

治疗性抗体半衰期研究进展

吴亚辉^{1,2}, 罗龙龙^{2*}, 张冉^{1**}

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410205; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所重大疫情应急防控药物研究室, 北京 100850)

[摘要] 对于治疗性抗体药物来说, 半衰期是其重要的一个药代动力学 (PK) 参数, 也是影响其临床应用可行性和实用性的重要因素。临床上常用的治疗性抗体药物主要以免疫球蛋白 G (IgG) 为主, 针对其半衰期改造的研究也在不断创新, 目前延长 IgG 半衰期的策略主要集中在可结晶片段 (Fc) 区域改造、等电点 (pI) 改造、糖基化修饰改造、抗原结合部位 pH 依赖性改造以及抗原结合钙离子依赖性改造等方面。近年来, 驼源纳米抗体 (Nb) 逐渐成为治疗性抗体药物研究的热门领域, 作为一种潜力巨大的小分子抗体, 延长其半衰期具有重要意义, 以蛋白融合、化学修饰、红细胞载体和多价 Nb 为主的策略被应用到 Nb 半衰期改造的研究中。通过对延长 IgG 和 Nb 半衰期的一些现有策略和方法进行介绍, 并简述半衰期改造后的应用现状, 以为更多其他的治疗性抗体半衰期改造的研究提供参考。

[关键词] 免疫球蛋白 G; 纳米抗体; 半衰期; 新生儿 Fc 受体

[中图分类号] R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2024) 01-0070-13

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2024.01.007

Advances in Research on Half-Life of Therapeutic Antibodies

WU Yahui, LUO Longlong, ZHANG Ran

(1. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410205, China; 2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasure, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] For therapeutic antibody drugs, half-life is an important pharmacokinetic (PK) parameter and an important factor affecting the feasibility and usefulness of their clinical applications. IgG is the main therapeutic antibody drug commonly used in clinical practice, and research on its half-life modification is also constantly innovating. Currently, strategies to extend the half-life of IgG are mainly focused on crystallizable fragment (Fc) region modification, isoelectric point (pI) modification, glycosylation modification, pH-dependent modification of the antigen binding site and calcium-dependent modification of antigen binding site. In recent years, camel-derived nanobody (Nb) has gradually become a popular area of therapeutic antibody drug research. As a small molecule antibody with great potential, it is important to prolong its half-life, and strategies based on protein fusion, chemical modification, erythrocyte carrier and multivalent Nb have been applied to modify the half-life of Nb. In this paper, some existing strategies and methods for prolonging the half-life of IgG and Nb are introduced, and the application status after half-life modification is briefly described, hoping to provide some reference for more studies on half-life modification of therapeutic antibodies.

[Key words] IgG; nanobody; half-life; FcRn

近年来, 随着抗体制备技术的不断发展和成熟以及抗体在临床应用过程中突出的疗效, 治疗性

抗体药物被广泛应用于恶性肿瘤、免疫性疾病、感染性疾病和心血管疾病等治疗领域^[1]。据统计, 截至 2023 年 7 月 20 日, 全球已上市及在研抗体药物 (含生物类似药) 共计 6 367 个, 其中占比最多的是传统免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 抗体, 其次是抗体-药物偶联物 (antibody-drug conjugates, ADCs)、双特异性抗体 (bispecific antibody, BsAb) 和小分子抗体^[2]。与此同时, 全球治疗性抗体药物的市场份额也一直处在快速增长过程中, 从 1997 年的 3 亿美元增长至 2022 年的 2 200 亿美元。因此, 对治疗性抗体药物的研发和性能优

接受日期: 2023-10-01

资助项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82204262、No. kq2014082); 北京市科技新星人才项目 (No. Z211100002121020); 北京市科技新星交叉课题 (No. 20220484217)

*** 通信作者:** 罗龙龙, 副研究员;

研究方向: 抗体工程;

Tel: 010-66931325; **E-mail:** luolong_long@126.com

**** 通信作者:** 张冉, 教授;

研究方向: 免疫学;

E-mail: ZR13971@hunnu.edu.cn

化是目前国际创新型新药开发的热点之一。

在对治疗性抗体药物的研究过程中,不仅需要考
虑其与抗原结合的特异性、免疫原性和自身理化性
质等问题^[3],抗体的药代动力学(pharmacokinetics,
PK)特征也是一个影响其临床应用的重要因素。描
述药物 PK 的重要参数之一,即药物半衰期,指的是
体内药物血液浓度降至一半所需要的时间。通常,
对药物半衰期的适当延长能提高药效、减少给药剂
量和给药频率,进而更便于临床治疗并减轻患者的
治疗负担^[4]。近年来,有关如何延长治疗性抗体药
物半衰期的研究主要集中在目前临床常用的 IgG 抗
体以及半衰期较短的纳米抗体(nanobody, Nb)。

IgG 是人体血清中含量最为丰富的抗体,占血
液循环中所有抗体的 75%^[5],是由 2 条重链和 2 条
轻链通过二硫键连接构成的 Y 型对称结构的大分子
蛋白质,其相对分子质量为 150 000。根据其功能
又可将结构分为 2 个特异性识别靶抗原的抗原结合
片段(fragment of antigen binding, Fab)、2 个恒
定的可结晶片段(fragment crystallizable, Fc)和连
接 Fab 段与 Fc 段的铰链区^[6]。IgG 具有比其他亚
型抗体更长的血清半衰期,一般在 10~21 d,这一
特性使得 IgG 类抗体药物的药效更持久、给药频率
和剂量也相应降低,成为目前为止临床上应用最为
广泛的抗体药物类型^[7]。IgG 的高血清滴度和较长
的血清半衰期特性由许多与结构和功能相关的因素
决定,包括新生儿 Fc 受体(neonatal Fc receptor,
FcRn)介导的循环、总电荷量、疏水性大小、等电
点(isoelectric point, pI)、糖基化修饰等,其中,
FcRn 介导的循环机制是最为重要的影响因素。血液
中循环的 IgG 通过胞饮作用或受体介导的内吞作用
被内皮细胞或单核细胞吸收后, IgG 在酸性环境中
(pH=6.0),其 Fc 段与 FcRn 相互作用,使得 IgG
与 FcRn 结合。然后,结合的 IgG 被转运至细胞表面,
并在达到生理 pH 值(pH=7.4)时又被释放至血液
中,使这一部分的 IgG 又能被重复利用^[3]。基于以
上这些因素,针对 IgG 半衰期延长的方法学研究也
在不断开展,力求提高 IgG 类抗体药物的半衰期,
使其满足临床实际需求。

小分子抗体主要包括单链抗体(single chain

variable fragments, scFv)^[8]、Nb^[9]和 Fab 段等,其
中 Nb 的相对分子质量最小(< 15 000),仅由 1
个来自于骆驼的重链抗体的可变区结构域构成。自
1993 年 Hamers-Casterman 等^[10]在骆驼血清中发
现天然重链抗体以来,研究者们对 Nb 产生了浓厚的
兴趣,众多研究成果表明, Nb 具有比传统抗体更好
的组织穿透能力^[8],免疫原性小^[11],能以可溶性形
式在原核或真核系统中高表达,稳定性也比其他小
分子抗体更高^[12]。以上这些优势促使 Nb 在治疗性
药物开发、诊断以及物质检测等领域的研究被迅速
推进,2019 年,全球首个 Nb 药物 caplacizumab (用
于治疗罕见凝血障碍的二价 Nb)被美国食品药品监
督管理局(FDA)批准进入市场,并且同时有十几
种 Nb 药物正处于临床试验研究阶段^[13]。但是,由于
Nb 的相对分子质量远小于肾滤过屏障所允许滤除的
最大蛋白质的相对分子质量(50 000~60 000),使
得 Nb 可直接并迅速被肾脏清除,导致其半衰期极短,
通常在几分钟至几小时之间。因此,延长 Nb 半衰期
成为了进一步改善 Nb 药物疗效的重要方向之一。目
前,以蛋白融合、化学修饰、红细胞载体和多价 Nb
为主的策略被应用到 Nb 半衰期改造的研究中。

本文主要介绍了延长 IgG 和 Nb 半衰期的一些
方法。针对 IgG 的半衰期改造,我们从 Fc 段改造、
pI 改造、糖基化改造、pH 依赖性抗原结合抗体等
方面对其改造原理、改造常用的方法及其缺陷和创
新性技术进行了详细介绍。另外,对于 Nb 的半衰期
改造,我们以蛋白融合、化学修饰和红细胞载体为重
点,同样从原理、常用方法及其优缺点和创新性技术
等方面进行了概述。最后,针对现有治疗性抗体半
衰期改造方法所存在的一些问题,对未来治疗性抗
体药物半衰期改造可能的策略和趋势进行展望。

1 IgG 的半衰期改造

1.1 Fc 段改造

由于 IgG 的 Fc 段与 FcRn 的 pH 依赖性的相互
结合及循环机制对 IgG 的半衰期特征十分重要,研
究者们主要通过优化 Fc 段的蛋白序列来改善两者间
的结合强度,提高两者在酸性(pH=6)条件下的结
合并维持两者在中性(pH=7.4)条件下的正常解离,

从而延长 IgG 的半衰期。优化 Fc 段传统方法包括丙氨酸扫描^[14]、定点诱变^[15-18]、分子建模^[4]和随机突变^[17], 通过替换 IgG 的 Fc 段中与 FcRn 结合位点或位点附近的氨基酸, 从而获得 Fc 段变体库, 再结合噬菌体展示技术进行蛋白质筛选并验证, 最终得到与 FcRn 高亲和力结合的 Fc 段变体, 从而突破了以往单点突变所带来的局限性。其中, 最经典的且已被广泛引入到临床治疗性 IgG 抗体中的突变组合有 YTE (M252Y/S254T/T256E)^[19-21]和 LS (M428L/N434S)^[22-23], 它们能在不影响 IgG 的 Fab 段与靶抗原的结合亲和力的情况下增强与 FcRn 的结合, 从而延长 IgG 抗体的半衰期。在具体的临床应用中, 经过 YTE 改造后针对呼吸道合胞病毒的莫塔韦单抗 (motavizumab) 对人 FcRn 的亲和力提高了 10 倍, 且半衰期延长至 60 d 以上^[19]; 另外, YTE 改造后针对严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SRAS-CoV-2) 抗体药物 AZD7442 的半衰期延长了近 3 倍^[24-25]。除此之外, LS 同样也被引入到用于治疗新型冠状病毒感染 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) 的索托韦单抗 (sotrovimab) 中以延长其半衰期^[23], 而 Zalevsky 等^[4]也通过在贝伐单抗 (bevacizumab) 的 Fc 段引入 LS 突变, 使得 bevacizumab 在食蟹猴体内的半衰期从 9.7 d 延长至 31.1 d。

在某些情况下, Fc 段突变不可避免地会对 IgG 抗体中 Fc 段的其他效应器功能和自身稳定性带来影响。为了解决这一问题, Booth 等^[26]开发了一种基于结构分析和网络分析的框架, 通过分析在酸性条件下 Fc 段与 FcRn 的结合的结构域, 在维持 Fc 段与具有效应器功能的受体 [补体第 1 成分 q (complement component 1q, C1q)、三基序蛋白 21 (tripartite motif protein 21, TRIM21)、FcγRI、FcγRIIa/b、FcγRIIIa 等] 的正常结合的条件下, 绘制出各个突变相互作用的网络图, 并将筛选后得到的突变进行组合, 再评估组合突变体的性能。最终筛选得到 5 种 Fc 段突变组合 DF183 (T256D/Q311V/A378V)、DF197 (H285N/T307Q/N315D)、DF213 (H285D/T307Q/A378V)、DF215 (T307Q/Q311V/A378V)、DF228 (T256D/

H286D/T307R/Q311V/A378V)。且其验证实验表明, DF228 突变型 motavizumab 在食蟹猴中的半衰期与野生型相比提高了 3.5 倍 (与 YTE 突变型相当甚至有所提高)^[19]。Mackness 等^[27]运用点饱和突变技术在 IgG1 Fc 段的 11 处与 FcRn 结合位点进行了突变并筛选得到 3 种不破坏 IgG 与 FcγR III a 的结合亲和力和 IgG 与 FcRn 结合的 pH 依赖性、并且与人体内关键免疫原性标志物 RF 的结合亲和力低的组合变体 YD (M252Y/T256D)、DQ (T256D/T307Q) 和 DW (T256D/T307W)。而为了维持抗体突变体的稳定性, Borrok 等^[28]通过分析 TM (L234F/L235E/P331S)-YTE 中单个突变对抗体热稳定性的影响, 随后用提高热稳定性的新突变取代不稳定突变的方法发现了一种新的组合突变体 FQQ-YTE (L234F/L235Q/K322Q/M252Y/S254T/T256E), 其稳定性比 TM-YTE 更高且具有与 TM-YTE 相同的生物活性。Lee 等^[29]以优化 Fc 段与 FcRn 结合的 pH 依赖性为目的, 从 Fc 段突变库中筛选获得了一种新的组合突变 L309D/Q311H/N434S (DHS), 其在保持 IgG 完整的效应功能的同时, 显著提高了 IgG 的半衰期; Ko 等^[30]同样以优化 Fc 段与 FcRn 结合的 pH 依赖性为目的, 利用膜蛋白漂移和组装 (membrane protein drift and assembly, MPDA) 细菌展示系统, 从 Fc 段变体库中筛选得到一种新的组合突变 PFc29 (Q311R/M428L), 曲妥珠单抗 (trastuzumab)-PFc29 在食蟹猴模型中的半衰期比 trastuzumab-YTE 和 trastuzumab-LS 的半衰期增加了 6 d 左右, 同时增强了 trastuzumab 的补体依赖的细胞毒性作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 和抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)。为了进一步提高 Fc 段变体库的通量并降低筛选的成本, Chen 等^[31]开发了一种基于哺乳动物展示技术和二代测序技术的 Fc 变体库筛选方法, 将 Fc 段变体库的通量由以前的数千个增加至数百万个, 并且哺乳动物展示技术与噬菌体展示技术或酵母菌展示技术相比, 能较大程度地保留了 IgG Fc 段的糖基化结构, 使得 Fc 段改造与 IgG 糖基化改造很好地结合并筛选出性能更强的工程化 IgG 抗体。

综上所述, 在对 IgG 的 Fc 段进行改造以增强 Fc 段与 FcRn 的结合并延长其半衰期的同时, 不仅需要在提高酸性的条件下保持 Fc 段与 FcRn 的结合力, 同时维持中性的条件下两者的正常解离, 还需要考虑改造后的 Fc 段对 IgG 其他性能的影响, 如结构稳定性、与靶抗原的结合亲和力 (Fab 段的功能)、与补体或其他 Fc 段功能性受体的结合亲和力等。再者, Fc 段突变所导致的 IgG 半衰期延长在体内与体外以及不同物种间都是存在差异的^[32], 因此需要提前对抗体的各项理化性质以及在不同物种之间的差异性进行分析, 以确保抗体经 Fc 段改造后达到半衰期预期的延长效果。

1.2 pI 改造

IgG 抗体的 pI 是其重要的物理性质之一, 众多研究证实了通过改变抗体表面所带电荷量及其电荷分布可以改变 IgG 的半衰期。人们普遍认为通过降低抗体整体的净正电荷来降低其 pI 值, 能够减少抗体与带负电荷的细胞膜之间的非特异性相互作用, 从而在一定程度上降低细胞对抗体的摄取速率和抗体的清除速率。除此之外, 有研究还发现了 IgG Fv 区的正电荷斑块会促进抗体与 FcRn 的结合, 使得其中性 pH 条件下与 FcRn 的解离速度降低, 从而影响了 IgG 的 PK 性质^[33-34]。

早期研究者们采用化学偶联法将 IgG 阳 / 阴离子化^[35-36], 从而引起 IgG 抗体 PK 的变化, 但运用该方法得到的 IgG 变体的 pI 并不完全一致, 这导致研究者无法准确地评估 IgG 自身电荷变化对其半衰期的影响程度。随后, Li 等^[37]发现在对人源化的抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) IgG 的 ki/VH3 框架区序列进行改造的过程中, 因抗体所带负电荷增加而改善了抗体的 PK。但这种抗体框架区氨基酸序列变化所引起的抗体 pI 变化的范围非常狭窄, 并且由于结合不同靶标的 IgG 抗体具有不同的理化性质特征, 使得部分人源化 IgG 的 pI 值变化后并不引起其半衰期的改变, 因此限制了该方面的应用。近年来, 越来越多的研究致力于通过改造 IgG Fab 段来降低 IgG 的 pI 值或改变其表面的电荷分布。例如, Igawa 等^[38]通过对抗白细胞介素 6 受体 (interleukin 6 receptor,

IL-6R) IgG 的 Fab 段中的氨基酸进行定点诱变产生 pI 值比野生型低 1 ~ 2 个 pI 单位的 IgG 变体, 使得该变体半衰期延长了 2.4 倍。Datta-Mannan 等^[39]则利用分子建模技术将互补决定区 (complementarity determining region, CDR) 带正电荷的氨基酸残基进行了替换, 在不影响抗体整体 pI 值的条件下平衡了 CDR 的电荷分布, 进而延长了抗体的血清半衰期。但通过改造 Fab 段来实现 IgG 的 pI 值或电荷分布变化的策略可能会同时引起其抗原特异性结合能力减弱或理化性质 (稳定性、溶解度和黏度) 的改变, 而如果严格控制这些影响因素, 将会导致筛选出来的能够有效延长 IgG 半衰期的突变类型十分有限。

1.3 糖基化改造

IgG 是人血清中含量最多的糖蛋白, 糖基化作为其翻译后修饰的重要生物反应之一, 对其半衰期、亲和力、Fc 段结构及其效应功能等方面有重要影响。IgG 在内质网和高尔基体中发生的糖基化反应主要为 Fc 段 CH2 结构域氨基酸残基 Asn297 上的 N-连接糖基化, 少数 IgG 的糖基化反应发生在 Fab 段^[40]。对 IgG 的半衰期有影响的聚糖主要包括甘露糖、唾液酸、半乳糖, IgG 的 N-聚糖结构不会显著影响其与 FcRn 的结合, 但会通过相关受体介导的选择性糖蛋白清除途径来影响其半衰期。例如, 肝中的去唾液酸糖蛋白受体可结合 IgG N-末端的半乳糖而将 IgG 清除, 甘露糖受体可与 IgG N-末端的甘露糖或 N-乙酰氨基葡萄糖残基结合并将其清除, 另外, IgG N-末端的甘露糖和半乳糖还可通过凝集素介导的清除反应而引起半衰期缩短^[41]。

大量研究证实含高甘露糖型的 IgG 与含其他糖型的 IgG 相比清除速度更快、半衰期更短^[42-43]。Newkirk 等^[44]和 Winkelhake 等^[45]通过去除 N-末端半乳糖以及 N-乙酰氨基葡萄糖使得 IgG 的半衰期明显延长。此外, 唾液酸化对 IgG 在血浆中的半衰期也至关重要, 唾液酸糖链的存在极大地增加了 IgG 所带负电荷的数量, 减少了受体介导的内吞作用, 从而延长了 IgG 的半衰期。Ludwig 等^[46]通过在体系中加入唾液酸前体 (1, 3, 4-O-Bu₃ ManNac) 将抗白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) IgG 唾液酸化, 结果发现该 IgG 的半衰期由原来的 39.5 h 延长至

60.9 h, 且其生物活性和稳定性没有受到糖基化的影响。Bas 等^[47]还将 IgG Fc 段的高唾液酸化与 Fc 段随机突变相结合, 得到的高唾液酸化 IgG 突变体, 经半衰期检测发现, 唾液酸化既可直接延长 IgG 抗体的半衰期, 也能与 Fc 段突变一起协同延长 IgG 的半衰期。另外, 也有研究发现 IgG Fab 段的唾液酸化可增强抗表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) IgG 单抗 (cetuximab) 和抗 MUC1 IgG 单抗 (pankomab) 的血清半衰期^[48]。

1.4 抗原结合部位 pH 依赖性改造

IgG 除了被细胞非特异性摄取并被胞内溶酶体以降解的方式清除之外, 还可以通过与相应抗原特异性结合的方式被免疫细胞内吞并清除。通常与膜抗原结合的抗体会因迅速与抗原一起内化而被快速清除, 这种现象被称为靶介导的药物处置 (target-mediated drug disposition, TMDD)。为了减少这类抗体的快速清除, 一种基于抗原结合部位 pH 依赖性 IgG 的工程化技术被提出并受到广泛关注^[49-51], 该抗体在血液中与靶抗原结合后被免疫细胞内吞至核内体中, 核内体所提供的酸性条件 (pH=6.0) 可以降低抗体与靶抗原的亲和力, 从而加速抗体与抗原的解离, 解离后的抗体可被 FcRn 介导的循环作用而重新回到血液中, 而靶抗原则被运输至溶酶体中被降解, 从而在有效降解靶抗原的同时最大限度地减少了 TMDD 介导的抗体快速清除并延长了抗体半衰期。

最常用的抗原结合部位 pH 依赖性改造的方法是组氨酸突变^[52-53], 即在 CDR 或骨架区被引入组氨酸, 利用组氨酸在酸性核内体中质子化和在中性血液中去质子化的电荷特性实现了其与抗原的解离与结合。但通过表面逐个组氨酸突变来达到改造目的的策略耗时耗力, 并且获得的突变型 IgG 虽然能在酸性 pH 下减弱与抗原的结合亲和力, 但在某些情况下也可能同时降低其在中性条件 (pH=7.4) 下与抗原的结合亲和力, 从而降低了其对靶标识别能力。对此, 研究者在技术上做了进一步改进。Schröter 等^[54]通过使用联合组氨酸扫描文库和酵母展示技术的策略筛选并合成了抗原结合部位 pH 依赖性的抗肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) IgG 单抗, 所获得的工程化 IgG 抗体在 pH

=6.0 条件下与抗原的解离速率常数增加了 230~780 倍, 但是在 pH=7.4 下保持了与抗原的结合活性, 并且, 这种基于高通量技术开展的组合文库筛选使得工作量大大减少。Bonvin 等^[55]以 1 个 VH 结构域和 7 个 VL 结构为基础并在其 CDR3 处引入足量的组氨酸突变, 建立了富含组氨酸的 scFv 噬菌体库, 利用噬菌体展示技术筛选获得与 CXC 趋化因子配体 10 (C-X-C chemokine ligand 10, CXCL10) 以 pH 依赖性方式结合的轻链可变区和重链可变区, 并将两者重组构成完整的抗 CXCL10 IgG1, 该 IgG1 在 pH 为 6 时与 CXCL10 的亲和力系数比在 pH=7.4 时降低了 2.4 倍, 这种“从头筛选”的方法更具有通用性并且提高了筛选过程的效率, 之后也被运用到了合成抗原结合部位 pH 依赖性的抗葡萄球菌肠毒素 B IgG 和抗 EGFR IgG 中^[56-57]。

1.5 抗原结合钙离子依赖性改造

由于抗体的抗原结合 pH 依赖性改造始终需要依赖于其组氨酸残基的质子化, 该过程发生在酸性核内体中, 质子化后的抗体与抗原表位中带正电或质子供体残基之间产生静电排斥, 导致抗体与抗原解离, 最终使得抗体重新回到血液中。但某些抗体在酸性 pH 环境下是与抗原带负电荷或成为质子受体的表位相结合的, 这将导致抗体即使经过组氨酸改造, 也不会产生抗原结合 pH 依赖性。为了克服这一限制, Hironiwa 等^[58]探索了一种替代性方法, 利用血液与核内体之间钙离子浓度的差异, 通过在含钙离子的溶液中将抗体与人 IL-6R 结合并在无钙离子的溶液中进行洗脱的步骤对人噬菌体抗体库进行筛选, 最终筛选得到一种抗原结合部位钙离子依赖性 IgG, 该抗体可在循环中被重复利用, 并且加速了机体对抗原的清除。但是, 从人抗体库中筛选出抗原结合部位钙离子依赖性 IgG 的种类和数量有限, 需要更多的研究来提升该技术的普适性。

2 纳米抗体的半衰期改造

2.1 与长半衰期蛋白融合

由于 Nb 的尺寸较小, 在肾滤过屏障的相对分子质量阈值 (60 000) 以下, 致使 Nb 在人体内的半衰期低至几小时甚至几分钟。因此, 通过将 Nb 与

一些具有长半衰期的蛋白融合表达形成更大相对分子质量的蛋白成为了延长其半衰期的有效方法之一。人体内具有长半衰期的蛋白主要是人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 和 IgG, 两者的相对分子质量都大于肾滤过蛋白质的相对分子质量阈值, 并且 IgG 的 Fc 段融合能使 Nb 直接参与 FcRn 结合介导药物的胞内循环过程, 从而更有效地提升药物的半衰期。

直接与 HSA (相对分子质量为 66 000) 连接形成融合蛋白很可能会使 Nb 失去其小分子优势 (高渗透性、高溶解度), 因此, 研究者们往往采用在 Nb 上融合能与 HSA 结合的小分子蛋白质, 如相对分子质量为 5 000~6 000 的白蛋白结合结构域^[59] 和小于 15 000 的抗 HSA Nb^[60]。例如, Morais 等^[61] 将白蛋白结合结构域与抗 TNF Nb 进行了融合, 结果发现融合蛋白 VHH-Zag (相对分子质量为 25 200) 的 24 h 血液清除率和总排泄量均显著低于未融合的 Nb, 从而延长了抗 TNF Nb 的半衰期; Sato 等^[62] 将抗细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) Nb (H11) 与抗 HSA Nb 融合形成 H11-HLE (相对分子质量为 27 200), 在小鼠体内进行 PK 实验发现 H11-HLE 融合蛋白在血浆和肿瘤中的半衰期与 H11 相比延长了 10 倍, 且 H11-HLE 保持了与 H11 相似的抗原结合亲和力。相比较而言, 将 Nb 与 Fc 段进行融合表达是延长 Nb 半衰期的主要手段之一, 但该方法在延长 Nb 抗体半衰期的同时还赋予了 Nb 其他特性, 如 Li 等^[63] 为了提高抗人蛋白原转化酶枯草杆菌蛋白酶 /kexin9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) Nb 的半衰期以及靶向性, 将抗人 PCSK9 Nb 的二聚体与 IgG4 的 Fc 段进行了融合, 所获得的融合蛋白不仅半衰期长, 而且增强了其稳定性和降脂效果。另外, Nb 与 IgG 的 Fc 段的融合还可以赋予其 Fc 相关的效应器功能 [如 ADCC、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) 和 CDC], 使得该方法在抗肿瘤药物研发领域被广泛应用^[64], 也有研究者通过 Nb 与二硝基苯酚 (di-nitro phenol, DNP) 半抗原偶联的方式招募抗 DNP 抗体, 以此来达到

相同的效果^[65-66]。此外, 还有研究者通过将 Nb 以 24 聚体的形式结合在铁蛋白表面, 构建出了一种新型的纳米抗体铁蛋白-Nb 融合蛋白——Fenobody, Fenobody 与常规 Nb 相比具有更强的抗原结合亲和力 (约 360 倍) 和更长的半衰期 (约 10 倍)^[67]。

2.2 化学修饰

Nb 除了通过与上述蛋白质融合来增加相对分子质量以减少肾脏滤过率之外, 还能通过一些化学修饰的方式来达到相同的目的。最经典且技术最为成熟的化学修饰是聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰^[68]。PEG 是一种高度韧性、亲水性且不能被生物降解的生物相容性大分子, 不仅能够显著改善 Nb 及其他小分子蛋白质在体内的循环半衰期, 还可以降低它们的免疫原性、提高其稳定性和水溶性, 因此被美国 FDA 批准广泛应用于药物的 PK 改造^[69-71]。但 PEG 修饰也存在一些弊端, 比如随机化的 PEG 修饰会影响 Nb 的治疗效果^[72]、长期使用 PEG 修饰后的 Nb 会导致 PEG 在体内大量堆积而对机体产生毒性作用, 并且 PEG 自身也具有免疫原性, 一旦造成机体产生相应抗体, 很可能会影响药物的治疗效果或引发其他的不良反应。

为了弥补 PEG 修饰的缺陷, 一些 PEG 模拟肽开始被广泛应用, 脯氨酸-丙氨酸-丝氨酸 (proline-alanine-serine, PAS) 序列即为其中之一。PAS 具有免疫原性低、不会在肾脏积累以及不需要通过复杂的化学偶联反应与蛋白质连接等独特优势, 使其在 Nb 半衰期改造中得到应用。Khodabakhsh 等^[73-74] 首次将 PAS 重复序列连接至抗 VEGF Nb 上, 使得 Nb 终末半衰期显著增加了 14 倍, 同时发现 PAS 在不改变 Nb 生物活性的情况下, 提高了 Nb 的抗原结合能力并对正常细胞没有表现出任何细胞毒性。另外, 作为 PEG 替代性化合物的 XTEN 也同样具有良好的安全性和较低的免疫原性, 它是一种非结构化的亲水性多肽, 能够有效、精准地延长所修饰的肽和蛋白质的半衰期^[75], 最初应用于人类生长激素^[76]、胰高血糖素样肽 2^[77]、胰高血糖素^[78] 和凝血因子^[79] 等蛋白类治疗性药物的半衰期延长。近年也有研究者将 XTEN 与 scFv 融合, 构建出一种靶向肿瘤相关抗原 [人表皮生长因子受体-2 (human epidermal

growth factor, HER2) 或 EGFR] 和分化簇 3 (cluster of differentiation 3, CD3) 的双特异性 T 细胞结合剂 XPAT, 在延长 scFv 半衰期的同时提高了其抗肿瘤活性和稳定性, 并保证了 XPAT 的安全性^[80]。虽然目前还未有研究者对 XTEN 延长 Nb 半衰期进行实验探究, 但就上述研究可见 XTEN 应用的广泛性, 说明其在 Nb 半衰期延长领域具有巨大潜力。除此之外, 弹性蛋白样五肽 (elastin-like pentapeptide, ELP) 修饰也被证实在保持 Nb 的体内生物活性的同时, 能减少 Nb 通过网状内皮系统而被大量清除, 从而延长其半衰期, 并因其高度的生物安全性而得到广泛应用^[81-83]。如 Conrad 等^[84]设计了一种 ELP 修饰的抗 TNF Nb, 其在体内的存留时间相对于未修饰的抗 TNF Nb 延长约 24 倍, 并可以在植物中实现高效表达。

2.3 利用红细胞载体

红细胞 (red blood cell, RBC) 可以作为许多小分子物质的载体, 具有长循环半衰期 (120 d)、缺乏细胞核、对机体来说缺乏自身免疫原性、可被机体有效清除并诱导机体对附着于 RBC 表面的外来物质产生免疫耐受的特性^[85]。因此, 与化学修饰相比, 以 RBC 作为 Nb 的载体的方法对机体来说安全性更高。

目前, 已经开发了几种连接 RBC 与 Nb 的技术。传统的方式是通过借助短肽或化学交联剂将 Nb 与 RBC 表面的膜蛋白偶联, 但是在 RBC 上的偶联位点往往缺乏特异性, 或者涉及的操作步骤过多, 容易使 RBC 受损而被机体快速识别并清除。为了保护 RBC 并维持其天然生物学特异性, Huang 等^[86]开发了一种新的策略, 通过基因修饰的方式将抗 A 型肉毒杆菌神经毒素 (botulinum neurotoxin type A, BoNT/A) 的 Nb 的序列与 RBC 膜上的糖蛋白 A (glycophorin A, GPA) 嵌合并表达在小鼠 RBC 表面, 在维持 RBC 正常生理功能的同时使抗 BoNT/A Nb 的半衰期延长至 28 d。虽然该方法更为精准, 但对祖红细胞进行基因改造的过程十分耗时、昂贵; 并且无法保证经体外培养后获得的成熟 RBC 全部为无核 RBC, 因此可能在后续实验中造成 RBC 遗传物质的传播。随后, Harmand 等^[85]又进行了创新, 他们设计了一种突变的天冬酰胺内肽酶 (Cys247Ala-OaAEP1), 该酶可

以识别改造后的 Nb 上的三肽序列 (Asn-Xaa-Yaa, Xaa 通常为脂肪族氨基酸, Yaa 通常为侧链氨基酸), 并催化 Nb 与 RBC 之间的连接反应。该方法不仅过程简单、快速, 而且对 Nb 和 RBC 的正常生理特性均没有较大影响, 具有一定的通用性。

2.4 多价纳米抗体

多价 Nb 是解决 Nb 半衰期问题的途径之一, 通过利用基因重组技术或柔性连接物的方式将相同或不同的 Nb 组合成一个更大相对分子质量的融合蛋白, 同时多价结构也能在一定程度上增强整个融合蛋白的抗原结合亲和力。例如, Sadeghi 等^[87]将羊驼 IgG2c 的铰链区序列插入到 2 个编码抗 VEGF Nb 的序列中间, 形成二价 Nb, 研究发现该二价 Nb 在抑制人内皮细胞增殖、成管和迁移方面均明显优于单价 Nb, 且 PK 结果表明二价 Nb 的半衰期比单价 Nb 长 1.8 倍; Ma 等^[88]将编码程序性死亡受体-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) Nb 和抗 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白 (T cell immune receptor with Ig and ITIM domains, TIGIT) Nb 的基因克隆至含人 IgG4 Fc 段的载体中, 成功构建了四价 PD-L1/TIGIT 双特异 Nb, 其相较于单价抗体具有更高的阻断活性。此外, 也有研究者利用柔性连接肽 Gly-Ser (GS) 将 3 个抗呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) Nb 连接成一种抗 RSV 的三价 Nb ALX-0171, 其对 RSV 的中和效力增强了 6 000 倍, 且目前已进入 II 期临床试验^[89]; Koenig 等^[90]也利用柔性连接肽 (Gly₄Ser)₃ 将抗 SARS-CoV-2 Nb 连接形成二价或三价的抗 SARS-CoV-2 Nb, 其中活性达到单价 Nb 的 100 倍以上。柔性连接肽具有灵活性、稳定性等特点, 但其缺乏刚性, 可能导致融合蛋白表达下降或生物活性丧失, 因此, Xiang 等^[91]同时利用 (EAAAK)₃₁ 刚性连接肽序列将与 SARS-CoV-2 刺突蛋白受体结合域中不同表位结合的 Nb 连接成具有高中和效力的多价 Nb。

3 结语与展望

在抗体药物发展历程中, 以 IgG 为主的治疗性单克隆抗体药物因特异性高、半衰期长、安全性好, 使其在抗体药物市场中长期占据主导地位。研究者们

在不断地挖掘新的药物靶点以研发新型抗体药物的同时,也在通过延长已有的治疗性抗体半衰期的方式来提高其治疗效果。在延长 IgG 半衰期的相关方法中,针对其 Fc 区改造的研究最多且最成熟,在临床中应用最为广泛的 YTE 和 LS 变体不仅使得抗体的半衰期大大延长,也保护了抗体的抗原识别特性。但在 Fc 区引入突变,改变 Fc 与 FcRn 结合 pH 依赖性的同时,还应注意突变对抗体的 Fc 效应功能、结构稳定性的影响。而针对这些影响,研究者们也通过建立 Fc 变体库并结合噬菌体展示技术、计算机辅助结构模拟技术、点饱和突变技术等方法获得了更多半衰期延长的 Fc 突变组合,且不会对 IgG 的其他功能造成影响。此外,改变 IgG 的 pI 或电荷分布也是延长其半衰期的常用方法,通过化学偶联或诱导 IgG 的氨基酸序列突变使其 pI 降低或均衡电荷来达到改造目的,但这些方法都存在局限性。而 IgG 的糖基化改造对理化性质的影响是多方面的,通过降低 IgG 中的甘露糖、半乳糖或 N-乙酰氨基葡萄糖的方式可减少其与一些糖受体结合从而降低其清除率,通过唾液酸化也可延长其半衰期,还有研究者证实联合 Fc 突变与唾液酸化可以协同增强抗体半衰期。另外,赋予 IgG pH 依赖性或者钙离子依赖性的抗原结合能力可以降低其胞内特异性清除速度,从而改善其半衰期。通常采用在 Fab 区引入组氨酸的方式来制备 pH 依赖性抗原结合抗体,但过程中需要特别注意对中性 pH 下 IgG 与抗原正常结合的影响。

Nb 的半衰期改造是进一步改善 Nb 药物疗效的重要方向。Nb 的半衰期改造策略主要有 4 种:与长半衰期蛋白融合、化学修饰、利用 RBC 载体和多

价 Nb。基于上述策略,目前较为成熟的技术包括人 HSA 融合、Fc 融合、PEG 修饰以及多价 Nb。Nb 直接与人 HSA 融合可能会导致其小尺寸优势的丢失,因此,许多研究者后来选择将 Nb 与白蛋白结合域(albumin binding domain, ABD)或抗 HAS Nb 进行融合;Fc 融合在延长 Nb 半衰期的同时赋予其 Fc 相关的效应器功能,更有利于 Nb 应用于抗肿瘤等疾病的治疗;PEG 修饰作为最经典且技术最为成熟的化学修饰方法已经在包括 Nb 在内的多种蛋白质的性能优化上得到应用,但也有研究表明该方法也存在一定安全隐患,由此研究者尝试开发相对分子量较小的 PEG 模拟肽。除此之外,利用 RBC 载体的相关技术也在不断进步并朝着通用化的方向发展。最后,多价 Nb 也因在延长 Nb 半衰期的同时增强了 Nb 的抗原结合能力而得到应用。

总之,IgG 和 Nb 的相关半衰期改造技术各有优劣,而且,各种治疗性抗体自身性质以及与相应抗原结合的表位结构的差异也会导致抗体药物半衰期差异较大。因此,治疗性抗体半衰期改造并没有一个通用的最佳策略,需要结合有关性质进行合理选择。同时,不同改造技术的相互结合也可以作为一种新的策略来协同提高抗体药物的半衰期。在未来的研究中,随着人工智能(artificial intelligence, AI)技术和深度学习技术的不断迭代,使其在结构生物学方面得到广泛的运用,促使更多蛋白晶体结构得到了更深层次的解析,我们将更加全面的了解 IgG 和 Nb 抗体的结构及其效应功能,因此,基于 AI 的结构预测算法将会使得抗体药物半衰期的改造迈入更加快速、精准和科学的轨道。

【参考文献】

- [1] 陈静,康赐明,罗文新. 治疗性抗体半衰期改造研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(5): 87-96.
- [2] Lyu X C, Zhao Q C, Hui J L, et al. The global landscape of approved antibody therapies[J]. *Antib Ther*, 2022, 5(4): 233-257.
- [3] Goulet D R, Atkins W M. Considerations for the design of antibody-based therapeutics[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(1): 74-103.
- [4] Zalevsky J, Chamberlain A K, Horton H M, et al. Enhanced antibody half-life improves *in vivo* activity[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(2): 157-159.
- [5] Schroeder Jr H W, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2 Suppl 2): 41-52.
- [6] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(1): 34-47.
- [7] Morell A, Terry W D, Waldmann T A. Metabolic properties of IgG subclasses in man[J]. *J Clin Invest*, 1970, 49(4): 673-680.

- [8] Chen W Z, Yuan Y, Jiang X Q. Antibody and antibody fragments for cancer immunotherapy[J/OL]. *J Control Release*, 2020, 328: 395–406[2023-10-01]. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.021>.
- [9] 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[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5702627/>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01603.
- [10] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, *et al*. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446–448.
- [11] Vincke C, Loris R, Saerens D, *et al*. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3273–3284.
- [12] Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, *et al*. Single-domain antibody fragments with high conformational stability[J]. *Protein Sci*, 2002, 11(3): 500–515.
- [13] Morrison C. Nanobody approval gives domain antibodies a boost[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(7): 485–487.
- [14] Shields R L, Namenuk A K, Hong K, *et al*. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(9): 6591–6604.
- [15] Yeung Y A, Leabman M K, Marvin J S, *et al*. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates[J]. *J Immunol*, 2009, 182(12): 7663–7671.
- [16] Dall'acqua W F, Woods R M, Ward E S, *et al*. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences[J]. *J Immunol*, 2002, 169(9): 5171–5180.
- [17] Monnet C, Jorieux S, Souyris N, *et al*. Combined glyco- and protein-Fc engineering simultaneously enhance cytotoxicity and half-life of a therapeutic antibody[J]. *MAbs*, 2014, 6(2): 422–436.
- [18] Monnet C, Jorieux S, Urbain R, *et al*. Selection of IgG variants with increased FcRn binding using random and directed mutagenesis: impact on effector functions[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 39[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4316771/>. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00039.
- [19] Robbie G J, Criste R, Dall'acqua W F, *et al*. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6147–6153.
- [20] Kaplon H, Reichert J M. Antibodies to watch in 2021[J/OL]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1860476[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7833761/>. DOI: 10.1080/19420862.2020.1860476.
- [21] Dall'acqua W F, Kiener P A, Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(33): 23514–23524.
- [22] Sievers S A, Scharf L, West A P, *et al*. Antibody engineering for increased potency, breadth and half-life[J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2015, 10(3): 151–159.
- [23] Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, *et al*. Early treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(21): 1941–1950.
- [24] Loo Y M, Mctamney P M, Arends R H, *et al*. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in nonhuman primates and has an extended half-life in humans[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(635): eab18124[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8939769/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.abl8124.
- [25] Gruell H, Vanshyla K, Weber T, *et al*. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2[J]. *Immunity*, 2022, 55(6): 925–944.
- [26] Booth B J, Ramakrishnan B, Narayan K, *et al*. Extending human IgG half-life using structure-guided design[J]. *MAbs*, 2018, 10(7): 1098–1110.
- [27] Mackness B C, Jaworski J A, Boudanova E, *et al*. Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life[J]. *MAbs*, 2019, 11(7): 1276–1288.
- [28] Borrok M J, Mody N, Lu X, *et al*. An "Fc-Silenced" IgG1 format with extended half-life designed for improved stability[J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(4): 1008–1017.
- [29] Lee C H, Kang T H, Godon O, *et al*. An engineered human Fc domain that behaves like a pH-toggle switch for ultra-long circulation persistence[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5031[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834678/>. DOI: 10.1038/s41467-019-13108-2.
- [30] Ko S, Park S, Sohn M H, *et al*. An Fc variant with two mutations

- confers prolonged serum half-life and enhanced effector functions on IgG antibodies[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(11): 1850–1861.
- [31] Chen D, Zhao Y, Li M, *et al.* A general Fc engineering platform for the next generation of antibody therapeutics[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1901–1917.
- [32] Ramdani Y, Lamamy J, Watier H, *et al.* Monoclonal antibody engineering and design to modulate fc γ n activities: a comprehensive review[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17)[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9455995/>. DOI: 10.3390/ijms23179604.
- [33] Schoch A, Kettenberger H, Mundigl O, *et al.* Charge-mediated influence of the antibody variable domain on Fc γ n-dependent pharmacokinetics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(19): 5997–6002.
- [34] Grevys A, Frick R, Mester S, *et al.* Antibody variable sequences have a pronounced effect on cellular transport and plasma half-life[J/OL]. *iScience*, 2022, 25(2): 103746[2023-10-01]. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103746>.
- [35] Lee H J, Pardridge W M. Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation, pharmacokinetics, and tumor imaging[J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(3): 546–553.
- [36] Kobayashi H, Le N, Kim I S, *et al.* The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(2): 422–430.
- [37] Li B, Tesar D, Boswell C A, *et al.* Framework selection can influence pharmacokinetics of a humanized therapeutic antibody through differences in molecule charge[J]. *MAbs*, 2014, 6(5): 1255–1264.
- [38] Igawa T, Tsunoda H, Tachibana T, *et al.* Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2010, 23(5): 385–392.
- [39] Datta-Mannan A, Thangaraju A, Leung D, *et al.* Balancing charge in the complementarity-determining regions of humanized mAbs without affecting pI reduces non-specific binding and improves the pharmacokinetics[J]. *MAbs*, 2015, 7(3): 483–493.
- [40] Abel C A, Spiegelberg H L, Grey H M. The carbohydrate contents of fragments and polypeptide chains of human γ -G-myeloma proteins of different heavy-chain subclasses[J]. *Biochemistry*, 1968, 7(4): 1271–1278.
- [41] Higel F, Seidl A, Sörgel F, *et al.* N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins[J/OL]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 100: 94–100[2023-10-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26775146/>. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.01.005.
- [42] Kanda Y, Yamada T, Mori K, *et al.* Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types[J]. *Glycobiology*, 2007, 17(1): 104–118.
- [43] Goetze A M, Liu Y D, Zhang Z, *et al.* High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans[J]. *Glycobiology*, 2011, 21(7): 949–959.
- [44] Newkirk M M, Novick J, Stevenson M M, *et al.* Differential clearance of glycoforms of IgG in normal and autoimmune-prone mice[J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 106(2): 259–264.
- [45] Winkelhake J L, Nicolson G L. Aglycosylantibody. Effects of exoglycosidase treatments on autochthonous antibody survival time in the circulation[J]. *J Biol Chem*, 1976, 251(4): 1074–1080.
- [46] Ludwig S D, Bernstein Z J, Agatemor C, *et al.* A versatile design platform for glycoengineering therapeutic antibodies[J/OL]. *MAbs*, 2022, 14(1): 2095704[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272841/>. DOI: 10.1080/19420862.2022.2095704.
- [47] Bas M, Terrier A, Jacque E, *et al.* Fc sialylation prolongs serum half-life of therapeutic antibodies[J]. *J Immunol*, 2019, 202(5): 1582–1594.
- [48] van de Bovenkamp F S, Hafkenscheid L, Rispens T, *et al.* The emerging importance of IgG fab glycosylation in immunity[J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1435–1341.
- [49] Igawa T, Mimoto F, Hattori K. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(11): 1943–1950.
- [50] Henne K R, Ason B, Howard M, *et al.* Anti-PCSK9 antibody pharmacokinetics and low-density lipoprotein-cholesterol pharmacodynamics in nonhuman primates are antigen affinity-dependent and exhibit limited sensitivity to neonatal Fc receptor-binding enhancement[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 353(1): 119–131.
- [51] Sampei Z, Haraya K, Tachibana T, *et al.* Antibody engineering to generate SKY59, a long-acting anti-C5 recycling antibody[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0209509[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6310256/>. DOI: 10.1371/journal.

- pone.0209509.
- [52] Igawa T, Haraya K, Hattori K. Sweeping antibody as a novel therapeutic antibody modality capable of eliminating soluble antigens from circulation[J]. *Immunol Rev*, 2016, 270(1): 132–151.
- [53] Hong S T, Su Y C, Wang Y J, *et al.* Anti-TNF α antibody humira with pH-dependent binding characteristics: a constant-pH molecular dynamics, gaussian accelerated molecular dynamics, and *in vitro* study[J/OL]. *Biomolecules*, 2021, 11(2)[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7926962/>. DOI: 10.3390/biom11020334.
- [54] Schröter C, Günther R, Rhiel L, *et al.* A generic approach to engineer antibody pH-switches using combinatorial histidine scanning libraries and yeast display[J]. *MAbs*, 2015, 7(1): 138–151.
- [55] Bonvin P, Venet S, Fontaine G, *et al.* *De novo* isolation of antibodies with pH-dependent binding properties[J]. *MAbs*, 2015, 7(2): 294–302.
- [56] Liu X M, Tian X X, Hao X Y, *et al.* A cross-reactive pH-dependent EGFR antibody with improved tumor selectivity and penetration obtained by structure-guided engineering[J/OL]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 27: 256–269[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9703009/>. DOI: 10.1016/j.omto.2022.11.001.
- [57] Kroetsch A, Qiao C, Heavey M, *et al.* Engineered pH-dependent recycling antibodies enhance elimination of *Staphylococcal* enterotoxin B superantigen in mice[J]. *MAbs*, 2019, 11(2): 411–421.
- [58] Hiraniwa N, Ishii S, Kadono S, *et al.* Calcium-dependent antigen binding as a novel modality for antibody recycling by endosomal antigen dissociation[J]. *MAbs*, 2016, 8(1): 65–73.
- [59] Cantante C, Lourenço S, Morais M, *et al.* Albumin-binding domain from *Streptococcus zooepidemicus* protein Zag as a novel strategy to improve the half-life of therapeutic proteins[J/OL]. *J Biotechnol*, 2017, 253: 23–33[2023-10-01]. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.017>.
- [60] Shen Z L, Xiang Y F, Vergara S, *et al.* A resource of high-quality and versatile nanobodies for drug delivery[J/OL]. *iScience*, 2021, 24(9): 103014[2023-10-01]. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103014>.
- [61] Morais M, Cantante C, Gano L, *et al.* Biodistribution of a ^{67}Ga -labeled anti-TNF VHH single-domain antibody containing a bacterial albumin-binding domain (Zag)[J/OL]. *Nucl Med Biol*, 2014, Suppl 41: e44–e48[2023-10-01]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969-8051\(14\)00012-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969-8051(14)00012-2). DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2014.01.009.
- [62] Sato Y, Casson C N, Matsuda A, *et al.* Fc-independent functions of anti-CTLA-4 antibodies contribute to anti-tumor efficacy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(10): 2421–2431.
- [63] Li X, Wang M, Zhang X, *et al.* The novel llama-human chimeric antibody has potent effect in lowering LDL-c levels in hPCSK9 transgenic rats[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2020, 9(1): 16[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7018876/>. DOI: 10.1186/s40169-020-0265-2.
- [64] Romano S, Moura V, Simões S, *et al.* Anticancer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of novel anti-nucleolin antibodies[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7450[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5945777/>. DOI: 10.1038/s41598-018-25816-8.
- [65] Hong H, Zhou Z, Zhou K, *et al.* Site-specific C-terminal dinitrophenylation to reconstitute the antibody Fc functions for nanobodies[J]. *Chem Sci*, 2019, 10(40): 9331–9338.
- [66] Liu J, Hong H, Shi J, *et al.* Dinitrophenol-mediated modulation of an anti-PD-L1 VHH for Fc-dependent effector functions and prolonged serum half-life[J/OL]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 165: 105941[2023-10-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34256102/>. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105941.
- [67] Fan K, Jiang B, Guan Z, *et al.* Fenobody: a ferritin-displayed nanobody with high apparent affinity and half-life extension[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(9): 5671–5677.
- [68] Zündorf I, Dingermann T. PEGylation--a well-proven strategy for the improvement of recombinant drugs[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(5): 323–326.
- [69] Chapman A P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(4): 531–545.
- [70] Francis G E, Fisher D, Delgado C, *et al.* PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques[J]. *Int J Hematol*, 1998, 68(1): 1–18.
- [71] Vugmeyster Y, Entrican C A, Joyce A P, *et al.* Pharmacokinetic, biodistribution, and biophysical profiles of TNF nanobodies

- conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol)[J]. *Bioconjug Chem*, 2012, 23(7): 1452–1462.
- [72] Turecek P L, Bossard M J, Schoetens F, *et al.* PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs[J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2): 460–475.
- [73] Khodabakhsh F, Norouzian D, Vaziri B, *et al.* Development of a novel nano-sized anti-VEGFA nanobody with enhanced physicochemical and pharmacokinetic properties[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(7): 1402–1414.
- [74] Khodabakhsh F, Salimian M, Mehdizadeh A, *et al.* New proline, alanine, serine repeat sequence for pharmacokinetic enhancement of anti-VEGF single-domain antibody[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 375(1): 69–75.
- [75] Podust V N, Balan S, Sim B C, *et al.* Extension of *in vivo* half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers[J/OL]. *J Control Release*, 2016, 240: 52–66[2023-10-01]. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.038>.
- [76] Cleland J L, Geething N C, Moore J A, *et al.* A novel long-acting human growth hormone fusion protein (Vrs-317): enhanced *in vivo* potency and half-life[J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(8): 2744–2754.
- [77] Alters S E, McLaughlin B, Spink B, *et al.* GLP2-2G-XTEN: a pharmaceutical protein with improved serum half-life and efficacy in a rat Crohn's disease model[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50630[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23189208/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0050630.
- [78] Geething N C, To W, Spink B J, *et al.* Gcg-XTEN: an improved glucagon capable of preventing hypoglycemia without increasing baseline blood glucose[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10175[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2854692/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0010175.
- [79] Demers M, Aleman M M, Kistanova E, *et al.* Efanesoctocog alfa elicits functional clot formation that is indistinguishable to that of recombinant factor VIII[J]. *J Thromb Haemost*, 2022, 20(7): 1674–1683.
- [80] Cattaruzza F, Nazeer A, To M, *et al.* Precision-activated T-cell engagers targeting HER2 or EGFR and CD3 mitigate on-target, off-tumor toxicity for immunotherapy in solid tumors[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(4): 485–501.
- [81] Rincón A C, Molina-Martinez I T, De Las Heras B, *et al.* Biocompatibility of elastin-like polymer poly(VPAVG) microparticles: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 78(2): 343–351.
- [82] Floss D M, Mockey M, Zanello G, *et al.* Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy[J/OL]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 274346[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855997/>. DOI: 10.1155/2010/274346.
- [83] Floss D M, Schallau K, Rose-John S, *et al.* Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application[J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(1): 37–45.
- [84] Conrad U, Plagmann I, Malchow S, *et al.* ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock[J]. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(1): 22–31.
- [85] Harmand T J, Pishesha N, Rehm F B H, *et al.* Asparaginyl ligase-catalyzed one-step cell surface modification of red blood cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(7): 1201–1207.
- [86] Huang N J, Pishesha N, Mukherjee J, *et al.* Genetically engineered red cells expressing single domain camelid antibodies confer long-term protection against botulinum neurotoxin[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 423[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583347/>. DOI: 10.1038/s41467-017-00448-0.
- [87] Sadeghi A, Behdani M, Muyldermans S, *et al.* Development of a mono-specific anti-VEGF bivalent nanobody with extended plasma half-life for treatment of pathologic neovascularization[J]. *Drug Test Anal*, 2020, 12(1): 92–100.
- [88] Ma L, Gai J, Qiao P, *et al.* A novel bispecific nanobody with PD-L1/TIGIT dual immune checkpoint blockade[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531(2): 144–151.
- [89] Detalle L, Stohr T, Palomo C, *et al.* Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(1): 6–13.
- [90] Koenig P A, Das H, Liu H, *et al.* Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape[J/OL]. *Science*, 2021, 371(6530)[2023-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7932109/>. DOI: 10.1126/science.

abe6230.

nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2[J]. *Science*, 2020,

[91] Xiang Y, Nambulli S, Xiao Z, et al. Versatile and multivalent

370(6523): 1479-1484.



【专家介绍】张冉: 医学博士、博士后, 湖南师范大学医学院教授、硕士研究生导师, 中国优生科学协会妇女儿童免疫学会副主任委员, 中国免疫学会免疫与健康科普委员会委员, 湖南省第二届教育督导评估专家, 湖南省微生物学会第九届理事会常务理事, 湖南省预防医学会微生物检验专业委员会委员, 湖南省免疫学会理事。主持和参与国家自然科学基金、湖南省自然科学基金等多项课题, 参与湖南省科学技术进步奖一等奖 1 项、二等奖 1 项, 参与国家发明专利 1 项; 以第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 8 篇, 其余论文 35 篇; 主编教材 1 本, 副主编教材与教参 14 本; 主持省级教改 1 项。



【专家介绍】罗龙龙: 免疫学博士, 军事医学研究院六所副研究员、硕士研究生导师, 中山大学“客座教授”, 北京市科技新星人才, 全军高层次科技创新人才工程(青年科技英才), 获聘全军免疫学会青年委员会委员秘书长, 中国免疫学会青年委员会委员。长期从事抗体工程和融合蛋白药物的研究。承担国家、军队以及省级课题 11 项, 以第一或者通讯作者在 *Cell Mol Immunol*、*J Med Chem*、*Engineering* 等国际期刊发表 SCI 论文 16 篇, 获发明专利 14 项(排名前 2), 作为任务负责人参与申报获批国家临床批件 1 项。

《药学进展》杂志 2024 年征订启事

《药学进展》杂志是国家教育部主管、中国药科大学和中国药学会共同主办的药学类科技期刊, 1959 年创刊, 2014 年全新改版, 国内外公开发行, 是专注于医药科技前沿与产业动态的专业信息媒体。本刊以科学前沿与国家战略需求为宗旨, 以综述、评述、行业发展报告为特色, 以药学学科进展、技术进展、新药研发各环节技术信息为重点, 主要报道药理学、研发技术链、医药产业链的国内外研究前沿与进展; 围绕新药研发产业链, 聚焦药学学科进展、全球研发前沿、科研思路方法、靶点机制探讨、新药研发报告、临床用药分析、技术政策动态; 希冀以期刊与论坛为平台, 整合行业资源, 发挥协同作用, 推动新药研发与产业发展。

《药学进展》编委会由国家重大专项化学药总师陈凯先院士担任主编, 编委由新药研发技术链政府监管部门、高校科研院所、制药企业、临床医院、CRO、金融资本及知识产权相关机构 200 余位极具影响力的专家组成。

《药学进展》设有“药咖论坛”“前沿与进展”“医药行业报告”“热点透视”“知识产权”“业界关注”“临床药学”等栏目。改版至今, 组稿策划了“肿瘤药理学研究进展”“聚焦心脑血管疾病药物”“糖尿病药物研发策略”“靶向纳米递药系统的创新药物制剂设计”“化学探针在药学领域中的应用”“聚焦抗体药物研发”“新型麻醉药和麻醉相关药的研发”“聚焦肿瘤心脏病学”“神经药理学研究与新药研发的新进展”等 100 余个专题, 刊载了数百篇报道行业领域进展且极具学术价值的综述类文章, 多位院士评述, 充分发挥了《药学进展》作为专业媒体引领学术发展、服务科技的作用。目前刊物已在药学学科进展、科研思路方法、靶点机制探讨、新药研发报告、临床用药分析、国际医药前沿等方面形成鲜明特色。

《药学进展》杂志为月刊, 每期 80 页, 铜版纸全彩印刷, 国内外公开发行, 每期定价 40 元, 全年定价 480 元。CN 32-1109/R, ISSN 1001-5094, 国内邮发代号: 28-112, 欢迎广大读者向本刊编辑部或当地邮局订阅。

编辑部地址: 南京市童家巷 24 号 中国药科大学《药学进展》编辑部; 邮编: 210009

电话/传真: 025-83271227; E-mail: yxjz@163.com