

## · 综述 ·

# 纳米抗体结构特性及在传染病治疗方面研究进展

张欣<sup>1</sup>, 邓瑞新<sup>2</sup>, 刘建青<sup>1</sup>

1. 包头师范学院生态环境学院, 包头市 014030;

2. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津市 300392

通信作者: 刘建青, E-mail: [wylwohyou@163.com](mailto:wylwohyou@163.com)

**【摘要】**病原微生物可以引起各种各样的传染性疾病,近年来埃博拉出血热、新冠病毒感染、疟疾等传染病疫情的大规模暴发,促使人们寻求更加简洁有效的方法治疗烈性传染病。纳米抗体是在骆驼血清中重链抗体上发现的 VHH 结构域,其分子量低至 12~15 kDa,仅为传统抗体的 1/10,是目前能得到的可稳定与抗原结合的最小的功能单结构域抗体,因其分子质量小、组织穿透性强、特异性亲和力高、能识别缝隙表位、低免疫原性、水溶性高、稳定性强、生产简单、易于表达等优点,使得纳米抗体成为可满足研究、诊断和治疗各种要求的新型抗体。本文介绍了纳米抗体的结构及特性,概述了其在传染病治疗方面的应用进展,为未来发展研究提出参考借鉴。

**【关键词】** 纳米抗体;噬菌体展示技术;核糖体展示技术;传染病;治疗

## Research progress on the structural characteristics of nanobodies and their applications in the treatment of infectious diseases

ZHANG Xin<sup>1</sup>, DENG Ruixin<sup>2</sup>, LIU Jianqing<sup>1</sup> (1. School of Ecological Environment, Baotou Teachers' College, Baotou 014030, China; 2. School of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China)

Corresponding author: LIU Jianqing, E-mail: [wylwohyou@163.com](mailto:wylwohyou@163.com)

**【Abstract】** Pathogenic microorganisms can cause a variety of infectious diseases. In recent years, large-scale outbreaks of infectious diseases such as Ebola hemorrhagic fever, COVID-19 infection, and malaria have prompted people to seek more concise and effective methods to treat severe infectious diseases. Nanobodies are VHH domains discovered on heavy-chain antibodies found in camel serum. With a molecular weight as low as 12-15 kDa, they are only 1/10 the size of traditional antibodies and are the smallest functional single-domain antibodies that can stably bind to antigens. Due to their small molecular size, strong tissue penetration, high specific affinity, ability to recognize epitopes in crevices, low immunogenicity, high water solubility, strong stability, simple production, and ease of expression, nanobodies have become a new type of antibody that can meet various research, diagnostic, and therapeutic requirements. This article introduced the structure and characteristics of nanobodies, and outlines their application progress in the treatment of infectious diseases, providing a reference for future development and research.

**【Keywords】** nanobody; phage display technology; ribosome display technology; infectious diseases; treatment

微生物在生态系统中发挥着极其重要的作用,对人类最重要的影响之一就是会通过直接或者间接的方式使人类致病,从而造成全球卫生系统的负担。传染病的大规模暴发更是对现代科学发起了挑战。基于抗体的免疫治疗时代为传染病防治打开了一个全新窗口。抗体是由浆细胞分泌的且能与抗原进行特异性结合的免疫球蛋白,传统抗体由 2 条重链(H)和 2 条轻链(L)构成<sup>[1]</sup>。抗体分子向上的 2 个臂,构成了结合抗原的 Fab 区域;Fc 区域是抗体与效应分子或者细胞相互作用的部位<sup>[2]</sup>。通过保留抗体的可变区(VL 和 VH)可变为由 15~20 个氨基酸连接而成的单链抗体(single-chain variable fragment, scFv)<sup>[3]</sup>。传统抗体

虽已被广泛应用于各种疾病的诊断和治疗中,但由于其生产成本低、制作工艺复杂等问题,在实际应用中还是存在很多进步空间<sup>[4]</sup>。本文重点综述了纳米抗体的结构与功能特性及在传染病方面的国内外研究进展,以期为今后传染病治疗提供科学依据。

### 1 纳米抗体结构(图 1)

1993 年比利时免疫学家 Hamers-Casterman<sup>[5]</sup>及其团队成员在分离骆驼血清中发现一种不同于传统单克隆抗体的新型抗体,1995 年 Greenberg 等<sup>[6]</sup>也陆续在一些软骨鱼类,包括护士鲨、角鲨和犬鲨以及鳐鱼等中也发现了相类似的抗体(VNAR)。

开放获取: CC BY-NC-ND 4.0 DOI: [10.11847/zgggws1142847](https://doi.org/10.11847/zgggws1142847)

基金项目: 国家自然科学基金(32360190)

第一作者: 张欣(1998-), 硕士在读, 研究方向: 纳米抗体。

收稿日期: 2023-11-08 修回日期: 2023-11-23 录用日期: 2024-01-24 责任编辑: 吴少慧

利益冲突: 不存在 伦理审查: 不需要 出版授权: 全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议



这类新型抗体由重链 VHH、CH2 和 CH3 构成, 无轻链和 CH1 结构域, 被称为重链抗体 (heavy chain antibodies, HcAb), 分子量约 97 kDa (图 1d)。重链抗体的可变区 (VHH) 具有与 HcAb 相同的稳定结构和结合抗原的能力, 它的体积仅是传统单克隆抗

体的 1/10, 被称为纳米抗体 (nanobody, Nb)<sup>[7]</sup>, Nb 是所有天然抗体中发现的最小的可完整抗原结合多肽链 (图 1e)。纳米体作为理想抗体, 已经发展为一类可信的下一代抗体生物制剂制药和生物技术产业。

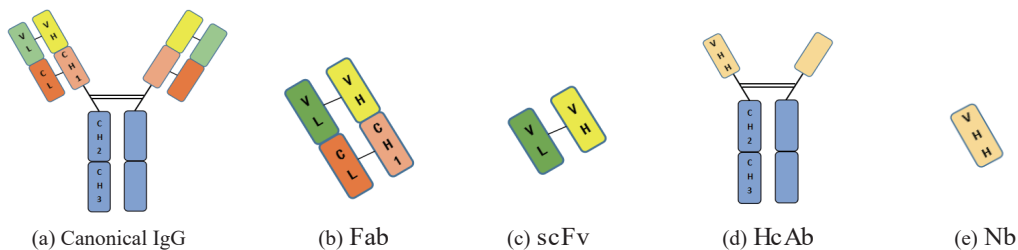


图 1 各类纳米抗体结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of various types of nanobody structures

## 2 纳米抗体特性

**2.1 分子质量小、免疫原性低** 纳米抗体体积较小, 由 120 个氨基酸残基构成, 分子量约为 12~15 kDa, 是传统抗体的 10%, 一般呈椭圆形, 尺寸约为  $4 \times 2.5 \times 3 \text{ nm}$ <sup>[8]</sup>。纳米抗体的尺寸缩小, 可导致生物活性的显著变化, 比传统抗体及其重组片段有许多优势。4 个恒定的框架区域 (framework region, FR) 和 3 个可变的互补决定区 (complementarity determining region, CDR) 构成了纳米抗体, FR 约占 85%, 作为 CDR 的支架, CDR 是决定抗原识别位点。与传统单克隆抗体一样, VHH 由一个 4 链  $\beta$  折叠和一个 5 链  $\beta$  折叠共 9 条  $\beta$  链组成<sup>[9]</sup>。大多数 VHH 结构域与人类 VH<sub>3</sub> 结构域具有高度同源性。通过将 Nb 人源化, 可明显降低其免疫原性, 减少临床副作用<sup>[10]</sup>。

**2.2 组织穿透力强、半衰期短** 细胞间的扩散速率与分子质量呈反比, 较小的分子质量使纳米抗体在细胞间的扩散速率更快, 提高了对靶组织的渗透能力, 从而具有穿过实体瘤和血脑屏障的能力<sup>[11]</sup>。然而, 纳米抗体的小尺寸有时也会给临床治疗带来困扰。例如, 纳米抗体的快速清除能力可能会影响其与患病部位所有表位的结合, 导致药效减弱。较强的肾脏清除能力也会降低其免疫治疗的疗效<sup>[12]</sup>。在许多临床治疗中, 需要较低的药物清除率, 以避免高剂量和高频次给药。纳米体的半衰期可以采用与传统抗体 Fc 段结合、添加聚乙二醇等稳定分子、结构修饰或者融合蛋白的策略来延长<sup>[13]</sup>, 提高治疗效果。

**2.3 特异性亲和力高、识别缝隙表位** 纳米抗体的 VHH 与传统抗体的 VH 的氨基酸序列相同, 但也有所区别。传统单克隆抗体的重链可变区 (VH) 有 6 个 CDRs, 而纳米抗体的重链可变区 (VHH) 仅

有 3 个 CDRs<sup>[14]</sup>。VHH 的 CDR3 的长度约为 18 个氨基酸, 而 VH 的 CDR3 仅有 12~14 个氨基酸, VHH 较长的 CDR1 和 CDR3 以及 CDR3 形成的凸型结构, 允许纳米抗体有效地进入组织, 并结合传统完整抗体通常无法到达的表位, 从而赋予 VHH 更高的特异性去识别抗原<sup>[15]</sup>。此外, 传统抗体只可以与抗原的平面和凹面结合, 而 VHHs 拥有一个额外的二硫键, 连接 CDR1 和 CDR3 的半胱氨酸, 形成了一种新的环, 有助于纳米抗体结合识别传统抗体所不能识别的缝隙表位<sup>[14]</sup>。

**2.4 水溶性高、稳定性强** 纳米抗体 FR2 区中 37、44、45 和 47 位的 4 种亲水氨基酸 (Phe37、Glu44、Arg45、Gly47) 分别替换了传统抗体的 4 种疏水氨基酸 (Val37、Gly44、Leu45、Trp47)。这些氨基酸的取代都有助于增强纳米抗体的溶解度和结构变异性<sup>[16]</sup>。纳米抗体结构稳定, 在 37 °C 保存一周仍具有生物活性, 高温情况下发生变性, 在适宜温度下仍可恢复活性, 可逆性强。在 CDR1 与 CDR3 之间这个特殊的二硫键在一定程度上也可以提高纳米抗体在高温、高压、强酸强碱以及变性剂等极端恶劣条件下保存的能力, 高稳定性使得纳米抗体在口服给药方面具有良好的应用前景<sup>[17]</sup>。

**2.5 生产简单、易于表达** 单克隆抗体结构复杂, 需经过加工修饰后才能具有生物学功能, 常在真核系统中表达。而纳米抗体结构简单、没有 Fc 段仍能保持良好的生物活性, 更易在细菌 (主要是大肠杆菌)、酵母、哺乳动物细胞乃至植物细胞中大量表达, 并可以进行大量生产<sup>[18]</sup>。纳米体技术有望成为下一代良好的临床生物药物。

## 3 纳米抗体展示技术

传统单克隆抗体是通过杂交瘤技术从啮齿类动物中提取出来的。最近 20 年, 已经开发和验证了

许多展示技术用于生产高亲和力、特异性和稳定的抗体。这些方法可分为两类：(1)体内展示(基于细胞的技术)，例如噬菌体展示技术<sup>[19]</sup>；(2)体外展示(无细胞技术)，例如核糖体展示技术<sup>[20]</sup>。

**3.1 噬菌体展示技术** 噬菌体展示技术(phage display technology)最早在 1985 年由 Smith<sup>[19]</sup> 提出，用于多肽的展示，后来，在 1990 年，第一个抗体片段在噬菌体上展示<sup>[21]</sup>。自此，该技术已被广泛用于展示多肽、蛋白质和抗体。噬菌体展示技术是将外源蛋白插入到噬菌体衣壳蛋白中，并在噬菌体表面显示。噬菌体表面的外源性 DNA 序列仍然保持着独立的空间结构和生物活性<sup>[22-23]</sup>。这一技术构建了蛋白质与基因之间直接的物理联系。

目前已开发的噬菌体展示系统包括丝状噬菌体、T7 噬菌体、T4 噬菌体、 $\lambda$  噬菌体等，其中单链丝状噬菌体展示系统(PIII 和 PVIII)比较常见<sup>[24]</sup>。早在 2005 年 SARS 广泛流行时，Flego 等<sup>[25]</sup> 对冠状病毒等主要传染病的研究中，应用单链抗体噬菌体库分离出了可与 SARS 冠状病毒的特异性结合的抗体片段。与传统杂交瘤技术相比，噬菌体展示技术最明显的优势是可以快速、有效的筛选出所需的特异性纳米抗体，降低了动物免疫所需的成本，可满足纳米抗体大量生产。扩大噬菌体展示文库的多样性以及提高所获抗体片段的稳定性，将成为未来研究的重点。

**3.2 核糖体展示技术** 核糖体显示技术(ribosome display technology, RDT)是一种有效的体外无细胞系统，通过在体外生产蛋白质-mRNA 复合物，克服了噬菌体显示和其他基于细胞的方法的众多局限性。核糖体展示技术最早于 1994 年由 Mattekis<sup>[20]</sup> 筛选多肽时提出，后来 Hanes 和 Jermutus<sup>[26-27]</sup> 以及 He<sup>[28]</sup> 对该技术进行改进，用于单链抗体的早期筛选。

核糖体展示技术包括：(1)构建核糖体展示文库；(2)体外转录与翻译；(3)进行目标蛋白的筛选<sup>[29]</sup>。与上述提到的噬菌体展示技术等体内展示相比，核糖体展示技术具有以下优点。首先，该方法在不影响抗体库容的情况下，通过转换效率，选择高亲和力结合位点和真核细胞无细胞系统，能够进行体外翻译和加工修饰，且该技术抗体库容可达到  $10^5$  拷贝。其次，由于不涉及细胞培养，核糖体展示更为快速、高效，且同样不需要动物免疫这一繁琐的步骤。最后，核糖体展示技术可广泛用于疾病的检测，Ahangarzadeh 等人<sup>[30]</sup> 利用核糖体展示技术生成了针对结核分枝杆菌早期分泌抗原靶点(ESAT-6)抗原的 scFvs。这表明核糖体展示技术可以进一步应用于生产 scFvs 或者 Nbs，用于诊断和治疗其他迄今为止仍缺乏适

当诊断或控制的传染性人类疾病。

## 4 纳米抗体在传染病治疗方面的应用

**4.1 针对病毒感染的治疗** 病毒缺乏完整的细胞结构，无法独立生活，病毒会感染宿主以维持生存。病毒的生命周期包括 3 个过程：吸附宿主将核酸注入、在宿主体内增殖、释放新的子代病毒<sup>[31]</sup>。由于其极具攻击性的行为，病毒具有高度的传染性，会导致多种疾病，如 COVID-19、艾滋病、肝炎等。传统的治疗策略通过抑制病毒生命周期的不同部分来消除病毒。传统药物在一定程度上可以有效消除病毒，但仍有一些局限性，如副作用、缺乏靶向性、治疗时间长<sup>[32]</sup>。纳米抗体的优越特性可以克服传统药物治疗的许多不足，其独特的抗病毒机制为开发一种新型、高效的抗病毒药物提供了良好的机会。

**4.1.1 SARS-CoV-2** 2020 年新冠病毒感染(corona virus disease 2019, COVID-19)疫情的暴发严重威胁到人类健康，数亿人感染严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)，根据基因组序列检测，SARS-CoV-2 与 SARS-CoV-1 的相似性为 79.5%<sup>[33]</sup>。SARS-CoV-2 是一种单链 RNA 病毒，刺突(S)蛋白通过其受体结合域(receptor binding domain, RBD)与人类宿主细胞中的受体结合，该受体是血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme-2, ACE2)，随后，S 蛋白被跨膜丝氨酸蛋白酶 2 裂解，促进病毒进入宿主细胞，比 SARS-CoV-1 具有更高的亲和力(10 倍甚至 20 倍)<sup>[34]</sup>。目前的治疗策略，主要聚焦于避免 S 蛋白与 ACE2 结合。Wrapp 等<sup>[35]</sup> 筛选出了能特异性与 S 蛋白结合的纳米抗体，该纳米抗体可与 RBD 结合并抑制病毒增殖。Dong 等<sup>[34]</sup> 构建的双特异性纳米抗体也阻断了 S 蛋白与 ACE2 的结合，同时构建人源化纳米抗体降低了免疫原性。病毒的摄取取决于 ACE2 在不同组织中的表达。由于肺部含有丰富的 ACE2，便成为 SARS-CoV-2 最脆弱的靶点<sup>[36]</sup>。纳米抗体较小的分子质量使其拥有传统抗体疗法通常无法获得的组织的动态穿透能力，可以快速、准确的到达肺组织，提高药效。以上这些表明，纳米时代的到来将大大加快安全高效的抗 COVID-19 药物的合成。

**4.1.2 HIV** 人类免疫缺陷病毒(HIV)主要攻击人体 T 细胞并破坏免疫系统，产生免疫抑制，最终导致艾滋病。CD4<sup>+</sup>T 细胞计数用于评估 HIV 感染后的免疫力，而 HIV 感染者的 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数大幅减少，导致严重的免疫缺陷。标准的治疗方法是由  $\geq 3$  种的抗逆转录病毒药物组合治疗，这也被



称为抗逆转录病毒治疗(ART)。这些药物的机制是攻击在 HIV 的生命周期中发挥关键作用的特定酶,抑制病毒的复制<sup>[37]</sup>。然而,由于艾滋病毒感染后需要终身治疗,无法避免药物副作用和药物相关的慢性毒性,严重影响患者的生活质量。而纳米抗体在抗 HIV 病毒方面具有巨大潜力。Robin A 等<sup>[38]</sup>研究证明二价和三价纳米体可以识别包膜糖蛋白上的 gp120 和 gp41 表位,大大提高了 HIV-1 的中和能力。此外, CXCR4 是 HIV 进入宿主细胞的主要共受体,但药物副作用和较差的药代动力学特性一直是阻碍 CXCR4 定向抑制剂在治疗方案中实施的主要障碍。Anneleen 等<sup>[39]</sup>在研究中表明 CXCR4 靶向纳米体(尤其是 VUN402)能够识别并抑制 HIV 病毒的增殖,同时最低限度地干扰其他 CXCR4 相关功能。HIV 表达调节因子 Rev 蛋白介导部分和未剪接的 mRNA 从细胞核到细胞质的运输。

**4.1.3 HBV 和 HCV** 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是两种常见的肝炎病毒。HBV 是一种嗜肝 DNA 病毒,仅以肝细胞为唯一靶细胞。目前对 HBV 的标准治疗方法包括聚乙二醇化干扰素、核苷酸或核苷酸类似物。然而,使用聚乙二醇干扰素的治疗疗程受副作用影响而有限<sup>[40]</sup>,使用核苷酸或核苷酸类似物需终身治疗,易出现病毒的耐药突变<sup>[41]</sup>。利用纳米抗体的优势来开发调节细胞 HBsAg 和 HBeAg 表达量的抗病毒药物是提高治疗效果、避免慢性乙肝进展的有价值治疗手段<sup>[42]</sup>。HCV 是一种 40~60 nm 大小的 RNA 包膜病毒,HCV 治疗主要依赖于聚乙二醇干扰素和利巴韦林去限制病毒复制,而复制过程中产生的大量耐药突变严重抑制了标准抗 HCV 药物的治疗效果<sup>[43]</sup>。纳米抗体 D03 通过干扰 E2-CD81 的相互作用,中和了一组来自 6 种基因型的 HCV 糖蛋白亚型的逆转录病毒颗粒,D03 有效地抑制了 HCV 在细胞间的传递<sup>[44]</sup>。

**4.2 针对细菌和细菌毒素的治疗** 细菌感染通常需要高剂量抗生素治疗,导致耐药细菌的产生和药物毒性。志贺菌属的细菌,通称痢疾杆菌,是人类细菌性痢疾的病原菌,主要通过食物传播。Barta 等<sup>[45]</sup>创建了一组可以靶向识别志贺菌尖端复合物上 IpaD 中不同的表位的纳米抗体,其异源二聚体可以将志贺菌溶血活性降低 80%。李斯特菌病是一种潜在的致命食源性疾病,对孕妇危害更大。李斯特菌侵袭胎盘的关键步骤是内部蛋白 B(InlB)和受体 c-Met 之间的相互作用,纳米抗体 R303、R330 和 R326 均以高亲和力结合在 InlB 上和 c-Met 相互作用的位点,从而作为抑制

细菌入侵的竞争性抑制剂<sup>[46]</sup>。

**4.3 针对寄生虫感染的治疗** 人非洲锥虫病(human African trypanosomiasis, HAT)也称昏睡病,是由布氏锥虫引起的人畜共患疾病,可通过蚊子叮咬而传播给人类。高度药物毒性和普遍的耐药性阻碍了非洲人锥虫病的治疗,开发新的高度特异性的靶向药物十分必要。研究表明,使用大剂量的高亲和力 Nbs 抗锥虫变异表面糖蛋白(VSG)可诱导锥虫杀灭作用<sup>[47]</sup>。研究者也曾多次尝试将 VSG 特异性 Nbs 与载体结合,并装载杀锥虫药物喷他脒,通过内吞作用靶向给药,这种方法能够将所需的治疗剂量降低数倍<sup>[48]</sup>。

## 5 结 论

从骆驼血清中分离出的纳米抗体是目前可与抗原结合的最小功能单位。纳米抗体具有诸多优良特性,如在极端温度和各种 pH 环境下保持稳定,高稳定性使其在生物学、医学和临床应用中成为高度通用分子。由于纳米抗体只有重链,相对于单克隆抗体,纳米抗体生产成本低,效率高。纳米抗体分子量小,组织穿透力强,可以深入到患处。因此,纳米抗体在传染病治疗方面具有重要的应用价值和广阔的发展前景。未来纳米抗体可以在各类疾病治疗方面取得更多进展。

## 参考文献

- [1] 何晓婷,董洁娟,沈兴,等. 纳米抗体的稳定性及其结构基础研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49(6): 1004-1017.
- [2] 孙白荷,吴悦,赵蔚,等. 不同表达系统的治疗性纳米抗体研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(11): 43-55.
- [3] 上海药物研究所. 上海药物所发现 33 肽标签提高大肠杆菌表达单链抗体溶解度和稳定性[J]. 高科技与产业化, 2022, 28(8): 47.
- [4] 赵欣悦,杨晓梅,孙树阳,等. 纳米抗体的特性及其在免疫检测中的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(4): 472-478.
- [5] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [6] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks[J]. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173.
- [7] 严昊,冯建远,张子仪,等. 纳米抗体的制备与临床应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(2): 685-694.
- [8] Tang HP, Gao Y, Han JY. Application progress of the single domain antibody in medicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4176.
- [9] Zhong WX, Lu YM, Ma Z, et al. Development of a humanized VHH based recombinant antibody targeting claudin 18.2 positive cancers[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 885424.
- [10] 蔡冲,闫洪林,唐晓倩,等. 纳米抗体特性及其在农产品真菌毒素检测中的应用[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(2): 451-459.
- [11] Ciccacese S, Burger PA, Ciani E, et al. The camel adaptive immune receptors repertoire as a singular example of structural and functional genomics[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019(10): 997.
- [12] Ren J, Zhang C, Ji FL, et al. Characterization and comparison of

- two peptide-tag specific nanobodies for immunoaffinity chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020(1624): 461227.
- [ 13 ] Li L, Zhu Y, Liu MM, et al. Conjugation of oxaliplatin with PEGylated-nanobody for enhancing tumor targeting and prolonging circulation[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021(223): 111553.
- [ 14 ] 金萍, 丁洪流, 金晓红, 等. 纳米抗体在食品小分子污染物检测中的研究应用 [J]. *食品与机械*, 2023, 39(2): 236 – 240.
- [ 15 ] Löw C, Yau YH, Pardon E, et al. Nanobody mediated crystallization of an archeal mechanosensitive channel[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77984.
- [ 16 ] Ahmed AM, Brooks CL. X-ray crystal structure analysis of VHH-protein antigen complexes[M]//Hussack G, Henry KA. *Single-Domain Antibodies: Methods and Protocols*. New York: Humana, 2022: 513 – 530.
- [ 17 ] Wang J, Mukhtar H, Ma L, et al. VHH antibodies: reagents for mycotoxin detection in food products[J]. *Sensors*, 2018, 18(2): 485.
- [ 18 ] Wang YY, Li XW, Chen X, et al. Expression of antibody fragments in *Saccharomyces cerevisiae* strains evolved for enhanced protein secretion[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 134.
- [ 19 ] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315 – 1317.
- [ 20 ] Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(19): 9022 – 9026.
- [ 21 ] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. *Nature*, 1990, 348(6301): 552 – 554.
- [ 22 ] Lotfi Z, Golchin M, Khalili-Yazdi A, et al. Immunological properties of the SLLTVEV epitope of influenza A virus in multiple display on filamentous M13 phage[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2019(65): 76 – 80.
- [ 23 ] Zhang YX, Song Y, Ren HJ, et al. Preparation of a single-chain antibody against nucleocapsid protein of porcine deltacoronavirus by phage display technology[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 772.
- [ 24 ] Hess KL, Jewell CM. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development[J]. *Bioengineering and Translational Medicine*, 2020, 5(1): e10142.
- [ 25 ] Flego M, Di Bonito P, Ascione A, et al. Generation of human antibody fragments recognizing distinct epitopes of the nucleocapsid (N) SARS-CoV protein using a phage display approach[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2005(5): 73.
- [ 26 ] Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S, et al. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(24): 14130 – 14135.
- [ 27 ] Schaffitzel C, Hanes J, Jermutus L, et al. Ribosome display: an *in vitro* method for selection and evolution of antibodies from libraries[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1999, 231(1/2): 119 – 135.
- [ 28 ] He MY, Menges M, Groves MAT, et al. Selection of a human anti-progesterone antibody fragment from a transgenic mouse library by ARM ribosome display[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1999, 231(1/2): 105 – 117.
- [ 29 ] Li RW, Kang GB, Hu M, et al. Ribosome display: a potent display technology used for selecting and evolving specific binders with desired properties[J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(1): 60 – 71.
- [ 30 ] Ahangarzadeh S, Bandehpour M, Kazemi B. Selection of single-chain variable fragments specific for *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen using ribosome display[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017, 20(3): 327 – 333.
- [ 31 ] Zhou JR, Krishnan N, Jiang Y, et al. Nanotechnology for virus treatment[J]. *Nano Today*, 2021(36): 101031.
- [ 32 ] Tamori A, Enomoto M, Kawada N. Recent advances in antiviral therapy for chronic hepatitis C[J]. *Mediators of Inflammation*, 2016(2016): 6841628.
- [ 33 ] Campos EVR, Pereira AES, de Oliveira JL, et al. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 125.
- [ 34 ] Dong JB, Huang B, Jia ZJ, et al. Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2020, 9(1): 1034 – 1036.
- [ 35 ] Wrapp D, De Vlioger D, Corbett KS, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies[J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1004 – 1015. e15.
- [ 36 ] Weiss C, Carriere M, Fusco L, et al. Toward nanotechnology-enabled approaches against the COVID-19 pandemic[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(6): 6383 – 6406.
- [ 37 ] Khan T, Mayuresh Patkar M, Momin M, et al. Macrophage targeted nanocarrier delivery systems in HIV therapeutics[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2020, 17(7): 903 – 918.
- [ 38 ] Weiss RA, Verrips CT. Nanobodies that neutralize HIV[J]. *Vaccines*, 2019, 7(3): 77.
- [ 39 ] Van Hout A, Klarenbeek A, Bobkov V, et al. CXCR4-targeting nanobodies differentially inhibit CXCR4 function and HIV entry [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2018(158): 402 – 412.
- [ 40 ] 张星鑫, 郭津生. 慢性乙型肝炎的现有认识及治疗进展 [J]. *肝脏*, 2021, 26(3): 327 – 330.
- [ 41 ] 邓芮, 孙剑. 《2019 年欧洲肝病学会与美国肝病学会联合指导意见: 慢性乙型肝炎临床试验设计和治疗终点》摘译 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(3): 522 – 526.
- [ 42 ] 王婵, 钟波, 吕正兵, 等. 条纹斑竹鲨的抗乙肝表面抗原的单域抗体筛选与重组抗体活性探究 [J]. *浙江理工大学学报 (自然科学版)*, 2022, 47(1): 115 – 122.
- [ 43 ] 肖琴美. 派罗欣联合利巴韦林治疗慢性丙肝的临床价值分析 [J]. *中国实用医药*, 2022, 17(17): 115 – 117.
- [ 44 ] Tarr AW, Lafaye P, Meredith L, et al. An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission[J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 932 – 939.
- [ 45 ] Barta ML, Shearer JP, Arizmendi O, et al. Single-domain antibodies pinpoint potential targets within *Shigella* invasion plasmid antigen D of the needle tip complex for inhibition of type III secretion[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(40): 16677 – 16687.
- [ 46 ] King MT, Huh I, Shenai A, et al. Structural basis of V<sub>H</sub>H-mediated neutralization of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(35): 13626 – 13635.
- [ 47 ] Hempelmann A, Hartleb L, van Straaten M, et al. Nanobody-mediated macromolecular crowding induces membrane fission and remodeling in the African trypanosome[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(5): 109923.
- [ 48 ] Arias JL, Unciti-Broceta JD, Maceira J, et al. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis [J]. *Journal of Controlled Release*, 2015(197): 190 – 198.