

## 纳米抗体在癌症治疗中的应用

吴越, 郝秀静, 李敏

宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021

吴越, 郝秀静, 李敏. 纳米抗体在癌症治疗中的应用. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1085–1090.

Wu Y, Hao XJ, Li M. Application of nanobody in cancer treatment. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1085–1090.

**摘要:** 骆驼科动物的体内会产生一种缺失轻链的抗体, 被称为重链抗体, 又叫做 nanobody。这种抗体只包含一个可变区, 具有高亲和力、高稳定性、强组织穿透性、高效表达等优点, 同时具有低毒性和低免疫原性等特性, 适用于诊断、治疗和充当多种领域的实验研究工具。文中将主要讨论 nanobody 在癌症治疗中的应用, 为 nanobody 的进一步研发提供思路。

**关键词:** 重链抗体, 纳米抗体, 癌症治疗

## Application of nanobody in cancer treatment

Yue Wu, Xiuqing Hao, and Min Li

Key Laboratory for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western China, Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

**Abstract:** Camelidae can produce a unique antibody that lacks light chain called variable heavy chain domain, also known as nanobodies. This antibody contains only one variable region, with high affinity, high stability, strong tissue penetration, efficient expression. Besides, their toxicity and immunogenicity are both low to be used for both therapeutic and diagnostic applications, as well as research tools. In this review, we discuss how nanobody has been explored as therapeutics in oncology, and provide ideas for the further development of nanobody.

**Keywords:** heavy-chain-only antibodies, nanobodies, oncology

大约 30%正在开发的药品都是生物制品, 其中大部分都是用于治疗炎症、癌症和过敏的活性蛋白<sup>[1]</sup>。在临床治疗和研究过程中单克隆抗体变得不可缺少, 但是高昂的生产成本给研究和临床

**Received:** December 23, 2016; **Accepted:** April 25, 2017

**Supported by:** Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of Ningxia (No. 4130397).

**Corresponding author:** Min Li. Tel: +86-951-2062010; E-mail: lim@nxu.edu.cn

宁夏科技支撑项目 (No. 4130397) 资助。

网络出版时间: 2017-05-24

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170524.0902.001.html>

治疗造成巨大的经济负担。并且,单克隆抗体并不适用于所有领域。首先,单克隆抗体大小在 150 kDa 左右,不能用于肿瘤渗透治疗。其次,单克隆抗体具有较强的免疫原性,这会导致单克隆抗体具有较短的半衰期不利于在治疗中的应用,也会使得单克隆抗体在进行分子成像检测时具有强烈的背景信号<sup>[2]</sup>。单克隆抗体的大部分缺点都是因为其较大的分子质量产生的,人们开始研究如何减少抗体的分子量并改进其药理学性质<sup>[3]</sup>。

## 1 纳米抗体

20 世纪 90 年代初,Hamers 等发现骆驼科动物的体内有一种不同于免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 的新型抗体。这是一种缺失轻链的抗体,被称为重链抗体(Heavy-chain-only antibodies, HcAbs)。重链抗体包含两个恒定区 (CH2 和 CH3), 一个铰链区和一个重链可变区 (Variable heavy chain domain, VHH)。VHH 抗体又被称为纳米抗体(Nanobody, NB), 它保留了重链抗体完整的抗原结合能力<sup>[4]</sup>。

Nanobody 由 4 个保守序列和 3 个互补决定区组成 (Complementarity-determining region, CDR) <sup>[5]</sup>, 其中 CDR3 比传统抗体更长, 并且可以形成凸环结构, 使得抗体可以更容易与抗原结合。此外, 由于 nanobody 具有独特的理化性质, 所以在高压或酸性等极端条件下依然可以维持活性<sup>[6-7]</sup>。nanobody 的分子量只有 15 kDa, 因此适用于多种给药途径可以快速扩散至全身, 并且具有良好的组织穿透能力<sup>[8]</sup>。而 nanobody 基因序列与人 VH 基因家族 3 序列具有高度同源性<sup>[9]</sup>, 所以在人体内并不具有免疫原性适用于慢性病的治疗。

Nanobody 的编码基因由 360 个左右的碱基对组成, 使得 nanobody 易与一些小分子或者药物前体以共价键的形式相连, 并且可以使用细菌或者酵母菌大量生产。改造后的 nanobody 将有不同的抗原表位或作用机制, 可以构成具有高亲和力的多价分子<sup>[10]</sup>, 被科研工作者广泛接受并视作临床研究及相关研究的重要工具。

## 2 Nanobody 与癌症治疗

现在市场上针对癌症治疗的单克隆抗体可以通过识别癌症的相关抗原治疗癌症<sup>[11]</sup>。但是分子体积较大的单克隆抗体很难渗透肿瘤并与靶标结合<sup>[12]</sup>。而与单克隆抗体相比, nanobody 在肿瘤组织中可以均匀渗透<sup>[13]</sup>。近些年的研究多是围绕用放射性同位素、效应分子或者抗癌药物分子标记连接 nanobody 靶基因, 使得抗癌药物和效应分子可以直接作用于特定的肿瘤细胞<sup>[14]</sup>。

### 2.1 Nanobody 与效应分子

因为 nanobody 没有 Fc 片段, 所以 nanobody 可以作为一种运输货物的工具来使用, 比如将药物或者大分子物质运输到肿瘤细胞或者其他靶细胞内。这样可以使抗癌药物在需要治疗的部位富集以提高药物的效果, 并且可以减少药物给全身其他部位带来的不良反应。同时 nanobody 与这些效应分子连接形成的复合物将具有特异性的治疗效果和对肿瘤组织的渗透能力。例如, 血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 与假单胞菌外毒素 A 共轭复合物和主要组织相容性复合体 (MHC-II)<sup>[15]</sup>与小分子微管抑制剂 (DM I) 共轭复合物<sup>[16]</sup>都可以让 nanobody 运输至肿瘤部位有效地发挥对肿瘤细胞的抑制作用。同样, 用带有编码二价的抗表皮生长因子受体 (Anti-EGFR)

和 TRAIL 细胞毒素重组蛋白的质粒的慢病毒感染神经干细胞 (Neural stem cells, NSC), 可以获得对肿瘤细胞有高度靶向性的 NSC, 并且到达肿瘤部位后 NSC 可以释放 Nb-TRAIL 复合物, 以达到抑制恶性肿瘤侵袭的能力<sup>[17]</sup>。而将可以与肿瘤标记物 CEA 的  $\beta$  内酰胺酶偶联的 nanobody 与一种抗癌药物前体共轭, nanobody 可以准确地将药物带到可以表达 CEA 的肿瘤细胞表面, 使得药物可以准确作用于肿瘤细胞<sup>[18]</sup>。

## 2.2 Nanobody 与药物传递系统

采用化学的方法将 nanobody 与药物传递分子结合起来, 就可以利用 nanobody 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>[15]</sup>。同时, 除了运载药物对肿瘤细胞作用以外, nanobody 也会抑制肿瘤细胞生长。这种大分子复合体与普通药物相比能更长时间存在于血液循环系统中, 虽然随着时间的延长效果会逐渐减弱, 但足够在肿瘤组织中充分扩散。

例如, 将靶标 EGFR 的 nanobody 与包裹有胰岛素增长因子 R1 (IGF-R1) 激酶抑制剂的脂质体结合, 这样可以得到一个具有双重疗效的纳米制剂, 可以同时抑制 EGFR 和 IGF-R1<sup>[19]</sup>。或者将 nanobody 与包裹有阿霉素的胶粒偶联<sup>[20]</sup>, 可以下调 EGFR 并且抑制肿瘤细胞增殖。而将靶标 EGFR 的 nanobody 进行生物素酰化并与包裹着链霉亲和素的胶粒偶联, nanobody 可以直接带着药物到达表达 EGFR 的肝肿瘤细胞并发生作用<sup>[21]</sup>。

运用胞外囊泡向细胞内运送分子也是一种新兴的研究方向。胞外囊泡可以迅速运送分子药物, 但是不具有特异靶向性, 并且在体内会被快速地清除<sup>[22]</sup>。将聚乙二醇化的胶团与对 EGFR 特异性的 nanobody 共轭复合物嵌入到胞外囊泡的膜上, 就可以使胞外囊泡对特定细胞产生靶向性并依然保持胞外囊泡的形态和生物物理特性<sup>[23]</sup>。

## 2.3 Nanobody 与放射性核素治疗和光动力治疗

放射免疫疗法 (Radioimmunotherapy, RIT) 是综合放射治疗和抗体免疫治疗的一种治疗方法, 可以选择性地破坏癌症细胞以达到微创放射治疗。让被放射性同位素标记的抗体识别并结合到肿瘤细胞上, 可以向肿瘤传递大量辐射但不会影响到健康组织以达到治疗的目的。当前, 只有一种被放射性同位素标记的抗 CD20 的单克隆抗体被美国食品药品监督管理局 (FDA) 允许上市<sup>[24]</sup>。同样, 该抗体也存在着低渗透力、低靶向性和过长的半衰期等严重缺陷。相比之下, 放射性同位素标记的 nanobody 对肿瘤组织具有高度特异性, 可以最大程度减少对健康组织的影响<sup>[25]</sup>。

迪修威特等尝试构建用镱-177 标记抗 M 蛋白的单克隆抗体来治疗多发性骨髓瘤<sup>[26]</sup>, 利用 1B4M-DTPA 螯合剂将放射性元素镱-177、化学反应功能基团和抗 HER2 nanobody 结合起来。这种方法几乎可以完全抑制肿瘤的生长, 用小鼠进行试验时治疗效果明显<sup>[27]</sup>。

光动力疗法 (Photodynamic therapy, PDT) 使用放射性元素和光敏剂杀死癌症细胞, 被公认是一种微创无毒的治疗方法。无论是采用光敏剂、单克隆抗体还是 nanobody 作为靶向物质, 都被认为是一种光免疫疗法。将抗 EGFR nanobody 与光敏剂偶联, 结合分子成像技术进

行癌症治疗是一种特殊且有效的治疗方法<sup>[28]</sup>。

### 3 结论与展望

在 1993 年, 具有免疫功能的重链抗体被发现于骆驼科动物体内。这种具有独特的抗原结合域的抗体, 因其较强的组织渗透力和较快的肾清除率, 被证明可以应用于肿瘤学、炎症反应、传染病学、分子成像学等各领域的治疗与诊断的研究当中。

尽管 nanobody 在临床治疗方面具有许多优势, 但是有时候仍需要进行一定改进才可以使用。比如在神经退行性疾病的治疗当中, 胞内抗体可以在疾病早期进行干预, 但是传统抗体在具有还原性的细胞质内无法正确折叠, 而 nanobody 则可以保持稳定的蛋白结构<sup>[29]</sup>, 但是仍需要解决如何递送 nanobody 表达载体的问题。不过因为 nanobody 是由单基因表达, 所以可以通过基因治疗研究出细胞内递送的方法<sup>[30]</sup>。另外, 也可以将 HIV Tat 蛋白作为穿膜蛋白将 nanobody 转导进细胞当中, 或者利用细菌 3 型分泌系统 (T3SS) 直接将 nanobody 注射到细胞当中<sup>[31]</sup>。

在临床试验中特异性总是越高越好, 于是可以通过免疫文库的噬菌体展示技术有效筛选出对特定抗原具有特异性的抗体, 但是不能排除有可能筛选到一价的亲和力较低的抗体的可能, 而通过 nanobody 免疫库进行筛选则可以避免这个问题。通过 Pain 等的研究可以得知, 经过噬菌体展示筛选获得的 nanobody 的亲和力要比筛选前的高 1.5 倍<sup>[32]</sup>。而通过 DNA 重组技术, 获得大量随机重组的直系同源的基因片段建立文库, 可以筛选得到更稳定亲和力更高的 nanobody<sup>[33]</sup>。然而, 建立这样的 nanobody 库会

消耗更多的时间及成本。同时, 在抗原有毒性、致死因子或者可传播、低免疫原性的情况下, 免疫并不可行, 必须寻找替代方法。比如, 使用非免疫库进行淘选<sup>[34]</sup>, 或者通过体外核糖体展示技术获得的文库也可淘选出高亲和力的特异性 nanobody<sup>[35]</sup>。除了通过免疫骆驼或骆驼科动物获得 nanobody, 一些研究小组还研究出通过 B 细胞生成正确折叠的 nanobody 的转基因小鼠<sup>[36]</sup>。

总之, nanobody 性能优越, 用途广泛, 可以应用于诊断、治疗和各种实验, 并且还有被进一步研发的潜能。

### REFERENCES

- [1] Mullard A. 2014 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(2): 77–81.
- [2] Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, 2005, 46(3): 258–268.
- [3] Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *mAbs*, 2010, 2(1): 77–83.
- [4] Hamers C, Atarhouch T, Muyltermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363(6428): 446–448.
- [5] Muyltermans S, Baral TN, Retamozzo VC, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 128(1/3): 178–183.
- [6] Pérez MJ, Renisio JG, Prompers JJ, et al. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. *Biochemistry*, 2001, 40(1): 74–83.
- [7] Dumoulin M, Conrath K, VanMeirhaeghe A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci*, 2002, 11(3): 500–515.
- [8] van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic

- applications. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(11): 1212–1224.
- [9] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Ann Rev Biochem*, 2013, 82: 775–797.
- [10] Steeland S, Puimège L, Vandenbroucke RE, et al. Generation and characterization of small single domain antibodies inhibiting human tumor necrosis factor receptor 1. *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 4022–4037.
- [11] Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, et al. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine*, 2015, 10(1): 161–174.
- [12] Rudnick SI, Adams GP. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm*, 2009, 24(2): 155–161.
- [13] Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van WM, 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.
- [14] Kijanka M, Warnders FJ, El Khattabi M, et al. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 40(11): 1718–1729.
- [15] 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. *New Biotechnol*, 2012, 30(2): 205–209.
- [16] Fang T, Duarte JN, Ling JJ, et al. Structurally defined  $\alpha$ MHC-II nanobody-drug conjugates: a therapeutic and imaging system for B-cell lymphoma. *Angew Chem*, 2016, 55(7): 2416–2420.
- [17] van de Water JA, Bagci-Onder T, Agarwal AS, et al. Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(41): 16642–16647.
- [18] Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2853–2857.
- [19] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(4): 299–308.
- [20] 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.
- [21] Baxevasis CN, Papamichail M. Targeting of tumor cells by lymphocytes engineered to express chimeric receptor genes. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(10): 893–903.
- [22] Talelli M, Oliveira S, Rijcken CJF, et al. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1255–1260.
- [23] Shishido T, Azumi Y, Nakanishi T, et al. Biotinylated bionanocapsules for displaying diverse ligands toward cell-specific delivery. *J Biochem*, 2009, 146(6): 867–874.
- [24] Debets MF, Leenders WPJ, Verrijp K, et al. Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting. *Macromol Biosci*, 2013, 13(7): 938–945.
- [25] Andaloussi SEL, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347–357.
- [26] Kooijmans SAA, Fliervoet LAL, van der Meel R, et al. PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time. *J Control Release*, 2016, 224: 77–85.
- [27] D’Huyvetter M, Xavier C, Caveliers V, et al. Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(12): 1939–1954.
- [28] D’Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, et al. Targeted Radionuclide therapy with a  $^{177}\text{Lu}$ -labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*, 2014, 4(7): 708–720.
- [29] Lemaire M, D’Huyvetter M, Lahoutte T, et al. Imaging and radioimmunotherapy of multiple

- myeloma with anti-idiotypic Nanobodies. *Leukemia*, 2014, 28(2): 444–447.
- [30] Heukers R, van Bergen en Henegouwen PMP, Oliveira S. Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. *Nanomedicine*, 2014, 10(7): 1441–1451.
- [31] Rozan C, Cornillon A, Pétiard C, et al. Single-domain antibody-based and linker-free bispecific antibodies targeting FcγRIII induce potent antitumor activity without recruiting regulatory T cells. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(8): 1481–1491.
- [32] Pain C, Dumont J, Dumoulin M. Camelid single-domain antibody fragments: uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie*, 2015, 111: 82–106.
- [33] Van Impe K, Bethuyne J, Cool S, et al. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(6): R116.
- [34] Hoseinpoor R, Gargari SLM, Rasooli I, et al. Functional mutations in and characterization of VHH against *Helico bacterpylori* urease. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(6): 3079–3091.
- [35] Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bommel AM, et al. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(3): 544–551.
- [36] Yau KYF, Groves MAT, Li SH, et al. Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library. *J Immunol Methods*, 2003, 281(1/2): 161–175.

(本文责编 陈宏宇)