

综述



李典范, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(上海生物化学与细胞生物学研究所)研究员、博士生导师, 任中国生物物理学会分子生物物理分会理事、国际生物大分子结晶组织(IOBCr)理事, 中组部“青年千人”计划、上海市“浦江人才”计划获得者。主要研究脂质代谢及蛋白质脂修饰中重要膜蛋白的结构功能, 在磷脂和胆固醇代谢、糖脂修饰蛋白合成与分泌过程中膜蛋白及复合物的分子机制研究方面取得了一系列重要发现, 在*Nature*、*Nat Commun*、*Proc Natl Acad Sci USA*等国际期刊发表论文50余篇。

纳米抗体研究现状与应用前景

李婷婷, 李典范*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海生物化学与细胞生物学研究所
核糖核酸功能与应用重点实验室, 上海 200031)

摘要: 纳米抗体是骆驼科动物体内存在的重链抗体中的可变区片段, 相对分子质量小, 稳定性高, 易于蛋白质工程改造。纳米抗体可以通过动物免疫获取, 因其结构简单, 亦适合构建超高丰度和高效的化学合成库进行体外筛选。在基础的蛋白质科学研究中, 纳米抗体是膜蛋白结构生物学研究中重要的工具蛋白, 并可作为构象特异性抗体探测与捕捉功能构象。在生物医学应用研究中, 作为“下一代”抗体, 纳米抗体广泛应用于药物靶向递送、肿瘤免疫治疗、标志物检测、生物成像、蛋白质靶向降解、抗病毒感染等方面。本文就纳米抗体在上述领域的研究现状进行简单综述, 并展望其应用前景。

关键词: 纳米抗体; 人工合成库; 膜蛋白结构生物学; 靶向递送

Research progress and application prospects of nanobodies

LI Tingting, LI Dianfan*

(Key Laboratory of RNA Innovation, Science and Engineering, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai
Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Nanobodies are variable domain fragments derived from the heavy-chain-only antibodies found in camelids. Nanobodies are characterized by their small molecular weight, high stability, and high amenability. Nanobodies can be obtained through immunization of animals. Due to their simple structure, they are also suitable for constructing ultra-high abundance and efficient synthetic libraries for *in vitro* screening. In protein sciences, nanobodies serve as important tool proteins in the study of membrane protein structural biology and as conformation-specific antibodies to detect and capture functional conformations. In biomedical applications, nanobodies, known as the “next generation” antibodies, are widely used in targeted drug delivery, cancer

收稿日期: 2024-07-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(82151215, 32201000)

第一作者: E-mail: litingting2015@sibcb.ac.cn

*通信作者: E-mail: dianfan.li@sibcb.ac.cn

immunotherapy, biomarker detection, bioimaging, targeted protein degradation, and antiviral infection. This review provides a brief overview of the current research progress of nanobodies in these fields and discusses their potential applications.

Key Words: nanobody; synthetic library; membrane protein structural biology; targeted delivery

纳米抗体(nanobody, Nb)是骆驼科(如骆驼、羊驼)或鲨鱼科动物体内独特的重链抗体的可变区片段(variable heavy domain of heavy chain, VHH), 亦称为单域抗体(single-domain antibody, sdAb)。与传统抗体相比, 纳米抗体具有结构简单、相对分子质量小(约15 000)、稳定性强、免疫原性低、穿透力强等特点。这些优点使得纳米抗体在基础研究和生物医学应用中展现出巨大潜力。

纳米抗体结构上的简单性决定了其往往识别三维表位, 因而具有构象选择性。在研究动态性强的蛋白质结构与功能时, 纳米抗体可以用于锁定单一构象, 从而帮助结构解析。因为其单域、不存在轻重链配对的特点, 使得纳米抗体的文库筛选相对简单。一些高效人工合成文库的出现加速了纳米抗体的筛选过程。

纳米抗体相对分子质量小, 能够更好地穿透组织和细胞屏障, 有助于靶向特定细胞和分子, 应用于生物成像。由于其高特异性和高亲和力, 纳米抗体被广泛应用于疾病的早期诊断和生物标志物的检测及病毒、细菌的检测。利用纳米抗体的靶向性, 将其与药物、纳米颗粒等载体结合, 可实现精确的药物递送, 减少不良反应, 提高治疗效果。

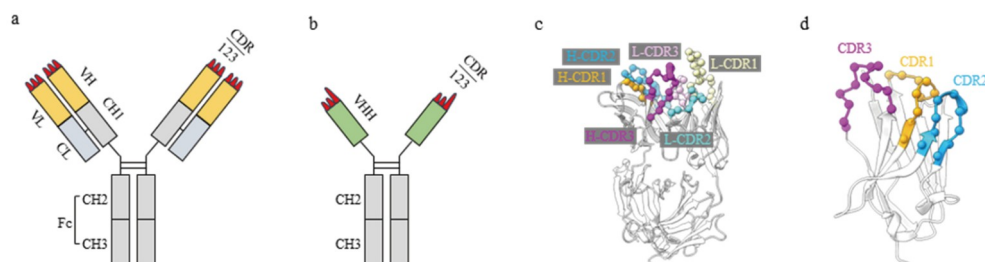
因为这些特点, 纳米抗体被称为“下一代抗体”, 在生物医学领域有巨大应用前景。美国食

品药品监督管理局于2019年批准了治疗成人获得性血栓性血小板减少性紫癜的Caplacizumab纳米抗体药物。其他纳米抗体药物如治疗类风湿关节炎的Vobarilizumab与Ozoralizumab、治疗呼吸道合胞病毒感染的ALX-0171也处于不同的临床研究阶段。本文就纳米抗体在基础科学与生物医学应用领域的研究现状作简单综述。

1 纳米抗体的结构特征

传统抗体由重链与轻链组成。重链包含一个可变区(variable region of the heavy chain, VH)与三个恒定区(constant region of the heavy chain, CH1、CH2、CH3), 后两个恒定区形成可结晶片段(fragment crystalizable, Fc), 负责与免疫系统中其他的细胞或分子相互作用。轻链则包含一个可变区与一个恒定区(图1a)。骆驼科的重链抗体不含轻链, 而且其重链亦不含CH1(图1b), 因此其VHH(纳米抗体)能够独立识别抗原。

与传统抗体的重链可变区相似, 纳米抗体包含三个互补决定区(complementarity determining region, CDR), 其中CDR1与CDR2相对较短, 而CDR3较长(图1b), 在抗原识别中贡献也最大。在传统抗体结构中, 轻链与重链的6个CDR既可识别三维表位, 也可形成一个口袋, 从而识别线性的抗原表位(如多肽标签)(图1c)。但由于缺乏配对,



a: 传统抗体的结构示意图; b: 纳米抗体的结构示意图; c: 一个典型传统抗体Fab区的三维结构。结构来自于文献^[6]; d: 一个典型纳米抗体的三维结构。结构来自于文献^[7]。CDR: 互补决定区; CH: 重链恒定区; CL: 轻链恒定区; Fc: 可结晶区; H-CDR: 重链互补决定区; L-CDR: 轻链互补决定区; VH: 重链可变区; VL: 轻链可变区

图1 纳米抗体与传统抗体的结构区别

纳米抗体的三个CDR很难形成结合口袋, 因此其抗原表位多为三维表位(图1d)。相应地, 目前针对短肽的高亲和力纳米抗体相对有限, 包括结合活性 α -突触核蛋白中短肽EPEA序列的NbSyn2^[1,2]、结合 β -环连蛋白短肽的BC2纳米抗体^[3]、结合UBC6e蛋白短肽的VHH05^[4]以及结合Alfa标签的NbAlfa^[5]等。其中, BC2短肽在与纳米抗体结合的过程中形成一个 β -折叠, 与纳米抗体的 β 片层形成延伸, 实现高亲和力结合。而Alfa标签短肽实质上亦形成了 α -螺旋结构, 因此严格意义上仍属于三维表位。

2 纳米抗体的筛选与表达纯化

纳米抗体可以由免疫动物以及从化学合成库进行筛选而获得。二者在后期筛选方法上存在交叉。

2.1 动物免疫及筛选

最初获得纳米抗体的方式是将纯化的抗原与佐剂混合后, 使用皮下或肌肉注射的方式, 注射到骆驼科动物体内。通常在初次注射后, 每隔2~3周进行一次加强注射, 共注射3~4次。在最后注射的几天内, 从动物体内采集外周血样, 获得免疫后的B细胞。对B细胞进行富集后, 提取mRNA, 反转录获得cDNA后进行噬菌体文库的构建。构建到噬菌体文库后, 一般将抗原固定至磁珠、96孔板等固相介质, 对扩增后的噬菌体反复淘选。使用酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)进行单克隆筛选后, 即可测序获得可结合抗原的纳米抗体克隆序列^[8](图2a)。该方法的优点是获得的纳米抗体亲和力较高。但是, 对于一些特殊的蛋白质如毒性蛋白则存在技术屏障。如在膜蛋白研究中, 注射抗原后, 如果去垢剂被去除过度, 可能造成抗原变性, 从而难以获得有效抗体。此外, 因为涉及到动物实验, 成本较高。

2.2 人工合成纳米抗体噬菌体文库

基于纳米抗体结构的简单性, 可以通过固定纳米抗体骨架序列, 在CDR引入随机氨基酸的方法, 利用化学合成技术构建文库。一般地, 化学合成库采用合成引物的方式, 合成时逐步添加三联体核苷酸, 以避免引入终止密码子而造成无效的文库丰度。此外, 建库时还需要优化氨基酸的组成比例。

确定这些策略后, 将纳米抗体基因插入噬菌体衣壳蛋白基因中(通常是gⅢ或gⅧ), 使得纳米抗体可以展示在噬菌体表面。这些噬菌体可在大肠杆菌中扩增。通过多轮筛选, 可以富集出与靶抗原具有高亲和力和特异性的噬菌体, 对其测序即可获得所对应的纳米抗体编码序列。

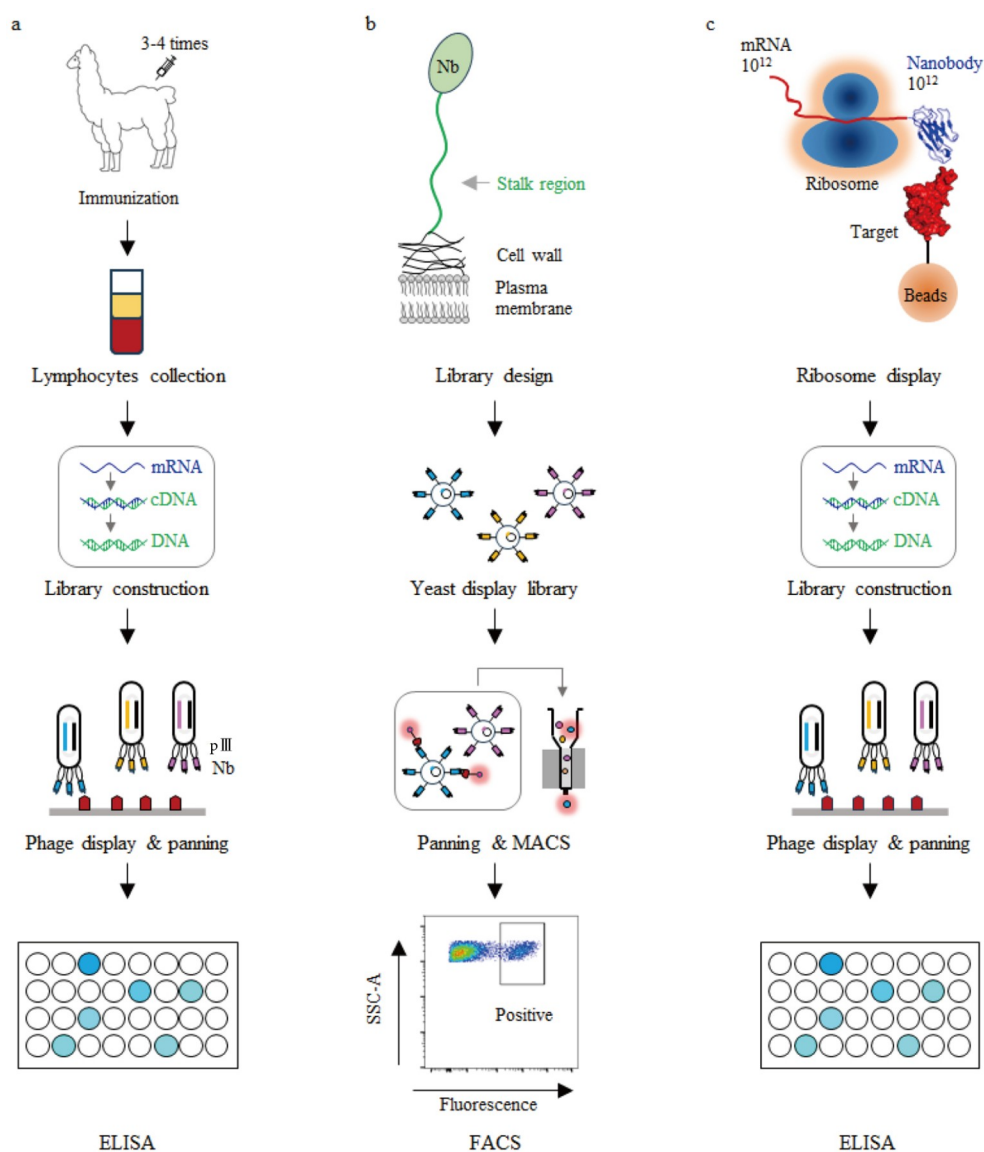
因为噬菌体的颗粒小, 噬菌体文库的丰度通常可达到 $10^8 \sim 10^{10}$ 。最早的纳米抗体人工噬菌体文库由Moutel等^[9]设计, 其CDR1与CDR2长度固定为7个氨基酸, 而CDR3长度则包含四种(7、12、15和18个氨基酸)。Contreras等^[10]基于结构特征设计了CDR3长度为10个氨基酸残基、丰度为 10^8 的噬菌体文库, 并使用该文库筛选获得了针对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等的纳米抗体。

2.3 人工合成酵母展示文库

与噬菌体或细菌不同, 酵母细胞较大(5~10微米), 可被流式细胞仪检测到, 因此, 酵母展示可以实现单细胞水平上的分选。McMahon等^[11]通过磷脂酰肌醇锚定蛋白质的信号肽序列, 将纳米抗体展示在酵母细胞壁的甘露糖蛋白层(图2b)。与噬菌体文库筛选的原理类似, 将抗原固定在磁珠上可对初始文库进行富集。在酵母展示文库中加入荧光标记的抗原后, 根据染色的高低即可分离出特异性结合抗体。该方法在筛选构象特异性抗体中尤其有优势。G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)存在两种构象: 激活构象与拮抗构象, 前者受激动剂诱导, 而后者受拮抗剂诱导。为了筛选获得特异性针对某一构象的抗体, 可在激动剂或拮抗剂结合的GPCR上标记不同颜色的荧光染料, 继而在流式分选时根据构象特异的荧光信号筛选具有构象选择性的纳米抗体。

在新冠病毒的研究中, Schoof等^[12]使用该文库获得了数个中和纳米抗体, 并获得了将新冠病毒S蛋白锁定在闭合状态下的纳米抗体。这些纳米抗体在串联改造成三联体后, 呈现了很强的抗病毒侵染活性, IC_{50} 达到1.2 nmol/L。

酵母展示技术的一个潜在的劣势在于其较低的丰度。因为酵母细胞尺寸大, 维持高丰度的文库需要大体积的细胞培养体系。目前, 酵母展示文



a: 羊驼免疫法; b: 酵母展示文库筛选法; c: 核糖体展示文库筛选法。ELISA: 酶联免疫法; FACS: 流式分选; Nb: 纳米抗体

图2 常见的纳米抗体筛选方法示意图

库的丰度一般在 $10^7 \sim 10^8$ 。

2.4 人工合成核糖体展示文库

纯化的核糖体可以利用mRNA作为模版,使用tRNA作为底物合成蛋白质。如果mRNA中缺乏终止密码子,在翻译完成后mRNA仍可停留在核糖体上,这样即可形成核糖体、mRNA、新生蛋白链的复合物(图2c)。在核糖体展示的人工纳米库中,mRNA即为编码随机纳米抗体的序列。因为纳米抗体结构的简单性及蛋白质的高稳定性,其在体外翻译时可成功折叠。在体外翻译完成后,加入标记在亲和珠上的抗原,即可通过抗原抗体相互作用

将含mRNA、新生纳米抗体、核糖体的复合物保留在沉淀中,而且复合物被保留的可能性与抗体抗原亲和力直接相关。因此,通过核糖体展示实现了表型(亲和力)与遗传型(mRNA)之间的偶联。对沉淀中的mRNA进行纯化后,对其进行反转录获得cDNA,并构建成噬菌体文库即可进行下游筛选^[13]。

因为核糖体尺寸小(相对于噬菌体、细菌和酵母),可在微升级的反应体系中实现 10^{12} 丰度的抗体筛选。如此高的丰度大大提高了抗体筛选的成功率。这些文库的高丰度在新冠病毒中和抗体研究

中得到了很好的体现。Seeger实验室、Löw实验室及本实验室同时采用新冠病毒棘突蛋白(spike, S)中的受体结合结构域进行纳米抗体筛选。其中, Seeger实验室报道了68个^[14]、Löw实验室报道了85个^[15]、本实验室报道了99个抗体序列^[7], 这些序列无一重叠。

本实验室还利用该核糖体展示文库, 获得了数个针对热稳绿色荧光蛋白的抗体, 可用于融合蛋白的亲亲和层析^[16]。此外, 跨膜转运蛋白往往具有较少的膜外区而较难获得高亲和力纳米抗体。本实验室利用核糖体展示文库, 成功获得超过30个高亲和力纳米抗体, 帮助其他实验室解析植物生长素转运蛋白PIN1的三维结构^[17]。类似地, Kang等^[18]采用该文库亦获得了线粒体解偶联蛋白的纳米抗体, 从而解析了其冷冻电镜三维结构。

2.5 新型淘选方法

前述方法均需要用到淘选方法。一般地, 纳米抗体的淘选原理是将抗原固定在固相基质上, 通过淘洗的方法去除结合力弱、保留结合力强的纳米抗体。随着新型生物技术的出现, 也发展了新的抗体筛选方法。一种是结合淘选: 使用下一代测序法, 分析淘选前后抗体丰度的变化, 从而大致判定抗体的亲和力^[19]。另外一种是在Seeger实验室开发的多肽条形码的方法^[20]: 在该方法中, 作者将多肽条形码文库融合到纳米抗体文库的末端, 以构建巢氏文库, 并使用下一代测序法确定多肽条形码与纳米抗体序列之间的对应关系。随后, 在大肠杆菌中表达文库抗体, 并与抗原孵育进行淘选(如分子筛)。利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析多肽条形码信息, 即可同时获得结合抗原的多个抗体的序列信息。

2.6 纳米抗体的人工智能设计

在自然科学研究中, 蛋白质科学给人工智能提供了最准确的学习模板, 促进了人工智能在蛋白质结构预测及蛋白质从头合成中的突破性发展。纳米抗体结构的相对简单性使得其与抗原复合体的结构预测及从头设计相对更容易。最近, Bennett等^[21]设计了针对流感病毒血凝素的纳米抗体, 亲和力达到78 nmol/L。随着越来越多的纳米抗体-抗原复合物的结构得到解析, 以及文献中积累的亲和力与结构之间关联的实验数据, 人工智能将在今后的

纳米抗体设计中发挥重要的辅助作用。

2.7 纳米抗体的表达与纯化

大肠杆菌系统是纳米抗体表达最经济的体系。一般地, 构建载体时在纳米抗体的氨基端加入分泌肽, 使抗体表达在周质, 产量一般为20 mg/L。在提取蛋白质时, 采用渗透法即可在不破碎大肠杆菌细胞的情况下获得较纯的纳米抗体。对于一般的生化实验, 使用镍柱亲和层析即可获得纯度95%以上的蛋白质。

大肠杆菌纯化的蛋白质含有内毒素, 而在动物实验时需要去除内毒素。为了减少这些步骤, 毕赤酵母是工业表达蛋白质常用的选择。毕赤酵母分泌系统具有产量高的特点, 在摇瓶培养的条件下即可达到约1 g/L的表达水平。本实验室发现, 毕赤酵母分泌表达的抗体会结合色素分子, 导致产物呈现黄绿色, 使用去垢剂清洗可有效去除该色素^[22]。

3 纳米抗体在蛋白质科学中的应用

纳米抗体因其高度的特异性和构象选择性, 可作为分子伴侣辅助蛋白质进行结构生物学研究。

3.1 构象特异性抗体在结构生物学中的应用

在晶体结构生物学研究中, 蛋白质构象上的异质性可造成晶体堆积困难或不紧密, 导致晶体生长失败或衍射分辨率低。在膜蛋白晶体学研究中, 一些缺乏可溶区的膜蛋白往往因为缺少可堆积的表面而无法结晶。纳米抗体可以将蛋白质锁定在特定构象, 还可以增大晶体堆积表面, 是理想的结晶伴侣蛋白。

纳米抗体的构象特异性在一项绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)研究中得到很好的体现。Kirchhofer等^[23]筛选获得了分别能增强GFP荧光(称为enhancer)与降低荧光(称为minimizer)的一对纳米抗体。晶体结构分析表明, 这对纳米抗体改变了荧光基团附近的微环境。在增强型纳米抗体存在的情况下, 发光基团更容易发生去质子化, 而在减弱型纳米抗体结合时则呈现相反的趋势。

在GPCR活性构象的晶体学研究中, Rasmussen等^[24]使用了一个将GPCR稳定在活性构象的纳米抗体, 实现了结构解析, 阐释了GPCR的激活机制。Bräuer等^[25]在研究7次跨膜KDEL受体结构的实验中, 采用核糖体展示技术获得了数个高亲和力

抗体。这些抗体既可稳定膜蛋白，又在结晶过程中提供了堆积表面。在半胱氨酸外运蛋白Cystinosin的晶体结构解析中，Guo等^[26]使用了分别结合在Cystinosin两端的两个纳米抗体辅助结晶。值得提出的是，其中一个亦来自Seeger实验室的核糖体展示文库。此外，Löbel等^[27]也利用核糖体展示文库获得了拟南芥中Cystinosin的纳米抗体，并在其辅助下获得了晶体及高分辨率(2.65 Å)结构。

在冷冻电镜结构生物学研究中，纳米抗体亦有较大应用。如前所述，一些膜蛋白缺少可溶区，而其跨膜螺旋的冷冻电镜密度会被外围的去垢剂密度所掩盖，造成对中困难，在二维和三维分类中难以捕捉其形貌特征。识别三维表位的纳米抗体可以提供刚性的对中标记，从而帮助解析三维结构。成功的例子包括上文提到的植物生长素转运蛋白等。Wang等^[28]在囊泡单胺转运蛋白2(vesicular monoamine transporter 2, VMAT2)结构解析的过程中，将Alfa标签加到蛋白质的羧基端，产生的融合蛋白可结合Alfa纳米抗体。利用这一特点成功解析了该转运蛋白的冷冻电镜三维结构。最近，纳米抗体还用于解析孤儿受体GPR75^[29]以及神经降压素受体1(neurotensin receptor 1, NTSR1)^[30]的冷冻电镜结构。此外，特异性纳米抗体因可有效区分相似度非常高、冷冻电镜无法分辨的亚基而在γ-氨基丁酸受体复合物的结构解析中发挥了重要的作用^[31]。

3.2 基于纳米抗体的衍生工具蛋白

对于一些相对分子质量小于50 000的单体跨膜蛋白，仅添加纳米抗体仍达不到冷冻电镜技术的常规尺寸。针对该问题，研究者开发了多种衍生工具蛋白。Botte等^[32]在纳米抗体的羧基端通过1~2个刚性的脯氨酸残基融合麦芽糖结合蛋白(MBP)，产生的Macrobody可帮助进一步增加蛋白质表观尺寸。Bloch等^[33]筛选获得了针对纳米抗体的抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)——NabFab，并利用该工具蛋白成功解析了大小仅约为49 000的NorM和47 000的DMT的三维结构。Yu等^[34]也利用NabFab解析了一个阿片受体的三维结构。Uchański等^[35]通过融合HopQ与YgjK获得了两种形式的Megabody。其中，前者因为与纳米抗体的连接区域柔性较大而无法继续增大尺寸，但可

改善膜蛋白在冰层中的取向，帮助解析β3 GABA_A R的三维结构；后者则通过增大蛋白质的表观尺寸成功帮助完成了Hedgehog酰基转移酶的电镜结构解析^[36]。Wu等^[6]筛选获得一个针对纳米抗体的Fab，并通过巧妙的“融合螺旋”设计，将麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)通过蛋白A的C结构域结合在纳米抗体上，形成一个相对分子质量大小约为120 000的乐高抗体，解析了相对分子质量仅约为20 000的KDEL受体的冷冻电镜结构。这些工具蛋白的存在大大拓展了纳米抗体在结构生物学中的应用。

4 纳米抗体在生物医学中的应用及前景

纳米抗体作为一种新兴的生物技术，在生物成像、药物靶向递送等领域提供了强大的工具，对于病毒感染、肿瘤等疾病的治疗方法与检测方法开发，以及新药研发亦具有广泛的应用前景。

4.1 纳米抗体在生物成像中的应用

非侵入性成像工具在癌症研究和治疗中具有重要意义。纳米抗体体积小、穿透性强、特异性高，是理想的成像工具。有研究表明，靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的纳米抗体7D12偶联了近红外的荧光分子IRDye800CW后可用于肿瘤成像，在注射半小时后即可对肿瘤微环境进行成像观察，而同样的Fab抗体此时观察不到信号，凸显了纳米抗体在成像上的优势^[37]。针对乳腺癌患者中过量表达的肿瘤标志物人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)，同位素⁶⁸Ga标记的HER2纳米抗体可非侵入性检测HER2阳性的转移性病变和原发性肿瘤，在免疫正子断层照影(immuno positron emission tomography, ImmunoPET)中具有应用前景^[38]。识别分化簇8(cluster of differentiation 8, CD8)等分子的纳米抗体可以用于肿瘤微环境中的免疫细胞，如T细胞和巨噬细胞的成像，从而帮助了解肿瘤与免疫系统的相互作用，以及免疫治疗的效果^[39-41]。纳米抗体还可用于对程序性死亡配体-1(programmed death ligand 1, PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4, CTLA-4)等免疫检查点分子的成像^[42-44]及基于^{99m}Tc-LAG3的单光子发

射计算机断层成像(single-photon emission computed tomography, SPECT), 以评估患者的预后和治疗反应^[45]。此外, 肿瘤细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的分布及修饰与肿瘤发生密切相关。针对ECM中的特定成分, 如纤维连接蛋白EIIIB结构域的纳米抗体, 可对ECM进行成像, 有助于了解肿瘤ECM如何响应治疗^[46]。这些研究表明, 纳米抗体成像工具能够提供有关肿瘤生物学和患者对治疗反应的重要信息。

4.2 纳米抗体作为病毒中和抗体

在侵染过程中, 病毒表面的一些糖蛋白会识别宿主细胞表面的受体。二者结合后, 病毒表面的受体结合蛋白通常会发生构象变化, 促进膜融合, 实现病毒内吞。结合在二者相互作用界面上的抗体, 或者锁定膜融合过程中关键蛋白质构象的抗体可阻断病毒侵染。新冠病毒表面的S蛋白上的受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)负责结合人细胞表面受体血管紧张素转化酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)^[47,48]。新冠病毒大流行期间, 涌现了一批针对S-RBD的纳米抗体^[12,14,15,49,50]。其中, 本实验室发现的MR17、MR3等纳米抗体通过与ACE2竞争结合界面而发挥中和效果。动物实验表明, 融合Fc的MR3抗体, 或者改造后延长体内半衰期的串联二联体在仓鼠体内能基本清除病毒, 甚至完全消除肺部损伤^[7]。此外, 我们发现的DL28纳米抗体可以将RBD锁定在与ACE2结合不兼容的构象而发挥作用^[49]。因为纳米抗体的高度稳定性, Wu等^[51]还开发了吸入式纳米抗体, 这类抗体因不需要注射, 在医疗资源挤兑时尤其有效。新冠病毒在群体免疫后大流行基本结束, 但这些研究中积累的经验为今后此类爆发性疫情的控制提供了科学基础。如本实验室利用核糖体展示技术, 12天内即获得了亲和力高达1 nmol/L的中和纳米抗体。这些抗体在简单改造后亲和力可提高数千倍^[7], 为今后快速应对病毒类感染提供了可行的策略。随着抗呼吸合胞病毒的ALX-0171纳米抗体向临床药物的推进, 纳米抗体在中和病毒中的应用具有更广阔的前景。

4.3 纳米抗体在嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法中的应用

CAR-T是一种新兴的癌症免疫治疗方法, 利用

基因工程技术改造患者的T细胞, 使其能特异性识别并攻击癌细胞。其中, 改造的关键在于T细胞受体。这些受体通常包括胞外的抗原识别域、跨膜域和胞内的信号传导域。CAR的胞外域在融合纳米抗体后, 可使其特异性地识别癌细胞表面的抗原。CAR与目标抗原结合后触发T细胞的激活, 启动其杀伤功能。这种激活不依赖于主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC), 使得T细胞能够识别并攻击广泛的肿瘤细胞。

目前, 已有大量针对多种癌症相关抗原的纳米抗体用于CAR-T研究与治疗。这些相关抗原包括乳腺癌的HER2^[52], 结肠癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、肝癌等的血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)^[53], 结肠癌、乳腺癌、卵巢癌等的肿瘤相关糖蛋白-72(tumor-associated glycoprotein-72, TAG-72)^[54], 前列腺癌等的前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PMSA)^[55,56], 以及其他重要抗原如脑聚糖2(glypican 2, GPC2)、CD38、CD33、CD7、黏蛋白1(mucin 1, MUC1)与EGFR等^[57]。针对多发性骨髓瘤的B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA)纳米抗体CAR-T疗法已在临床研究中显示出应用潜力^[58-62]。2022年2月, 美国食品药品监督管理局批准了一种名为cilta-cel的BCMA纳米抗体CAR-T疗法, 用于治疗复发及难治型骨髓瘤。

4.4 靶向肿瘤特异抗原的纳米抗体及其医学应用前景

除了在CAR-T中的应用, 靶向肿瘤特异抗原的纳米抗体还可用于向肿瘤靶向递送杀伤性小分子与大分子。有研究将癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)纳米抗体与阴沟肠杆菌来源的 β -内酰胺酶融合, 可以靶向性杀伤肿瘤细胞, 并在动物实验中得到验证^[63]。在乳腺癌研究中, 有研究将针对CD147的纳米抗体(名为VHH-11-1)偶联多柔比星(DOX), 在细胞与动物模型中均可有效靶向杀伤肿瘤细胞^[64]。一种偶联了光敏剂的HER2纳米抗体则可明显抑制耐药乳腺癌细胞的生长^[65]。HER2纳米抗体还可介导顺铂及硝羟喹啉等药物的靶向递送。此外, 大量研究结果显示, 靶向PD-L1的纳

米抗体在肿瘤治疗中具有应用前景^[66]。

4.5 纳米抗体在GPCR药物研究中的前景

G蛋白偶联受体是一类大型跨膜受体家族,涉及感觉知觉、神经传递、激素信号以及细胞内信号转导,也是最主要的药物靶点。GPCR位于细胞膜表面,因为其生理功能特点,配体口袋暴露在胞外,是理想的小分子与抗体药物靶点。药物开发策略包括开发激动剂或拮抗剂以增强或抑制GPCR信号转导,或开发偏向性配体以选择性地激活特定的信号通路。在小分子药物研发中,存在特异性不够强而发生脱靶效应的可能,引起不良反应。纳米抗体的高选择性为针对GPCR的新型药物开发提供了可能的优势。此外,纳米抗体为针对缺乏小分子的GPCR药物开发提供了选择。

非典型趋化受体3(atypical chemokine receptor 3, ACKR3)是一种在头颈癌细胞中高表达的GPCR,其特异性纳米抗体NB1-NB3可有效减慢肿瘤细胞生长,并在动物模型中提高生存率。有研究对ACKR3的抑制型纳米抗体工作机制进行了解析,发现了与同家族GPCR的小分子抑制剂不同的分子机制^[67]。此外,针对趋化因子受体4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)的纳米抗体可以阻断其与趋化因子12(C-X-C motif chemokine 12, CXCL12)的信号转导通路,影响肿瘤细胞的增殖^[68]。有研究筛选获得了针对阿片受体的抑制型纳米抗体,在治疗成瘾性上具有应用潜力^[34]。在甲状旁腺激素受体1(parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein type 1 receptor, PTHR1)研究中,Sachdev等^[69]将原本不具备偏向性激活效果的小分子偶联在受体特异性纳米抗体上,利用纳米抗体的构象选择性实现了偏向性激活。此外,血管紧张素Ⅱ型1受体(angiotensin Ⅱ type 1 receptor, AT1R)的活性小分子通常无法以受体亚型或组织特异性的方式靶向GPCR,且相关的抗高血压药物不能在孕期使用^[70]。McMahon等^[71]开发了高亲和力的人源化AT1R纳米抗体,它可拮抗受体的活性,且因为无法穿过胎盘,不会影响胎儿。结构分析显示,纳米抗体结合部位与小分子拮抗剂不重合,因此,与小分子抑制剂一起使用可带来叠加效果。这些研究说明,纳米抗体能以不同于传统配体的方式

调节GPCR的功能,在新型药物研发中具有重要意义。

4.6 纳米抗体靶向胞外蛋白

与细胞膜表面的受体类似,胞外蛋白也是抗体药物青睐的靶点。纳米抗体可用于阻断一系列生物过程,其中包括炎症蛋白如白介素23、TNF、粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)和巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)等介导的炎症反应,以及肿瘤发生中EGF所介导的血管增生等过程^[72]。Kaczmarek等^[73]报道了一些尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子(urokinase-type plasminogen activator receptor, μ PA)的纳米抗体,它们可抑制该蛋白的丝氨酸蛋白水解酶活性,在肿瘤治疗上具有应用前景。针对基质金属蛋白酶8的抑制型纳米抗体则具有潜在的抗炎作用^[74]。此外,针对 β 2微球蛋白的抗体可有效防止其突变造成的淀粉样聚集^[75]。类似地,针对凝溶胶蛋白的纳米抗体同样可减少因其突变造成异常水解和聚集的现象,在动物模型中降低器官中的淀粉样蛋白沉积^[76,77]。在脂代谢研究中,靶向前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)的纳米抗体可降低低密度胆固醇含量^[78]。2012年,结合血友病因子的纳米抗体Caplacizumab进入临床Ⅱ期试验^[79]。2022年,该药物在一例29岁的女性病人中展现出较好的疗效^[80]。此外,针对不同靶标或者同样靶标不同表位的纳米抗体还能构建融合抗体,在提高亲和力、防止肿瘤细胞的逃逸中具有优势。如最近报道的Z15-0-2双表位抗体即可同时靶向PD-1与CTLA-4^[81]。

4.7 纳米抗体介导的靶向降解

蛋白质靶向降解(targeted protein degradation, TPD)利用细胞内的天然蛋白降解机制来特异性地降低目标蛋白质(protein of interest, POI)的水平。在纳米抗体上融合E3连接酶,可对POI进行泛素化标记并使其通过26S蛋白酶体降解。

此外,纳米抗体还被用于膜蛋白的靶向降解。Zhang等^[82]设计了针对PD-1的共价型纳米抗体。二者识别并形成共价复合物后,纳米抗体所带的细胞穿透多肽信号促使该复合物内吞,并通过纳米抗体上融合的溶酶体定位信号,将该复合物转运

至溶酶体降解。

4.8 纳米抗体在疾病诊断与检测中的应用

标志物在疾病发生、发展、治疗效果追踪中有重要意义。因为纳米抗体的高稳定性及高亲和力等特点,近年来涌现了一批标志物监测用纳米抗体,包括针对糖链抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)、前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)、甲种胎儿球蛋白、癌胚抗原、纤维蛋白原样蛋白1等的纳米抗体检测试剂^[83]。Marturano等^[84]发展了荧光标记的纳米抗体VHH-136,结合流式细胞术,可检测心血管及肿瘤疾病相关的基质金属蛋白酶2的表达。类似地,Gerdes等^[85]使用荧光标记的纳米抗体NbSyn87检测了神经退行性疾病中 α -突触核蛋白的异常表达。

在感染疾病中,纳米抗体亦用来检测病原生物特异性蛋白,包括针对艾滋病毒^[86]、呼吸道合胞病毒^[87]、新冠病毒的高灵敏纳米抗体^[88],灵敏度达0.3 ng/mL的检测金黄色葡萄球菌肠毒素的酶联免疫纳米抗体和纳米抗体-碱性磷酸酶融合检测体系^[89],以及检测牛奶中细菌污染的Nb147抗体^[90]。在单细胞寄生虫的血清学检测中,纳米抗体也有广泛应用^[91]。此外,纳米抗体还可用于真菌毒素^[92]及农药残留的检测^[93]。

5 结语与展望

纳米抗体单域结构的简单性赋予了其优于传统抗体的很多特点,使其更便于筛选、纯化、改造,并因其更强的穿透力而具有更多的应用场景。在基础研究中,纳米抗体将继续在结构生物学、生物成像、蛋白质设计等领域作为研究对象与研究工具发挥重要推动作用。在生物医学应用领域,生物技术的进步与纳米抗体药物的临床使用将催生更多的类似药物进入临床研究。可以预见,纳米抗体将在疾病治疗、药物递送、诊断及生物安全领域得到更广泛的应用。基于人工智能等的高效筛选技术以及人源化文库的设计将促进纳米抗体在基础与应用研究中的运用。

参考文献

[1] De Genst EJ, Guillems T, Wellens J, et al. Structure and properties of a complex of α -synuclein and a single-

- domain camelid antibody. *J Mol Biol*, 2010, 402(2): 326-343
- [2] Guillems T, El-Turk F, Buell AK, et al. Nanobodies raised against monomeric α -synuclein distinguish between fibrils at different maturation stages. *J Mol Biol*, 2013, 425(14): 2397-2411
- [3] Braun MB, Traenkle B, Koch PA, et al. Peptides in headlock-a novel high-affinity and versatile peptide-binding nanobody for proteomics and microscopy. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 19211
- [4] Ling J, Cheloha RW, McCaul N, et al. A nanobody that recognizes a 14-residue peptide epitope in the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBC6e modulates its activity. *Mol Immunol*, 2019, 114: 513-523
- [5] Götzke H, Kilisch M, Martínez-Carranza M, et al. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4403
- [6] Wu X, Rapoport TA. Cryo-EM structure determination of small proteins by nanobody-binding scaffolds (Legobodies). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(41): e2115001118
- [7] Li T, Cai H, Yao H, et al. A synthetic nanobody targeting RBD protects hamsters from SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4635
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Contreras MA, Serrano-Rivero Y, González-Pose A, et al. design and construction of a synthetic nanobody library: testing its potential with a single selection round strategy. *Molecules*, 2023, 28(9): 3708
- [11] McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(3): 289-296
- [12] Schoof M, Faust B, Saunders RA, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive spike. *Science*, 2020, 370(6523): 1473-1479
- [13] Zimmermann I, Egloff P, Hutter CAJ, et al. Generation of synthetic nanobodies against delicate proteins. *Nat Protoc*, 2020, 15(5): 1707-1741
- [14] Walter JD, Scherer M, Hutter CAJ, et al. Biparatopic sybodies neutralize SARS-CoV-2 variants of concern and mitigate drug resistance. *EMBO Rep*, 2022, 23(4): e54199
- [15] Custódio TF, Das H, Sheward DJ, et al. Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobo-

- dies that effectively neutralize SARS-COV-2. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5588
- [16] Cai H, Yao H, Li T, et al. An improved fluorescent tag and its nanobodies for membrane protein expression, stability assay, and purification. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 753
- [17] Yang Z, Xia J, Hong J, et al. Structural insights into auxin recognition and efflux by *Arabidopsis* PIN1. *Nature*, 2022, 609(7927): 611-615
- [18] Kang Y, Chen L. Structural basis for the binding of DNP and purine nucleotides onto UCP1. *Nature*, 2023, 620(7972): 226-231
- [19] Deschaght P, Vintém AP, Logghe M, et al. Large diversity of functional nanobodies from a camelid immune library revealed by an alternative analysis of next-generation sequencing data. *Front Immunol*, 2017, 8: 420
- [20] Egloff P, Zimmermann I, Arnold FM, et al. Engineered peptide barcodes for in-depth analyses of binding protein libraries. *Nat Methods*, 2019, 16(5): 421-428
- [21] Bennett NR, Watson JL, Ragotte RJ, et al. Atomically accurate de novo design of single-domain antibodies. *bioRxiv*, 2024. doi: 10.1101/2024.03.14.585103
- [22] Li T, Cai H, Lai Y, et al. A simple and effective method to remove pigments from heterologous secretory proteins expressed in *Pichia pastoris*. *Adv Biotechnol*, 2024, 2(1): 5
- [23] Kirchhofer A, Helma J, Schmidthals K, et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(1): 133-138
- [24] Rasmussen SGF, Choi HJ, Fung JJ, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature*, 2011, 469(7329): 175-180
- [25] Bräuer P, Parker JL, Gerondopoulos A, et al. Structural basis for pH-dependent retrieval of ER proteins from the Golgi by the KDEL receptor. *Science*, 2019, 363(6431): 1103-1107
- [26] Guo X, Schmiede P, Assafa TE, et al. Structure and mechanism of human cystine exporter cystinosin. *Cell*, 2022, 185(20): 3739-3752.e18
- [27] Löbel M, Salphati SP, El Omari K, et al. Structural basis for proton coupled cystine transport by cystinosin. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4845
- [28] Wang Y, Zhang P, Chao Y, et al. Transport and inhibition mechanism for VMAT2-mediated synaptic vesicle loading of monoamines. *Cell Res*, 2024, 34(1): 47-57
- [29] Lv Z, He Y, Xiang Y, et al. Cryo-EM complex structure of active GPR75 with a nanobody. *bioRxiv*, 2022. doi: 10.1101/2022.08.18.503988
- [30] Robertson MJ, Papasergi-Scott MM, He F, et al. Structure determination of inactive-state GPCRs with a universal nanobody. *Nat Struct Mol Biol*, 2022, 29(12): 1188-1195
- [31] Sente A, Desai R, Naydenova K, et al. Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. *Nature*, 2022, 604(7904): 190-194
- [32] Botte M, Ni D, Schenck S, et al. Cryo-EM structures of a LptDE transporter in complex with Pro-macrobodies offer insight into lipopolysaccharide translocation. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1826
- [33] Bloch JS, Mukherjee S, Kowal J, et al. Development of a universal nanobody-binding Fab module for fiducial-assisted cryo-EM studies of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(47): e2115435118
- [34] Yu J, Kumar A, Zhang X, et al. Structural basis of μ -opioid receptor-targeting by a nanobody antagonist. *bioRxiv*, 2023. doi: 10.1101/2023.12.06.570395
- [35] Uchański T, Masiulis S, Fischer B, et al. Megabodies expand the nanobody toolkit for protein structure determination by single-particle cryo-EM. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 60-68
- [36] Coupland CE, Andrei SA, Ansell TB, et al. Structure, mechanism, and inhibition of Hedgehog acyltransferase. *Mol Cell*, 2021, 81(24): 5025-5038
- [37] Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging*, 2012, 11(1): 33-46
- [38] Keyaerts M, Xavier C, Heemskerk J, et al. Phase I Study of ^{68}Ga -HER2-nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. *J Nucl Med*, 2016, 57(1): 27-33
- [39] Zhao H, Wang C, Yang Y, et al. ImmunoPET imaging of human CD8⁺ T cells with novel ^{68}Ga -labeled nanobody companion diagnostic agents. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 42
- [40] Pandit-Taskar N, Postow MA, Hellmann MD, et al. First-in-humans imaging with (89)zr-df-iab22m2c anti-CD8 minibody in patients with solid malignancies: preliminary pharmacokinetics, biodistribution, and lesion targeting. *J Nucl Med*, 2020, 61(4): 512-519
- [41] Tavaré R, Escuin-Ordinas H, Mok S, et al. An effective immuno-PET imaging method to monitor CD8-dependent responses to immunotherapy. *Cancer Res*, 2016, 76(1): 73-82
- [42] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2443-2454
- [43] Bensch F, van der Veen EL, Lub-de Hooge MN, et al. ^{89}Zr -atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med*, 2018, 24(12): 1852-1858

- [44] Ingram JR, Blomberg OS, Rashidian M, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(15): 3912-3917
- [45] Lecocq Q, Awad RM, De Vlaeminck Y, et al. Single-domain antibody nuclear imaging allows noninvasive quantification of LAG-3 expression by tumor-infiltrating leukocytes and predicts response of immune checkpoint blockade. *J Nucl Med*, 2021, 62(11): 1638-1644
- [46] Jailkhani N, Ingram JR, Rashidian M, et al. Noninvasive imaging of tumor progression, metastasis, and fibrosis using a nanobody targeting the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(28): 14181-14190
- [47] Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-1448
- [48] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263
- [49] Li T, Zhou B, Luo Z, et al. Structural characterization of a neutralizing nanobody with broad activity against SARS-CoV-2 variants. *Front Microbiol*, 2022, 13: 875840
- [50] Hanke L, Vidakovics Perez L, Sheward DJ, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4420
- [51] Wu X, Cheng L, Fu M, et al. A potent bispecific nanobody protects hACE2 mice against SARS-CoV-2 infection via intranasal administration. *Cell Rep*, 2021, 37(3): 109869
- [52] Jamnani FR, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, et al. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2014, 1840(1): 378-386
- [53] 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(9): 1259-1267
- [54] Sharifzadeh Z, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, et al. Genetically engineered T cells bearing chimeric nanoconstructed receptors harboring TAG-72-specific camelid single domain antibodies as targeting agents. *Cancer Lett*, 2013, 334(2): 237-244
- [55] Hassani M, Hajari Taheri F, Sharifzadeh Z, et al. Construction of a chimeric antigen receptor bearing a nanobody against prostate a specific membrane antigen in prostate cancer. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10787-10795
- [56] Hassani M, Hajari Taheri F, Sharifzadeh Z, et al. Engineered jurkat cells for targeting prostate-specific membrane antigen on prostate cancer cells by nanobody-based chimeric antigen receptor. *Iran Biomed J*, 2020, 24(2): 81-88
- [57] Safarzadeh Kozani P, Naseri A, Mirarefin SMJ, et al. Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy. *Biomark Res*, 2022, 10(1): 24
- [58] 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(1): 141
- [59] 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 USA*, 2019, 116(19): 9543-9551
- [60] Usmani SZ, Berdeja JG, Jakubowiak A, et al. Updated results from the cartitude-1 study of ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T cell therapy, in relapsed/refractory multiple myeloma. *Hematol Transfusion Cell Ther*, 2021, 43: S272
- [61] Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet*, 2021, 398(10297): 314-324
- [62] Madduri D, Berdeja JG, Usmani SZ, et al. Cartitude-1: Phase 1b/2 study of ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T cell therapy, in relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*, 2020, 136(Supplement 1): 22-25
- [63] Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2853-2857
- [64] Li R, Zhu X, Zhou P, et al. Generation of a high-affinity nanobody against CD147 for tumor targeting and therapeutic efficacy through conjugating doxorubicin. *Front Immunol*, 2022, 13: 852700
- [65] Deken MM, Kijanka MM, Beltrán Hernández I, et al. Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session. *J Control Release*, 2020, 323: 269-281
- [66] Zhang F, Wei H, Wang X, et al. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov*, 2017, 3(1): 17004
- [67] Schlingens RR, Peterson FC, Heukers R, et al. Structural basis for selectivity and antagonism in extracellular GPCR-nanobodies. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4611
- [68] Jähnichen S, Blanchetot C, Maussang D, et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(47):

- 20565-20570
- [69] Sachdev S, Creemer BA, Gardella TJ, et al. Highly biased agonism for GPCR ligands via nanobody tethering. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4687
- [70] Bullo M, Tschumi S, Bucher BS, et al. Pregnancy outcome following exposure to angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor antagonists: a systematic review. *Hypertension*, 2012, 60(2): 444-450
- [71] McMahon C, Staus DP, Wingler LM, et al. Synthetic nanobodies as angiotensin receptor blockers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(33): 20284-20291
- [72] Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*, 2016, 21(7): 1076-1113
- [73] Kaczmarek JZ, Skottrup PD. Selection and characterization of camelid nanobodies towards urokinase-type plasminogen activator. *Mol Immunol*, 2015, 65(2): 384-390
- [74] Demeestere D, Dejonckheere E, Steeland S, et al. Development and validation of a small single-domain antibody that effectively inhibits matrix metalloproteinase 8. *Mol Ther*, 2016, 24(5): 890-902
- [75] Koffie RM, Farrar CT, Saidi LJ, et al. Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for *in vivo* optical and magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(46): 18837-18842
- [76] Van Overbeke W, Wongsantichon J, Everaert I, et al. An ER-directed gelsolin nanobody targets the first step in amyloid formation in a gelsolin amyloidosis mouse model. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(9): 2492-2507
- [77] Van Overbeke W, Verhelle A, Everaert I, et al. Chaperone nanobodies protect gelsolin against MT1-MMP degradation and alleviate amyloid burden in the gelsolin amyloidosis mouse model. *Mol Ther*, 2014, 22(10): 1768-1778
- [78] Li X, Hong J, Gao X, et al. Development and characterization of a camelid derived antibody targeting a linear epitope in the hinge domain of human PCSK9 protein. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12211
- [79] Holz JB. The TITAN trial-assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion Apheresis Sci*, 2012, 46(3): 343-346
- [80] Palanques-Pastor T, Megías-Vericat JE, Bosó Ribelles V, et al. Effectiveness of caplacizumab nanobody in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura refractory to conventional treatment. *Acta Haematol*, 2022, 145(1): 72-77
- [81] Zeng J, Fang Y, Zhang Z, et al. Antitumor activity of Z15-0-2, a bispecific nanobody targeting PD-1 and CTLA-4. *Oncogene*, 2024, 43(29): 2244-2252
- [82] Zhang H, Han Y, Yang Y, et al. Covalently engineered nanobody chimeras for targeted membrane protein degradation. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(40): 16377-16382
- [83] Su Q, Shi W, Huang X, et al. Recent advances of nanobody applications in diagnosis and detection. 2023, 2(3): e54
- [84] Marturano A, Hendrickx MLV, Falcinelli E, et al. Development of anti-matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) nanobodies as potential therapeutic and diagnostic tools. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2020, 24: 102103
- [85] Gerdes C, Waal N, Offner T, et al. A nanobody-based fluorescent reporter reveals human α -synuclein in the cell cytosol. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2729
- [86] Helma J, Schmidthals K, Lux V, et al. Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50026
- [87] Xun G, Song X, Hu J, et al. Potent human single-domain antibodies specific for a novel prefusion epitope of respiratory syncytial virus F glycoprotein. *J Virol*, 2021, 95(18): e0048521
- [88] Gransagne M, Aymé G, Brier S, et al. Development of a highly specific and sensitive VHH-based sandwich immunoassay for the detection of the SARS-CoV-2 nucleoprotein. *J Biol Chem*, 2022, 298(1): 101290
- [89] Ji Y, Li X, Lu Y, et al. Nanobodies based on a sandwich immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin b free from interference by protein A. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(21): 5959-5968
- [90] Hu Y, Sun Y, Gu J, et al. Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting *Staphylococcus aureus* in milk. *Food Chem*, 2021, 353: 129481
- [91] Morales-Yáñez F, Trashin S, Hermy M, et al. Fast one-step ultrasensitive detection of toxocara canis antigens by a nanobody-based electrochemical magnetosensor. *Anal Chem*, 2019, 91(18): 11582-11588
- [92] Zhao F, Tian Y, Shen Q, et al. A novel nanobody and mimotope based immunoassay for rapid analysis of aflatoxin B1. *Talanta*, 2019, 195: 55-61
- [93] El-Moghazy AY, Huo J, Amaly N, et al. An innovative nanobody-based electrochemical immunosensor using decorated nylon nanofibers for point-of-care monitoring of human exposure to pyrethroid insecticides. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(5): 6159-6168