

G 蛋白偶联受体靶向性纳米抗体研究进展

李 菁, 范治然, 张胜蓝*

生物岛实验室 广东广州

【摘要】 纳米抗体是来源于骆驼科动物重链抗体的单域抗体, 具有体积小、结构稳定、易于工程化等特点。近年来, 纳米抗体在靶向 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 研究中展现出巨大潜力。本文综述了靶向 GPCR 的纳米抗体的筛选策略, 探讨其在结构生物学与药物开发中的应用, 并分析了当前的技术瓶颈与未来发展趋势, 为相关研究和临床转化提供参考。

【关键词】 G 蛋白偶联受体; GPCR; 纳米抗体

【收稿日期】 2025 年 7 月 13 日

【出刊日期】 2025 年 8 月 28 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20250384

Research progress on G protein coupled receptor targeted nanobodies

Jing Li, Zhiran Fan, Shenglan Zhang*

Bioland Laboratory, Guangzhou, Guangdong

【Abstract】 Nanoantibodies are single domain antibodies derived from heavy chain antibodies of camelids, characterized by small size, stable structure, and ease of engineering. In recent years, nanobodies have shown great potential in targeting G protein coupled receptors (GPCRs). This article reviews the screening strategies for nanobodies targeting GPCRs, explores their applications in structural biology and drug development, and analyzes current technological bottlenecks and future development trends, providing references for related research and clinical translation.

【Keywords】 G protein coupled receptor; GPCR; Nano antibody

抗体, 也称免疫球蛋白, 是由 B 细胞在适应性免疫应答过程中产生的 Y 形糖蛋白。由于其对靶抗原具有高度特异性和亲和力, 抗体已成为生命科学领域不可或缺的研究与诊断工具。尽管如此, 传统单克隆抗体仍存在一些局限性, 例如分子量较大、结构复杂、抗原识别能力有限, 以及依赖哺乳动物细胞系统表达, 导致其工程改造和大规模生产过程相对困难。纳米抗体 (Nanobody) 源自骆驼科动物的重链抗体, 仅由单一 VHH 结构域组成, 分子量约 15 kDa, 具备优异的热稳定性、水溶性及易于工程化改造的优势^[1]。G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是一大类位于细胞膜上的蛋白质, 共有八百多个成员, 在细胞信号转导中发挥关键作用, 参与多种生理过程, 因此已成为药物发现与开发的重要靶点。纳米抗体的极简结构赋予其多种优势, 如良好的水溶性、优异的热稳定性和化学稳定性、可在微生物系统中高效表达, 以及能够识别传统抗体难以结合的抗原表位。这些特性显著拓展了纳米抗体在生命科学研究

中的应用潜力, 特别是在以 GPCR 为靶点的基础科学研究与药物研发领域受到高度重视。纳米抗体凭借其独特结构特征, 为 GPCR 的研究与治疗提供了新工具与新策略^[2]。然而, 靶向 GPCR 的纳米抗体研究仍面临一定的局限。本文将就 GPCR 靶向性纳米抗体相关典型研究进展进行总结与凭借, 并展望其应用前景。

1 概述

纳米抗体大小仅为常规抗体的十分之一, 却具有完整的抗原识别与结合能力, 是目前已知最小的功能性抗原结合片段。GPCR 是存在与细胞膜表面的七次跨膜蛋白, 依据氨基酸序列与功能可分为多个家族。相比较于传统抗体, GPCR 靶向性纳米抗体能够结合抗原表面的空间表位, 可以识别和稳定处于构象变化, 作用于 GPCR 时可能产生类似激动剂、拮抗剂或变构调节剂的效果, 使得纳米抗体兼具抗体与药物双重特性。纳米抗体大小仅为常规抗体的十分之一, 因而组织穿透力强、能够穿过血脑屏障直接作用于脑部神经递质

*通讯作者: 张胜蓝

GPCR 发挥功能, 具备精神类疾病药物研发优势。与此同时, 将纳米抗体与荧光分子相偶联, 结合成像检测、荧光共振能量转移技术等, 可以实现对 GPCR 构象与激活状态的追踪, 为基础研究提供新的研究手段。此外, 纳米抗体易于在原核表达系统中进行规模化量产, 物料成本相对较低, 生成工艺和产品质量更容易进行质量监控和标准化, 且纳米抗体稳定性好、便于保存和运输, 具备产业转化优势。

与传统抗体相比, 纳米抗体因其独特的理化与生物学性质, 如高特异性、良好稳定性以及靶向递送的潜力, 在 GPCR 相关生物医学研究和疾病治疗等领域受到广泛关注。得益于其独特性质, 纳米抗体已成为研究 GPCR 的有力工具, 不仅可用于稳定 GPCR 的构象状态, 还提供了前所未有的关于其结构与动态变化的深入理解。利用纳米抗体调控 GPCR 活性具有多方面优势, 包括更强的组织穿透能力、更高的受体选择性、更长的体内半衰期、更低的免疫原性, 以及能够靶向 GPCR 中传统抗体或小分子难以作用的位点。

开发靶向 GPCR 的纳米抗体面临若干挑战。首先是表位可及性: GPCR 的表面常常被细胞膜部分遮蔽, 限制了可用于纳米抗体结合的表位的暴露程度, 识别并设计能够结合暴露区域, 或诱导构象变化以暴露正构或变构表位的纳米抗体, 是一项具有挑战性的任务。其次是结构复杂性: GPCR 通常呈现多种构象状态, 因此在纳米抗体筛选与优化过程中, 如何选择性地靶向与期望药理作用相关的特定构象, 是一个关键难点。再次是构象柔性: GPCR 在配体结合后会发​​生构象变化, 从而影响其与纳米抗体的相互作用。因此, 设计能够识别并稳定特定构象、同时避免与其他构象产生非特异性结合的纳米抗体, 是实现精准靶向的关键。

2 GPCR 靶向性纳米抗体制备方法

2.1 来源于动物免疫

纳米抗体被发现以来, 主要是依赖于羊驼等骆驼科动物经抗原免疫注射后产生。GPCR 是镶嵌于细胞膜磷脂双分子层的七次跨膜蛋白, 其暴露于磷脂双分子层外的亲水区域可做为纳米抗体的结合表位, 多数 GPCR 因其几乎没有独立的细胞外结构域、仅有细胞外柔性区域片段而极大地增加了纳米抗体研发难度。传统方法通过将重组 GPCR 蛋白或过表达细胞免疫羊驼, 结合噬菌体展示筛选获得靶向性纳米抗体。使用重组 $\beta 2AR$ 蛋白为抗原得到的纳米抗体 Nb80, 是首个对 GPCR 具备药理活性的纳米抗体, 后续进一步发展多个用于 GPCR 构象研究的工具^[3]。为解决 GPCR 难以

重组制备的问题, 过表达 GPCR 的工具细胞亦可以做为抗原, 已被成功用于 mGlu 受体靶向性纳米抗体制备, 进一步拓展至 mGlu 家族多个亚型^[4]。该类研究方法使用工具细胞替代重组蛋白, 显著提高了纳米抗体产生的成功率, 有助于获得识别 GPCR 天然表位的纳米抗体。相比于完整的细胞, 该方法能够极大地减少非特异性筛选产出、提高靶向性纳米抗体研发的成功率。

2.2 来源于人工合成文库

纳米抗体结构简单, 仅由一条肽链折叠形成的 VHH 结构域组成, 其上 3 个抗原互补决定簇 (CDR) 共同起效、识别抗原表位。其中, CDR3 是纳米抗体中变化最为多样性的区域, 平均长度为 15 个氨基酸残基, 极大地提升了对 GPCR 表面隐蔽抗原表位的识别能力。因此, 可构建人工合成文库用于纳米抗体筛选。人工文库技术构建高多样性的 VHH 变异体, 结合酵母或噬菌体展示, 可用于无需动物免疫的纳米抗体筛选。基于稳定的纳米抗体骨架可构建 CDR 区域高度变化的人工合成文库, 并基于酵母展示建立靶向 GPCR 的纳米抗体研发体系, 已成功研发靶向 $\beta 2AR$ 与 A2aR 的纳米抗体^[5]。基于人工合成的人源化纳米抗体文库, 亦可通过噬菌体展示筛选得到 GPCR 靶向性纳米抗体^[6]。结合核糖体展示, 从超大容量文库中亦获得了靶向 OX2R 的 Sb51^[7]。人工合成文库开展纳米抗体筛选与制备的方法弥补了低分子量 GPCR 缺少足够的胞外抗原表位、难以体外获得均一性的重组蛋白做为免疫原等阻碍纳米抗体研发的不足。

3 纳米抗体在 GPCR 结构生物学领域研究进展

纳米抗体的应用促进了 GPCR 的结构解析研究, 通过 X 射线晶体学及冷冻电镜等技术获得了高分辨率的结构数据, 极大地推动了对 GPCR 信号转导机制的理解。Kobilka 团队开创性地研发得到靶向 G 蛋白的纳米抗体 Nb35, 可识别并进一步稳定 G_{α} 与 G_{β} 亚基互作界面, 并据此解析得到了世界上首个完整的 GPCR 与 G 蛋白三聚体复合物高分辨率晶体结构, 首次直观地揭示了 $\beta 2AR$ 偶联 G 蛋白的激活机制^[3]。Nb35 此后被广泛用于重组 GPCR 与 G 蛋白复合物样品制备, 开启了高分辨率 GPCR 信号转到复合物结构生物学研究的新时代。此外, 特异性靶向 $\beta 2AR$ 细胞内柔性区域片段的纳米抗体 Nb80 则可模拟 G 蛋白并稳定受体激活状态, 也被广泛用于结构生物学相关研究^[2, 3]。近十年来, 随着单颗粒冷冻电镜技术的发展, 纳米抗体伴随着 GPCR 结构生物学研究迈入了新时代, 越来越多的靶向性纳米抗体支持解析高分辨率构象, 拓展了 GPCR

动态研究的边界。

4 纳米抗体在 GPCR 药物研发领域研究进展

抗体类药物是全球药物开发的热点方向,也是发展最快、市场效应最显著的生物药研发领域之一。现有的抗体类药物以抗体的特异性和疾病相关的靶点为理论基础,主要针对癌症和免疫相关疾病,分为单克隆抗体和抗体偶联药物两大类。纳米抗体由于分子量小和自身独特的结构特征,可以高亲和力地特异性靶向 GPCR 等常规抗体难以触及的抗原靶点,使得纳米抗体成为研究和调节 GPCR 活性最有吸引力的工具之一。已有研究报道多个靶向 AT1R 的纳米抗体,能够抑制 AT1R 的活性并稳定其非激活构象状态,具备拮抗剂或负向变构调节剂的药理学效应,小鼠体内实验研究表明这些纳米抗体拮抗 AT1R 信号转导与临床使用的拮抗剂药物效果相当,展现出对妊娠期高血压等疾病的治疗潜力^[8]。NB2 是能够负向变构调节视紫红质活性的纳米抗体,该纳米抗体能够阻碍视紫红质的激活并调节其光活化的能力,有望做为治疗视紫红质相关疾病的潜在药物^[9]。此外,越来越多 GPCR 靶向性纳米抗体的研究也展示了纳米抗体在成药性和选择性调控方面的独特优势。

由于体积小且结构灵活,纳米抗体能够进入 GPCR 的正构位点或变构位点,这些位点对大分子抗体或小分子药物可能是不可及的。这一特性使其特别适用于调节 GPCR 的功能和信号转导。通过靶向 GPCR 的变构位点,纳米抗体为精确调控受体信号传导开辟了新的可能性,为开发新一代药理学工具和治疗策略提供了契机。此外,工程化纳米抗体在细胞内递送方面也显示出良好前景,能够选择性地调控 GPCR 介导的信号通路,展现出新型药物递送模式的潜力。

5 展望

随着结构生物学与抗体工程技术的不断进步,纳米抗体在 GPCR 研究和药物开发中的应用潜力日益凸显。未来的研究可进一步结合冷冻电镜、分子动力学模拟等技术手段,解析 GPCR 动态构象变化过程中纳米抗体的稳定作用机制,从而实现了对信号转导过程的精准干预。此外,人工智能辅助的抗体设计、纳米抗体的

人源化改造及高通量筛选平台的发展,将进一步加速高亲和力、功能性纳米抗体的获得。在临床转化方面,纳米抗体有望与纳米颗粒、细胞递送系统等联合应用,开发组织靶向性更强、副作用更小的新型 GPCR 药物。尽管当前仍面临如构象特异性不足、体内稳定性评价不足等挑战,但随着多学科交叉融合和产业化路径的逐步明确,GPCR 靶向性纳米抗体有望在基础研究、精准治疗和分子诊断等领域发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] 于艳妮,周雁,邵丽莹, et al. 纳米抗体在体内外诊断和治疗中的优势和临床应用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2024, 16(05): 985-8.
- [2] 黄俊,梁士劫. 以 GPCR 为靶点的纳米抗体研究综述 [J]. 药物生物技术, 2020, 27(05): 467-71.
- [3] 王怡,赵雁杰,李帅. 纳米抗体在 G 蛋白偶联受体研究中的应用 [J]. 药学学报, 2022, 57(04): 990-1001.
- [4] 孟际勇. 基于纳米抗体的 TR-FRET 传感器检测内源性 mGlu 受体的表达和激活 [D], 2022.
- [5] 唐秀兰,邓安琦,陈文聪, et al. 纳米抗体筛选技术研究进展 [J]. 生物工程学报, 2024, 40(02): 350-66.
- [6] 刘传勇. 基于羊驼天然纳米抗体指导的合成纳米抗体文库的构建、鉴定及应用 [D], 2023.
- [7] 李婷婷,李典范. 纳米抗体研究现状与应用前景 [J]. 生命的化学, 2024, 44(09): 1779-90.
- [8] 付垚. 血管紧张素受体异源二聚体的表达与纯化 [D], 2023.
- [9] WU A, SALOM D, HONG J D, et al. Structural basis for the allosteric modulation of rhodopsin by nanobody binding to its extracellular domain [J]. Nature communications, 2023, 14(1): 5209.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS