还无法广泛实施^[15-17]。

2 Nb的特性

驼科动物体内的 HcAb 由 CH2、CH3 和 VH 组成, 缺乏了传统单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 的 CH1 结构域^[18] (图 1)。Nb 则是通过基因重组技术获得的 VHH 区域, 分子量仅为 12~15 kDa, 直径为 2.5 nm, 高度为 4 nm。Nb 中暴露于溶剂的框架区 2 (framework region 2, FR2) 比 mAb 中相应 VH 的框架区更具亲水性^[2]。另外, 虽然 mAb 的抗原结合位点由 6 个互补决定区 (complementarity determining regions, CDRs) 构成, 但 Nb 只有 3 个 CDRs, 却具有和 mAb 相似的结合亲和力。Nb 中独特的 CDR3 环结构在与抗原结合中起关键作用, 其平均长度为 18 个氨基酸, 而 mAb 的 CDR3 区只包含 12~14 个氨基酸; Nb 中 CDR3 环向外延伸, 能与蛋白质活性位点的凹形表位以高亲和力结合, 而这些凹形表位通常是 mAb 无法结合到的^[19-20]。CDR3 的长度越长, 意味着未结合抗原时的结构弹性越大, 这种结构在与抗原结合时被固定在单一构象中, 因此对结合产生熵惩罚。CDR1 (或 CDR2) 与 CDR3 之间的二硫键可以降低这种熵惩罚, 同时提高 Nb 的构象稳定性^[21]。此外, 相比于 mAb, Nb 中 CDR1 和 CDR2 的互补位中包含更多的疏水性氨基酸, 并且骨架区域中的残基也会参与抗原结合^[20]。因为 Nb 来源于驼科动物, 因此人类

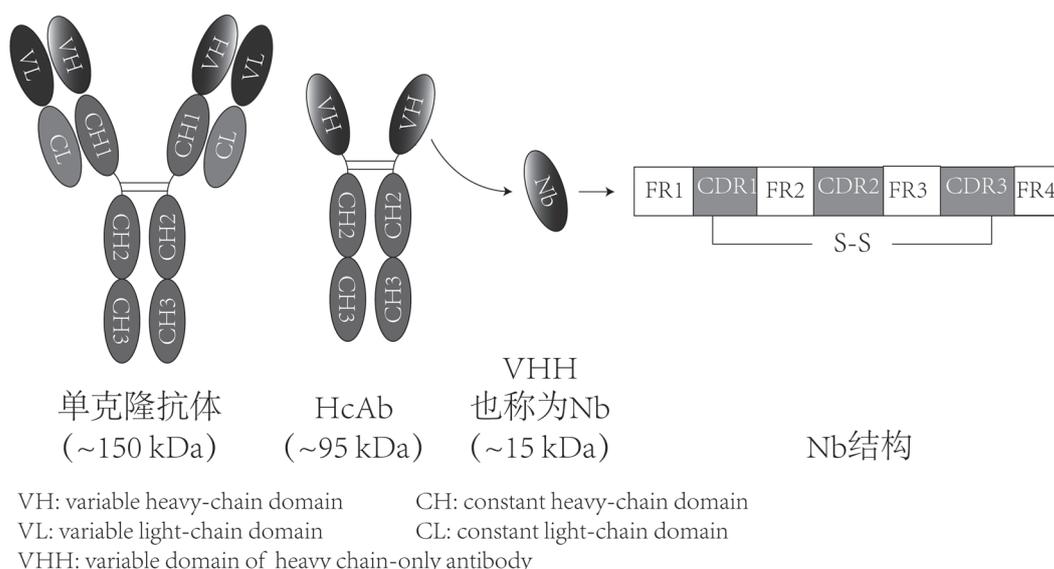


图1 Nb结构示意图

免疫系统会将其识别为弱免疫原性物质^[4]。针对这一问题, 可以通过将 Nb 人源化来降低免疫原性^[22]。

与 mAb 相比, Nb 的关键优势是它们在保留抗原结合力前提下分子量很小, 具备能够穿透致密组织的特征^[23], 有报道称一些 Nb 甚至能穿过脑内皮细胞层^[24]。小体积的 Nb 还可以靶向某些 mAb 难以接近的隐藏表位, 例如离子通道^[25]、G 蛋白偶联受体^[26]和免疫突触^[27]。此外, Nb 还具有易于编辑、免疫原性低、安全、成本相对低、(热)稳定性高、溶解性好等优点, 这使得 Nb 在癌症免疫治疗研究中备受关注^[28]。

3 Nb在癌症免疫治疗中的应用

长期以来, 手术、化疗和放疗一直是癌症的常规治疗方式, 然而这些疗法所伴随的副作用较大。近年来, 随着对癌症发生发展过程的日益了解, 靶向治疗利用抗体的选择性和特异性可以更有效地减少毒副作用, 成为目前癌症治疗的重要方式之一^[29]。目前发挥靶向作用的抗体多采用 mAb, 但其分子量较大, 存在组织渗透性不足的局限性, 而小体积的 Nb 作为 mAb 替代物, 已经在癌症免疫治疗方面开展了广泛的研究。Nb 的抗癌策略可以分为以下几类: (1) 靶向抑制致癌信号; (2) 靶向传递杀伤性物质; (3) 靶向放射性核素治疗; (4) 引导免疫细胞靶向杀伤癌细胞。下面将详细综述 Nb 在癌症免疫治疗中的最新进展。

3.1 利用Nb靶向抑制致癌信号

多种癌细胞由于受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 信号转导失调导致细胞出现生长、增殖和死亡之间的不平衡。在癌细胞中发生 RTK 信号转导失调的常见受体有血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 等。目前, 阻断这些通路的 Nb 已被开发并展开深入研究^[30]。

EGFR 通常在上皮来源的癌细胞表面过度表达, 在癌细胞的增殖、存活和血管生成中起重要作用^[31]。西妥昔单抗 (抗 EGFR mAb) 已被 FDA 批准用于临床治疗结直肠癌、鳞状上皮癌等癌症^[32]。有研究人员开发了由抗白蛋白 Nb 和抗 EGFR Nb 融合的复合物 CONAN-1, CONAN-1 能够抑制小鼠皮下 A431 异种移植瘤的生长, 延长荷瘤小鼠生存时间^[33]。HER2 是 EGFR 家族另一成员, 抗 HER2 Nb 特异性

靶向 HER2⁺ 癌细胞, 可在体外和异种移植瘤模型小鼠体内直接抑制 HER2⁺ 癌细胞增殖, 将来抗 HER2 Nb 有可能被用于 HER2⁺ 乳腺癌、卵巢癌等癌症的治疗^[34]。

VEGFR2 存在于血管内皮细胞上, 其配体 VEGF 由巨噬细胞和癌细胞等细胞分泌, 从而诱导下游信号通路参与细胞增殖、血管生成和转移^[35]。靶向 VEGFR2 或 VEGF 能抑制癌组织新生血管的形成, 从而切断癌细胞营养维持和氧气供应。Kazemi-Lomedasht 等^[36]在体外研究了抗 VEGFR2 Nb 对人脐静脉内皮细胞的作用, 发现抗 VEGFR2 Nb 可以抑制毛细血管样结构的形成, 表明抗 VEGFR2 Nb 有望被应用于抑制内皮细胞增殖的治疗中。

针对致癌信号的单价 Nb 显示出了一定的抑癌作用, 但是由于其分子量较小, 其循环半衰期也会较短, 肾脏的快速清除可能会降低病变组织药物浓度, 同时也可能产生肾毒性。为了适应复杂的疾病治疗方法, 设计多价或多特异性 Nb 形式, 或者给 Nb 连接上细胞毒性物质, 将会加强对癌细胞的杀伤强度, 同时也会延缓药物清除速率。接下来将会对此进行介绍。

3.2 利用Nb靶向传递杀伤物质

随着癌细胞对常规治疗耐药率的不断提高, 对新型抗癌药物的研究也越来越迫切。将 Nb 连接上细胞毒性物质, 可以借助 Nb 的靶向性避免对非靶向部位产生毒副作用。另外, 由于 Nb 分子量小, 容易被肾脏清除, 将 Nb 连接上细胞毒性物质还可以延长血浆半衰期。适合与 Nb 相结合的有: 癌症坏死因子相关的细胞凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 和死亡受体 (death receptor, DR); 各种毒素^[37-38]; 各种药物和载药纳米粒子^[39-40]; 光敏剂^[41]; 治疗性放射性核素^[42-44]等。下面将详细讨论。

Zhu 等^[45]构建了 TRAIL 与抗 EGFR Nb 结合的双功能分子 ENb-TRAIL, 并选用了几种对 EGFR 或 DR5 单独治疗反应不佳的癌细胞类型。研究发现, ENb-TRAIL 可诱导癌细胞膜上的 DR5 聚集, 从而使这些细胞对 TRAIL 和下游半胱天冬酶介导的细胞凋亡敏感。另外, 在原发性胶质母细胞瘤切除模型中, 应用基因编辑后表达 ENb-TRAIL 的干细胞作为双功能分子的持续来源, 发现 ENb-TRAIL 同时与癌细胞上的 EGFR 和 DR5 受体结合, 从而导致胞膜表面 DR5 聚集并诱导癌细胞凋亡^[45]。

免疫毒素 (immunotoxins, ITs) 是一类具有特异

性杀伤细胞能力的抗体-细胞毒素偶联嵌合分子。Nb 对癌组织特异性靶点有较好的靶向性,在癌组织局部穿透能力强,而 ITs (如假单胞菌外毒素、白喉毒素)具有高效的癌细胞杀伤活性^[46];将 ITs 和 Nb 偶联,在体内外实验中均观察到 ITs 会被靶向递送到癌细胞部位,有很好的特异性抗癌作用^[47-49]。但是,ITs 易被机体降解,通过构建多价 Nb 并且联合抗溶酶体酶的方法,可能会进一步提高 ITs 抗癌效率^[49]。

癌症的常见治疗药物有顺铂、卡铂、奥沙利铂、阿霉素等,但这些药物缺乏特异性,结合 Nb 后可以有效地将药物靶向癌细胞,减少化疗药物用量,从而减少副作用。Huang 等^[39]开发了两种包含抗 EGFR Nb 的融合蛋白,并将其偶联到马来酰亚胺功能化顺铂药物前体;经研究发现,与经典的顺铂治疗方法相比,新型药物在 EGFR⁺ 癌细胞部位的累积更多,能更好地延缓癌细胞的生长,且药物毒性较小。

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是一种新型的癌症治疗方法。在这种方法中,诱导局部细胞毒性需要三种基本元素:光活化光敏剂 (photosensitizer, PS)、特定波长的光和氧分子。活化的 PS 可以将能量转移到氧气中,并随后形成细胞毒性活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。ROS 会破坏癌细胞,损伤癌组织血管系统,并诱导免疫反应。常规 PDT 已经应用于临床,但该疗法的特异性和有效性仍有待提高。为此,通过连接 PS 分子与靶向癌细胞/血管系统的 Nb,可以特异性地将 PS 分子靶向癌组织局部^[50]。如抗 EGFR Nb、抗 VEGFR2 Nb 和光敏剂 IRDye700DX 复合物对内皮细胞和癌细胞具有双重靶向作用,可在癌组织局部聚集,更好地特异性诱导 EGFR⁺ VEGFR2⁺ 癌细胞的死亡^[50]。

目前大量研究结果显示,利用 Nb 将抗癌药物靶向递送到癌细胞的方法是可行且有效的,这类策略值得进一步研究,以便将这种技术从实验室转化到临床,改善癌症的治疗效果。

3.3 利用Nb进行靶向放射性核素治疗

靶向放射性核素治疗 (target radionuclide therapy, TRNT) 是一种日益流行的抗癌疗法,通过给 mAb、抗体片段或其他小分子载体标记适当的放射性同位素,从而将细胞毒性辐射传递给癌细胞,靶向杀伤癌细胞。目前一种 ⁹⁰Y 标记的抗 CD20 mAb (Ibritumomab tiuxetan) 以及类似的 ¹³¹I-tositumomab 已被 FDA 批准用于非霍奇金淋巴瘤的放射免疫治疗^[51]。然而,

因为核素标记的 mAb 在癌组织中渗透性差,对于体积大的实体瘤治疗效果仍不理想^[52]。因此,在实体瘤 TRNT 中,研究人员已经在探索用 Nb 作为 mAb 的替代品。D'Huyvetter 等^[42]首次在 TRNT 中使用 Nb 构建了 ¹⁷⁷Lu 标记的抗 HER2 Nb (2Rs15d),命名为 ¹⁷⁷Lu-DTPA-2Rs15d,并用来治疗荷 HER2⁺ SKOV3 异种移植瘤的小鼠。结果表明,与对照组相比,治疗组小鼠癌细胞几乎停止生长,无病生存期明显延长,肾脏未见炎症或坏死迹象。随后,¹³¹I 标记的同种 Nb 被用于乳腺癌患者的 I 期临床试验 (NCT02683083)。该课题组又在 I 期临床试验中评估了 ⁶⁸Ga 标记的 2Rs15d 在 HER2⁺ 原发癌中的治疗效果,发现药物会优先在原发癌部位和癌细胞转移部位中积累,在其他器官中积累量非常低,说明此种疗法相对安全^[53]。

总之,将 Nb 用放射性核素标记后可以提高癌组织部位对药物的摄取并减少肾脏药物积累,有很好的应用前景。

3.4 利用Nb引导免疫细胞靶向杀伤癌细胞

免疫细胞在机体中发挥免疫防御、免疫监视的作用,然而癌细胞衍生因子(如 TGF- β ^[54])或者免疫抑制信号使得这些免疫细胞无法发挥应有的作用。因此,研究人员探索了多种利用 Nb 重新调动和引导免疫细胞靶向杀伤癌细胞的治疗方法,其中包括细胞因子调节、T 细胞激动剂、构建嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞)、免疫检查点抑制剂等。

细胞因子是免疫系统的关键调节因子,其中许多细胞因子能激活和驱动免疫细胞杀伤癌细胞。然而,细胞因子的全身性递送通常伴随着毒性。因此,使细胞因子特异性地进入肿瘤微环境,可以增强免疫细胞的功能,减少细胞因子的毒性。目前已有研究利用 Nb 向癌细胞靶向递送细胞因子。Liu 等^[55]将抗癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) Nb 与白细胞介素 15 (interleukin-15, IL-15) 融合 (抗 CEA-IL15),发现该融合蛋白可识别 CEA⁺ 癌细胞,促进免疫细胞体外增殖。在异种移植瘤模型中,抗 CEA-IL15 靶向促进癌细胞周围免疫细胞 (NK 细胞、T 细胞、B 细胞) 的激活和增殖^[56]。Dougan 等^[57]将白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 与抗 PD-L1 Nb 偶联,发现其在黑色素瘤和胰腺癌模型中可向肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 递送细胞因子,抑制癌细胞生长,使癌组织浸润 T 细胞数量增加。

T 细胞的激活需要主要组织相容性复合物

(major histocompatibility complex, MHC)/ 抗原肽复合物与 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 结合, 然后由 CD3 ζ 向细胞内传递活化信号。因此, 研究人员开发了新型 T 细胞激动剂 (light T cell engagers, LiTEs): LiTEs 在结构上包括了抗肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAA) 抗体与抗 CD3 ζ 抗体, 将癌细胞和 T 细胞连接起来, 在不存在 MHC- I 信号时模拟 CD3 ζ 信号转导, 交联活化 T 细胞, 使得活化 T 细胞靶向癌细胞, 同时分泌细胞因子和细胞毒效应蛋白, 从而诱导靶细胞凋亡。基于单链抗体 (single chain fragment variable, scFv) 的 LiTEs 已被证实具有抗癌能力, 但效果不理想。Harwood 等^[58] 构建了新型 T 细胞招募双特异性抗体——ATTACK (asymmetric tandem trimerbody for T cell activation and cancer killing), 其由三价抗 EGFR Nb 和单价抗 CD3 scFv 构成。研究表明, ATTACK 可以高效靶向并激活 T 细胞, 其效力比 1+1 LiTE (单价抗 EGFR Nb 偶联单价抗 CD3 scFv) 高 15 倍以上; 尽管 ATTACK 结构复杂, 但其仍然具有溶解性好、表达量高、稳定性好的特点。这表明 Nb 在 LiTE 设计中更加易于编辑, 并且依然能保证对 T 细胞的特异性激活能力。

嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) T 细胞是将自体 T 细胞分离后进行基因修饰, 使其能在 MHC 非依赖性条件下识别并靶向杀伤癌细胞。CAR 通常由单个基因构成, 目前大多数研究集中在胞内信号转导结构域的优化上, 而 CAR 的胞外抗原结合区通常为 scFv, 这方面的优化研究较少^[59]。随着研究进一步深入, 用 scFv 作为抗原识别区的 CAR 逐渐显现出一些弊端。scFv 容易发生错配, 其免疫原性和不稳定性易诱发体内抗 CAR 免疫反应, 导致 T 细胞过早耗竭^[60], 进而限制临床疗效。因此, 急需探索 CAR 抗原识别区的新型替代结构。目前, 多个研究团队已经成功构建了以 Nb 作为胞外抗原结合域的 CAR (nanoCAR), 这些 nanoCAR 可以靶向包含不同 TAA (如 VEGFR2^[61]、CD20&CD33^[62]、CD38^[63] 等) 的癌症, 在研究中对目标癌细胞均表现出细胞毒活性。此外, 南京 Legend Biotech 公司构建了一种新型 CAR-T 细胞 (命名为 LCAR-B38M), 其串联了两种靶向骨髓瘤细胞高表达的 B 细胞成熟抗原 (B cell maturation antigen, BCMA) 的特异性 Nb, 他们利用该细胞开展了针对骨髓瘤患者的 I / II 期临床试验^[64-65]。在 II 期临床试验中, 受试的 17 例复发 / 难治性骨髓瘤患者客观缓解率为

88.2%, 随访 (随访时间中位数为 417 d) 中 8 例 (47.1%) 处于持续应答状态, 6 例持续应答超过 11 个月; 与其他 BCMA 相关的 CAR-T 试验数据相比, LCAR-B38M 治疗效果更好, 增加了抗原识别的特异性, 也可能增加了抗原结合亲和力, 从而产生了更强的抗癌效应^[64]。2019 年, Legend Biotech 公司又开启了用 CD19/CD20 双特异性 nanoCAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤的 I 期临床试验 (NCT03881761)。随着研究不断深入, nanoCAR 所表现出的与传统 CAR 相当的临床疗效将拓宽 CAR-T 治疗潜力, 以便治疗更多复杂的疾病。

免疫检查点 (immune checkpoint, ICP) 是免疫细胞激活的调控分子, 其中, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)、程序性死亡受体 1 (programmed death receptor 1, PD-1) 和程序性死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 等是常见的负性调控分子。免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 可以拮抗免疫检查点的作用。FDA 已批准抗 CTLA-4 mAb (ADG116)、抗 PD-1 mAb (Nivoluma) 和抗 PD-L1 mAb (Avelumab) 等几种 ICIs, 且此类药物对很多癌症患者有治疗作用, 但仍有少部分肿瘤患者对此类药物无反应。为了寻求解决方案, Nb 被作为潜在的 ICIs 进行了深入的探索。PD-1 在活化的 T 细胞上高表达, 癌细胞所表达的 PD-L1 会结合 PD-1 进而抑制 T 细胞抗癌活性, 而靶向 PD-L1 的抗体可以抵消这种免疫抑制^[66]。2021 年, 康宁杰瑞公司所生产的恩维达被批准上市^[8]: 恩维达是全球首个人源化抗 PD-L1 Nb 和人 IgG1 Fc 的新型融合蛋白, 分子量较小, 在肿瘤组织中穿透速度快, 被用于 MSI-H 晚期结直肠癌和 MSI-H 晚期胃癌及 DNA dMMR 晚期实体瘤的治疗; 不同于 mAb 药物的静脉注射 (给药时间约 30 min) 给药方式, 恩维达选择了皮下注射 (给药时间约 30 s), 避免了输注反应。皮下注射给药可以提高肿瘤患者用药依从性, 符合未来将肿瘤作为慢性病长期管理的趋势。

虽然 mAb 在正常情况下能与靶标产生良好的结合作用, 从而发挥治疗效果, 但 Nb 在识别特殊表位并发挥中和作用方面有更好的应用前景。Nb 的独特优势将促进其在细胞基因工程和免疫检查点抑制剂研究中发挥重要作用。大量临床前研究已经评估了 Nb 在这方面的抗癌优势和潜力, 有一部分药物已进入临床试验阶段。

4 总结

本文概述了Nb最新筛选方法、Nb结构特性及其在癌症免疫治疗领域的研究现状和应用前景。Nb与传统mAb不同,具有小尺寸、高效抗原特异性、高亲和力和稳定性,能够靶向TAA、肿瘤微环境或免疫细胞,结合隐蔽的抗原表位。但是,Nb在治疗应用中仍然存在局限性,例如肾脏的快速清除可能会降低肿瘤组织药物浓度,同时也可能产生肾毒性。因此,结合癌症经典治疗手段,Nb可以辅助递送化疗药物或放射性核素,延长药物在病变部位的半衰期,这种癌症靶向治疗方法已经成为减少毒副作用的有效策略。另外,Nb还被用于免疫细胞过继疗法和免疫检查点抑制剂的研究。令人鼓舞的是,2021年,康宁杰瑞公司所生产的恩维达被批准上市用于治疗实体瘤,是全球首个通过皮下注射给药的抗PD-L1 Nb和人IgG1 Fc的新型融合蛋白药物。此外,大量基于Nb的临床试验也在进行中。通过合理的治疗策略,Nb将有望在靶向治疗方面成为mAb的补充或替代品。

[参 考 文 献]

- [1] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363: 446-8
- [2] 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: 1129-35
- [3] Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF, et al. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science*, 2004, 305: 1770-3
- [4] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 775-97
- [5] Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*, 1997, 414: 521-6
- [6] Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*, 2016, 21: 1076-113
- [7] Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 2016, 374: 511-22
- [8] Li J, Deng Y, Zhang W, et al. Subcutaneous envafolimab monotherapy in patients with advanced defective mismatch repair/microsatellite instability high solid tumors. *J Hematol Oncol*, 2021, 14: 95
- [9] Pardon E, Laeremans T, Triest S, et al. A general protocol for the generation of nanobodies for structural biology. *Nat Protoc*, 2014, 9: 674-93
- [10] Lecocq Q, De Vlaeminck Y, Hanssens H, et al. Theranostics in immuno-oncology using nanobody derivatives. *Theranostics*, 2019, 9: 7772-91
- [11] Janssens R, Dekker S, Hendriks RW, et al. Generation of heavy-chain-only antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 15130-5
- [12] Xu J, Xu K, Jung S, et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. *Nature*, 2021, 595: 278-82
- [13] 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
- [14] 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: 343
- [15] Comor L, Dolinska S, Bhide K, et al. Joining the *in vitro* immunization of alpaca lymphocytes and phage display: rapid and cost effective pipeline for sdAb synthesis. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 13
- [16] Itoh K, Reis AH, Hayhurst A, et al. Isolation of nanobodies against *Xenopus* embryonic antigens using immune and non-immune phage display libraries. *PLoS One*, 2019, 14: e0216083
- [17] Suzuki T, Mochizuki Y, Kimura S, et al. Anti-survivin single-domain antibodies derived from an artificial library including three synthetic random regions by *in vitro* selection using cDNA display. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503: 2054-60
- [18] Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, et al. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*, 1997, 34: 1121-31
- [19] Al Qaraghuli MM, Ferro VA. Analysis of the binding loops configuration and surface adaptation of different crystallized single-domain antibodies in response to various antigens. *J Mol Recognit*, 2017, 30: 10
- [20] Zavrtnik U, Lukan J, Loris R, et al. Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. *J Mol Biol*, 2018, 430: 4369-86
- [21] Govaert J, Pellis M, Deschacht N, et al. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J Biol Chem*, 2012, 287: 1970-9
- [22] Arbabi-Ghahroudi M. Camelid single-domain antibodies: historical perspective and future outlook. *Front Immunol*, 2017, 8: 1589
- [23] Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging? *Theranostics*, 2014, 4: 386-98
- [24] Li T, Bourgeois JP, Celli S, et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J*, 2012, 26: 3969-79
- [25] Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med*, 2016, 8:

- 366ra162
- [26] Manglik A, Kobilka BK, Steyaert J. Nanobodies to study G protein-coupled receptor structure and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57: 19-37
- [27] Cartwright AN, Griggs J, Davis DM. The immune synapse clears and excludes molecules above a size threshold. *Nat Commun*, 2014, 5: 5479
- [28] Chanier T, Chames P. Nanobody engineering: toward next generation immunotherapies and immunoimaging of cancer. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8:13
- [29] Maniam S, Maniam S. Small molecules targeting programmed cell death in breast cancer cells. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 9722
- [30] Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol*, 2017, 8: 1603
- [31] Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, et al. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 2005.0010
- [32] Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2006, 6: 29-31
- [33] Ebrahimizadeh W, Mousavi Gargari SL, Javidan Z, et al. Production of novel VHH nanobody inhibiting angiogenesis by targeting binding site of VEGF. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176: 1985-95
- [34] Yan Y, Cheng X, Li L, et al. A novel small molecular antibody, HER2-nanobody, inhibits tumor proliferation in HER2-positive breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Front Oncol*, 2021, 11: 669393
- [35] Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 2007, 19: 2003-12
- [36] Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Bagheri KP, et al. Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. *Mol Immunol*, 2015, 65: 58-67
- [37] Tang J, Li J, Zhu X, et al. Novel CD7-specific nanobody-based immunotoxins potently enhanced apoptosis of CD7-positive malignant cells. *Oncotarget*, 2016, 7: 34070-83
- [38] Li T, Qi S, Unger M, et al. Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody. *Sci Rep*, 2016, 6: 27055
- [39] Huang H, Wu T, Shi H, et al. Modular design of nanobody-drug conjugates for targeted-delivery of platinum anticancer drugs with an MRI contrast agent. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55: 5175-78
- [40] Stenton BJ, Oliveira BL, Matos MJ, et al. A thioether-directed palladium-cleavable linker for targeted bioorthogonal drug decaging. *Chem Sci*, 2018, 9: 4185-89
- [41] van Lith SAM, van den Brand D, Wallbrecher R, et al. The effect of subcellular localization on the efficiency of EGFR-targeted VHH photosensitizer conjugates. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 124: 63-72
- [42] D'Huyvetter M, De Vos J, Xavier C, et al. ¹³¹I-labeled anti-HER2 camelid sdab as a theranostic tool in cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 6616-28
- [43] Dekempeneer Y, Keyaerts M, Krasniqi A, et al. Targeted alpha therapy using short-lived alpha-particles and the promise of nanobodies as targeting vehicle. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16: 1035-47
- [44] Choi J, Vaidyanathan G, Koumariou E, et al. Astatine-211 labeled anti-HER2 5F7 single domain antibody fragment conjugates: radiolabeling and preliminary evaluation. *Nucl Med Biol*, 2018, 56: 10-20
- [45] Zhu Y, Bassoff N, Reinshagen C, et al. Bi-specific molecule against EGFR and death receptors simultaneously targets proliferation and death pathways in tumors. *Sci Rep*, 2017, 7: 2602
- [46] Naderi S, Roshan R, Behdani M, et al. Inhibition of neovascularisation in human endothelial cells using anti NRP-1 nanobody fused to truncated form of diphtheria toxin as a novel immunotoxin. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43: 230-8
- [47] 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: 205-9
- [48] Yu Y, Li J, Zhu X, et al. Humanized CD7 nanobody-based immunotoxins exhibit promising anti-T-cell acute lymphoblastic leukemia potential. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 1969-83
- [49] Khirehgesh MR, Sharifi J, Safari F, et al. Immunotoxins and nanobody-based immunotoxins: review and update. *J Drug Target*, 2021, 29: 848-62
- [50] Mashayekhi V, Xenaki KT, van Bergen En Henegouwen PMP, et al. Dual targeting of endothelial and cancer cells potentiates *in vitro* nanobody-targeted photodynamic therapy. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 2732
- [51] Vose JM, Bierman PJ, Loberiza FR, et al. Phase II trial of ¹³¹Iodine tositumomab with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for relapsed diffuse large B cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013, 19: 123-8
- [52] Myers R, Harvey M, Kaufmann TJ, et al. Toxicology study of repeat intracerebral administration of a measles virus derivative producing carcinoembryonic antigen in rhesus macaques in support of a phase I/II clinical trial for patients with recurrent gliomas. *Hum Gene Ther*, 2008, 19: 690-8
- [53] Keyaerts M, Xavier C, Heemskerk J, et al. Phase I study of ⁶⁸Ga-HER2-nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. *J Nucl Med*, 2016, 57: 27-33
- [54] Van der Jeught K, Bialkowski L, Daszkiewicz L, et al. Targeting the tumor microenvironment to enhance antitumor immune responses. *Oncotarget*, 2015, 6: 1359-81
- [55] Liu Y, Wang Y, Xing J, et al. A novel multifunctional anti-CEA-IL15 molecule displays potent antitumor activities. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 2645-54
- [56] Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine

- design. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 595-601
- [57] Dougan M, Ingram JR, Jeong HJ, et al. Targeting cytokine therapy to the pancreatic tumor microenvironment using PD-L1-specific VHHs. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6: 389-401
- [58] Harwood SL, Alvarez-Cienfuegos A, Nunez-Prado N, et al. ATTACK, a novel bispecific T cell-recruiting antibody with trivalent EGFR binding and monovalent CD3 binding for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2017, 7: e1377874
- [59] You F, Wang Y, Jiang L, et al. A novel CD7 chimeric antigen receptor-modified NK-92MI cell line targeting T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Cancer Res*, 2019, 9: 64-78
- [60] Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 224ra25
- [61] Hajari Taheri F, Hassani M, Sharifzadeh Z, et al. T cell engineered with a novel nanobody-based chimeric antigen receptor against VEGFR2 as a candidate for tumor immunotherapy. *IUBMB Life*, 2019, 71: 1259-67
- [62] De Munter S, Van Parys A, Bral L, et al. Rapid and effective generation of nanobody based cars using PCR and Gibson Assembly. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 883
- [63] Hambach J, Riecken K, Cichutek S, et al. Targeting CD38-expressing multiple myeloma and burkitt lymphoma cells *in vitro* with nanobody-based chimeric antigen receptors (Nb-CARs). *Cells*, 2020, 9: 321
- [64] Xu J, Chen LJ, Yang SS, et al. Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 9543-51
- [65] Zhao WH, Liu J, Wang BY, et al. A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 141
- [66] Broos K, Lecocq Q, Keersmaecker B, et al. Single domain antibody-mediated blockade of programmed death-ligand 1 on dendritic cells enhances CD8 T-cell activation and cytokine production. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7: 85