

单链抗体的新研究进展及其在医学中的应用

焦子琛, 王子豪, 匡宇竹, 张林波, 张文慧, 付璐
(吉林农业大学 生命科学学院, 长春 130118)

摘要: 利用基因工程技术改造抗体能使人们成功获得各种新型的小分子抗体。其中, 单链抗体具有高特异性、高亲和力、高组织渗透性、稳定性优异、低免疫原性、易制备及可大规模生产等优点。单链抗体目前已被广泛应用于药物开发、疾病治疗等领域。该文综述了单链抗体的新研究进展及其在医学中的应用。

关键词: 单链抗体; 表达系统; 基因工程抗体

中图分类号: R392.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2024)06-0530-06

作为基因工程抗体, 单链抗体最早是在骆驼科动物的血清中发现的。1988 年, Bird 和 Huston 成功在体外制备了第一个单链抗体^[1]。目前, 单链抗体多以多聚体形式、多价形式作为一种新型的重组蛋白类药物被广泛研究。

1 单链抗体简介

1.1 单链抗体的结构与分类 单链抗体, 即单链抗体可变区片段 (single-chain antibody fragment variable, scFv), 由抗体重链可变区 (variable heavy chain, VH) 和轻链可变区 (variable light chain, VL) 通过连接肽 (Linker) 连接而成^[2]。单链抗体的相对分子质量约 25 000, 具有单个抗原结合位点。单链抗体一般可分为单价单链抗体、单链抗体多聚体以及双特异性单链抗体^[3-4]。

scFv 与其全抗体一样, 对抗原保持特异性和亲和力, 由于其相对分子质量较小, 它们显示出了卓越的穿透组织的能力和组织内扩散力, 其速度约是全抗体的 6 倍; 但它们的抗原亲和力与母体抗体相比往往较低, 并且显示出较低的稳定性。

1.2 单链抗体的表达 scFv 的 VH 和 VL 结构域通过多肽序列连接在一起, 可以作为单一的蛋白进行表达, 简单易行。功能性单链抗体的表达依赖于有效的转录、翻译和正确的折叠和重折叠。因此, 单链抗体表达系统的选择尤为重要^[5]。目前临床上 scFv 表

达体系多为大肠杆菌、哺乳动物细胞和酵母细胞等, 不同的单链抗体表达体系简介与对比见表 1。

1.2.1 大肠杆菌表达系统 大肠杆菌被认为是大规模生产重组蛋白的快速且经济的表达系统^[6]。大肠杆菌体系具有背景清晰, 增殖迅速, 营养需求简单、经济, 蛋白表达水平高及转化过程快速简便等优点, 是目前生物技术药物最为常用的表达系统^[7], 如抗人表皮生长因子受体 2 的单链抗体 Pertuzumab-scFv (帕妥珠单抗), 其本身具有一定细胞毒性, 如以可溶性形式表达, 会极大影响蛋白产量, 因此, 利用大肠杆菌以包涵体形式表达, 可以有效防止蛋白对细胞产生的损伤, 提高蛋白产量, 还能有效防止目的蛋白被细胞内蛋白酶降解。因此, 将大肠杆菌作为表达系统, 以包涵体的形式表达, 能够极大地提高蛋白表达量, 并且减少产物的降解^[8]。此外, Mahgoub 等^[9]在大肠杆菌周质空间内对能够识别 MCF-7 乳腺癌细胞系的 scFv 进行表达, 所获得产物杂蛋白含量极低, 十分有利于产物的分离与纯化。尽管大肠杆菌表达系统有着无可替代的优势, 但其应用仍存在一些局限性, 如缺乏翻译后修饰功能、包涵体的形成、密码子偏置、产生代谢负担 (醋酸酯积累) 和蛋白质产物降解等^[10]。其中, 克服包涵体的形成主要有以下几种方法: 借助信号肽进行胞外表达、在低温/低诱导物浓度下表达蛋白、与可溶性增强标签融合及与分子伴侣共表达。2021 年, Nghia 等^[11]使用大肠杆菌生产高溶解度的 scFv, 通过改变溶氧量以及补料分批培养条件有效地抑制了包涵体的形成。2022 年, Behravan 等^[12]在亲本菌株大肠杆菌 BW25113 (DE3) 中过表达编码葡萄糖激酶的 GLK 基因, 恢复了重组大肠杆菌菌株的生长能力, 提高了 scFv 的产量。

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 吉林省科学技术厅-吉林省自然科学基金 (20220101328JC、20220101326JC)

作者简介: 焦子琛 (1999-), 女, 硕士生, 从事阿尔茨海默症免疫治疗相关研究

通信作者: 付璐 (E-mail: f337615056@126.com)

表 1 scFv 表达系统简介

表达体系	表达方式	优点	缺点	适用范围
大肠杆菌	细胞质内的包涵体	产量高	需变性复性, 复性过程中产物有损失	对大肠杆菌有毒性或者有蛋白水解酶不稳定性的 scFv
	细胞质内的可溶性表达	具有抗原结合活性, 无需变性复性	产量不高, 人工操作过程长, 不易优化	小规模生产的 scFv
	分泌到大肠杆菌周质空间	杂蛋白较少, 易纯化	分泌作用较难控制	通过 <i>E. coli</i> 的外膜蛋白等信号肽使 scFv 分泌到周质空间
	分泌到细胞外培养基	减少产物的降解, 蛋白质得到快速检测和纯化	产量不高, 影响因素较多	部分情况下可通过该机制获取分泌到细胞外的 scFv
哺乳动物	细胞内外分泌表达	指导蛋白质的正确折叠	工艺繁琐, 影响因素较多	表达糖基化蛋白的 scFv
酵母	细胞内外分泌表达	成本低, 效益高	分泌效率低, 不适用于高密度培养	有需要的临床研究和工业化生产
植物系统	细胞内外分泌表达	蛋白质折叠正确, 减少内毒素的污染	生产周期长, 影响(调控)因素不可控	糖蛋白的亚细胞定位, 抑制植物糖基转运等

1.2.2 哺乳动物细胞表达系统 哺乳动物细胞表达系统的优势包括蛋白质的正确折叠、恰当的翻译后修饰和重组蛋白质在正确位点上的糖基化, 这些对于 scFv 的活性与稳定性非常重要。近几十年来, 中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞已成为生产重组治疗性蛋白的主要标准表达平台^[13], 例如安徽智飞龙科马生物制药有限公司生产的新冠疫苗和人源化抗 PD-1 单克隆抗体卡瑞利珠等均由 CHO 细胞表达平台生产。在 scFv 的表达方面, 叶迎春等^[14]成功利用 CHO-K1 细胞表达了抗人 IL-33 单链抗体, 并且具有较高的表达水平。Krebs 等^[15]将靶向 CD7 的 scFv 与免疫毒素融合, 并利用 CHO 细胞对该重组免疫毒素进行表达, 避免了大肠杆菌包涵体表达的繁琐分离纯化步骤, 简化了重组免疫毒素的开发过程。然而, 哺乳动物细胞表达系统依然存在缺点, 如细胞生长速度慢、产品产量低、病毒污染风险高以及生产成本高等, 因此对于该表达系统的优化与探索仍在继续。

1.2.3 酵母表达系统 酵母表达系统兼具原核表达系统与真核表达系统的优点, 产量高的同时, 还能够确保目的蛋白的正确折叠和翻译后修饰。该表达系统特别适用于抗体片段的产生, 避免了哺乳动物细胞表达系统的高成本问题^[16]。此外, 其表达产物不含有毒性热原质以及潜在的致癌性因素和核酸污染^[17-18]。因此, 合理优化发酵条件, 能够极大提高单链抗体的产量和质量。目前, 最常用的酵母表达系统是毕赤酵母和啤酒酵母^[19]。Montoliu-Gaya 等^[20]利用毕赤酵母对具有糖基化修饰的阿尔兹海默病治疗型单链抗体 scFv-h3D6 开展表达, 确保了

抗体的正确折叠, 避免了内毒素的污染。Zahr 等^[21]研究发现, 毕赤酵母特别适合用于重组蛋白的表达, 通过加入分子伴侣, 能使重组蛋白的分泌量增加 4 倍。而啤酒酵母相对于毕赤酵母, 由于内质网的错误折叠和加工外源蛋白的能力较弱等因素, 限制了其在外源性蛋白表达中的应用。

1.2.4 植物表达系统 植物表达系统具有不携带动物病毒、内毒素污染少、成本低、易于大规模生产、产量易控和能正确进行蛋白质翻译后修饰等优点, 成为新兴的生物药物表达系统。目前, 已经有 50 多种单链抗体能够通过植物表达系统获得, 利用转基因植物大规模生产与开发抗体药物, 有着极其可观的前景^[22-23]。Kopertekh 等^[24]研究发现, 本氏烟草毛根非常适用于 scFv 的表达, 其产量是全抗体的 2 倍。Lonoce 等^[25]利用本氏烟草毛根培养物, 成功获得基于利妥昔单抗的 scFv, 研究发现, 添加植物生长调节剂后, 抗体在培养皿中的分泌量增加了约 28 倍。2022 年, Marín Viegas 等^[26]将 scFv 与短链疏水类弹性蛋白(elastin-like polypeptide, ELP)标签融合, 在本氏烟草中成功获得融合蛋白。这项研究首次展示了植物表达系统在生产低产量蛋白方面的优势与实用性。然而, 植物表达系统仍存在缺陷, 限制了其在大规模生产中的应用, 如生产周期长、影响(调控)因素不稳定等。

1.2.5 昆虫表达系统 昆虫细胞表达系统是常用的外源蛋白表达系统之一, 与原核表达系统相比, 它能够进行更复杂的翻译后修饰; 表达哺乳动物来源的蛋白质时, 更易获得可溶性蛋白^[27]。昆虫细胞表达系统常用的有果蝇表达系统和昆虫-杆状病毒

表达载体系统。其中,昆虫-杆状病毒表达系统能够承载较大的外源基因,得到的重组病毒易于筛选,具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力^[28],与果蝇表达系统相比,其生产周期更短、便利性更强^[29]。2021年,Ebihara等^[30]成功利用家蚕-杆状病毒表达系统生产了针对 SARS-CoV-2 的 CR3022 抗体的 scFv。该系统表达的 scFv 与哺乳动物表达系统产生的 scFv 具有几乎相同的抗原亲和力。这提示我们,家蚕-杆状病毒表达系统可能是表达急需诊断、治疗试剂的新发传染病相关蛋白的优良表达系统^[30]。

2 单链抗体在医学中的应用

2.1 单链抗体在神经系统疾病中的应用 蛋白质的错误折叠会导致一些神经系统疾病的发生,如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)和亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等,利用抗体清除异常折叠蛋白质聚集体是目前神经系统疾病免疫治疗的主要策略,但血脑屏障的存在限制了全抗体药物的应用。scFv 相对分子质量较小,相比于全抗体,能更好地透过血脑屏障,更易接近致病蛋白质,在神经系统疾病的治疗中有着重要的作用。此外,scFv 还可以与脂质体一起构建转运系统,通过受体介导的胞吞转运作用透过血脑屏障,将药物递送至病灶部位^[31]。

AD 是一种最为常见的神经系统退行性疾病, β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)与高度磷酸化的微管结合蛋白 Tau 蛋白(phosphorylated tau, p-Tau)是其主要的致病物质。scFv 分子量较小,能够更好地靠近、更高效地封闭脑中致病物质。此外,scFv 不含有抗体 Fc 片段,降低了引起脑部炎症反应的可能。因此,scFv 在 AD 的治疗方面有着独特的优势。2019年,何平等^[32]设计了一种新型单链抗体(Diab),其能够阻止 A β 的产生,同时促进 A β 的降解;其在体内试验结果表明,Diab 的治疗能够提高模型小鼠的存活率,是具有潜力的 AD 治疗候选药物。2022年,Zhang等^[33]设计了一种新型的 AD 免疫疗法,研究人员利用腺相关病毒在小鼠脑中表达靶向 p-Tau 的 scFv,为 scFv 在 AD 治疗中的应用提供了新思路。

PD 在中老年人群中十分常见^[34]。研究表明, α 突触核蛋白是导致大脑中多巴胺能神经元进行性丢失的主要致病物质^[35]。Spencer等^[36]通过融合抗寡

聚体 α 突触核蛋白的 scFv 与载脂蛋白 B 的低密度脂蛋白受体结合域融合,制备了一种新型单链抗体,实验结果显示,其增强了单链抗体的血脑屏障穿透能力,并减少了致病性 α 突触核蛋白在神经元的积聚。2022年,Fassler等^[37]设计了一种同时靶向 α 突触核蛋白低聚物和预成型原纤维的单链抗体 scFvs-MB08,该抗体脑渗透效率高,能避免非特异性炎症反应,能有效保护神经元,加速错误折叠的 α 突触核蛋白的降解。

2.2 单链抗体在肿瘤疾病中的应用 近年来,scFv 作为癌症诊断、治疗和基础研究的关键工具被研究者广泛应用,并在多种癌症如食管癌、卵巢癌、乳腺癌、咽癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、直肠癌以及前列腺癌等领域取得了长足的发展^[38]。

在癌症治疗方面,2002年,第一株用于肿瘤免疫治疗的 scFv(替伊莫单抗,Zevalin)在美国成功制备并应用于临床恶性肿瘤的导向治疗^[39]。2021年,de Aguiar等^[40]制备了一种抗成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)的 scFv,具有很好的靶向免疫作用,其制剂可特异性识别 FGF2 并有效抑制肿瘤生长。2022年,石英贤等^[41]制备了抗 p21Ras 的单链抗体 Y238-scFv 和 Y259-scFv;2种单链抗体都能够与肿瘤细胞中的 p21Ras 蛋白相结合,不仅可用于评价良、恶性病变组织中 p21Ras 表达的差异,还为研究 Ras 基因在细胞生长调控和肿瘤转化中的作用提供了重要工具。单链抗体还能够与化学药物偶联,用于靶向药物的制备。2021年,Smith等^[42]将一种靶向癌胚抗原 5T4 的单链抗体与药物溴瑞他汀 F 相偶联,获得了抗体偶联药物 ASN004;ASN004 对 5T4 抗原展现出高亲和力,可选择性地结合并内化到表达 5T4 的肿瘤细胞中,其对多种实体瘤细胞系显示出强大的细胞毒性,有潜力被应用于肺癌、乳腺癌和宫颈癌等的治疗。

在癌症诊断方面,由于 scFv 相对分子质量小,组织穿透力强,清除速率快,其在疾病诊断与放射显影方面有着独特的优势。放射性同位素标记的 scFv 能准确定位肿瘤病灶或一些特殊的肿瘤细胞,能够在对正常细胞影响较小的情况下,辅助肿瘤的诊断与分析,还能够用于肿瘤的放射性免疫治疗。2021年,陆莹等^[43]将靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的 scFv 与金磁纳米颗粒偶联,获得生物探针 scFv-Fe₃O₄/

Au, 其能够识别 EGFR 阳性的非小细胞肺癌细胞; 在全身注射后, 利用核磁共振成像即可检测到这种生物探针在肿瘤组织中的积累, 帮助分析、定位肿瘤细胞, 为 EGFR 阳性非小细胞肺癌的非侵入性诊断奠定基础。2022 年, Shabani 等^[44]应用核糖体展示技术, 获得了靶向葡萄糖调节蛋白质 78(glucose-regulated protein 78, GRP78) C 端的单链抗体。GRP78 在肿瘤细胞表面高表达, 与肿瘤细胞的存活、转移和化疗耐药有关。该研究为开发癌症诊断和免疫治疗工具奠定了基础。

2.3 单链抗体在心血管疾病中的应用 scFv 在血液中能够被快速清除, 并有着良好的组织穿透性, 其在心血管疾病的治疗中有着不可替代的地位。2016 年, 王俊宏等^[45]制备了靶向人 CRP 的单链抗体, 研究表明, 该抗体可以有效地治疗心血管堵塞、心肌梗死以及脑血管堵塞。Hemadou 等^[46]在兔动脉粥样硬化模型中利用体内噬菌体展示技术筛选出了多种抗动脉粥样硬化的 scFv, 并通过筛选获得了高抗原反应性 scFv, 该抗体在抗动脉粥样硬化和其他涉及巨噬细胞病理性炎症的分子成像领域展现出了良好的应用前景。

2.4 单链抗体在传染性疾病中的应用 目前单链抗体已被广泛应用于流感、艾滋病等传染性疾病的预防和治疗, 尤其是在应对突发的烈性传染病中发挥了重要作用^[47-49]。新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的爆发已对全球公共健康、社会发展等造成了严重的影响。目前, 全球有数百个关于 SARS-CoV-2 的抗体研发项目正在开展, 其中部分已进入临床研究阶段^[50]。2021 年, Kim 等^[51]用噬菌体展示技术制备了 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NP)的特异性单链抗体, 并将其与 Fc 段融合获得 scFv-Fc。利用该抗体, 团队成功建立了 SARS-CoV-2 NP 特异性快速诊断方法, 获得了经济、快速、准确和使用便捷的 COVID-19 诊断试剂。2022 年 Ge 等^[52]制备了 SARS-CoV-2 的 S1 蛋白高结合敏感性抗体 IgY 的单链抗体 IgY-scFv; 该研究表明, IgY-scFv 是开发针对人畜 COVID-19 免疫检测和被动免疫治疗的合适候选者。

艾滋病始终是严重威胁人类健康的公共卫生问题。广谱中和抗体(broadly neutralizing antibody, bNAbs)能够在被动给药后预防人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的感染, 是 HIV 被动免疫治疗研究的热点。2022 年 van Dor-

sten 等^[53]研究指出, 由于 scFv 分子较小, 能够更好地向黏膜组织扩散, bNAbs 的 scFv 针对无细胞病毒传播展现了显著的广度和效力; 与全抗体相比, 具有高组织渗透性、低免疫原性等优势, 更适于 HIV 被动免疫药物的开发。

3 单链抗体应用的局限性

经过了 20 多年的发展, 单链抗体技术取得了巨大的成就, 但是在应用中仍然存在一些问题, 如亲和力较低、稳定性较差和半衰期短等。首先, 单链抗体相对于其亲本单克隆抗体, 亲和力可能会降低 10~1 000 倍, 这成为它在免疫分析等应用中的一个制约因素。目前, 可以通过亲和力成熟对单链抗体的亲和力进行改进, 或者通过构建多价抗体来增加抗体的功能亲和性。其次, 单链抗体稳定性较差, 常常表现出聚集倾向。针对该问题, 可以引入二硫键, 构建二硫键稳定性抗体(disulfide-stabilized fragment variable, dsFv)或者将其转化为抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab)以进一步增加其稳定性。第三, 单链抗体的半衰期较短, 清除速度快, 在临床应用中需要重复多次给药, 限制了其应用。其中, 构建 scFv 多聚体是其改进方法之一, 能够有效克服 scFv 在体内清除过快的问题。此外, 2022 年 Kelly 等^[54]利用新生儿 Fc 受体结合肽成功延长单链抗体半衰期, 并提高其跨细胞移动能力, 为单链抗体的改造提供了新思路。除此之外, 与全抗体类似, 如何降低单链抗体的免疫原性以及单链抗体的人源化依旧是研究的热点。

4 结语

在过去的二十多年中, 单链抗体已经在各个领域被人们广泛应用, 其在科学研究和临床应用中已有不可替代的地位。但由于其自身特点及局限性, 其应用转化还面临着很多问题, 而且产业化开发也仍有很多需要改进的方面。随着科学的发展、技术的进步, 相信在不久的将来, 单链抗体存在的问题能够得到解决, 使其在医学、食品卫生和农业等领域发挥更大的应用价值。

参考文献

- [1] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, *et al.* Single-chain antigen-binding proteins[J]. *Science*, 1988, 242(4877): 423-426.
- [2] Farajnia S, Ahmadzadeh V, Tanomand A, *et al.* Develop-

- ment trends for generation of single-chain antibody fragments [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2014, 36(5): 297-308.
- [3] 乔媛媛, 陈宇萍. 单链抗体及其医学应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(1): 98-101.
- [4] Acheampong DO. Bispecific antibody (bsAb) construct formats and their application in cancer therapy[J]. *Protein Pept Lett*, 2019, 26(7): 479-493.
- [5] Petrus MLC, Kiefer LA, Puri P, *et al.* A microbial expression system for high-level production of scFv HIV-neutralizing antibody fragments in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(21/22): 8875-8888.
- [6] Altshuler EP, Serebryanaya DV, Katrukha AG. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2010, 75(13): 1584-1605.
- [7] Hudson PJ. Recombinant antibody fragments[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9(4): 395-402.
- [8] Salehinia J, Sadeghi HMM, Abedi D, *et al.* Improvement of solubility and refolding of an anti-human epidermal growth factor receptor 2 single-chain antibody fragment inclusion bodies[J]. *Res Pharm Sci*, 2018, 13(6): 566-574.
- [9] Mahgoub EO, Bolad AK. Construction, expression and characterisation of a single chain variable fragment in the *Escherichia coli* periplasmic that recognise MCF-7 breast cancer cell line[J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(2): 265-273.
- [10] Chames P, van Regenmortel M, Weiss E, *et al.* Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(2): 220-233.
- [11] Nghia NH, Kumada Y, Kishimoto M, *et al.* Effective production of single-chain variable fragment (scFv) antibody using recombinant *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture[J]. *J Biosci Bioeng*, 2021, 132(1): 56-63.
- [12] Behravan A, Hashemi A, Marashi SA, *et al.* Genome-scale metabolic model-based engineering of *Escherichia coli* enhances recombinant single-chain antibody fragment production[J]. *Biotechnol Lett*, 2022, 44(10): 1231-1242.
- [13] Könning D, Kolmar H. Beyond antibody engineering: directed evolution of alternative binding scaffolds and enzymes using yeast surface display[J]. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 32.
- [14] Ye YC, Nian SJ, Wang X, *et al.* Stable expression of human anti-IL-33 scFv-IgG1Fc fusion protein in CHO k1 cells[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2016, 32(5): 600-603; 608.
- [15] Krebs SK, Stech M, Jorde F, *et al.* Synthesis of an anti-CD7 recombinant immunotoxin based on PE24 in CHO and *E. coli* cell-free systems[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13697.
- [16] Montoliu-Gaya L, Villegas S. Production of therapeutic single-chain variable fragments (ScFv) in *Pichia pastoris* [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2313: 151-167.
- [17] Ferrara F, Soluri MF, Sblattero D. Recombinant antibody selections by combining phage and yeast display[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1904: 339-352.
- [18] Scholler N. Selection of antibody fragments by yeast display [M]. *Antibody Engineering*. New York: Humana Press, 2018; 211-233.
- [19] Karbalaei M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [20] Montoliu-Gaya L, Esquerda-Canals G, Bronsoms S, *et al.* Production of an anti-A β antibody fragment in *Pichia pastoris* and *in vitro* and *in vivo* validation of its therapeutic effect [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0181480.
- [21] Zahrl RJ, Prielhofer R, Burgard J, *et al.* Synthetic activation of yeast stress response improves secretion of recombinant proteins[J]. *N Biotechnol*, 2023, 73: 19-28.
- [22] Lim S, Kim DS, Ko K. Expression of a large single-chain 13F6 antibody with binding activity against Ebola virus-like particles in a plant system[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7007.
- [23] Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K, *et al.* Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4755.
- [24] Kopertekh L, Meyer T, Freyer C, *et al.* Transient plant production of *Salmonella Typhimurium* diagnostic antibodies [J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2019, 21: e00314.
- [25] Lonoce C, Marusic C, Morrocchi E, *et al.* Enhancing the secretion of a glyco-engineered anti-CD20 scFv-fc antibody in hairy root cultures[J]. *Biotechnol J*, 2019, 14(3): e1800081.
- [26] Marín Viegas VS, Ocampo CG, Restucci FE, *et al.* Synthesis of single-chain antibody fragment fused to the elastin-like polypeptide in *Nicotiana benthamiana* and its application in affinity precipitation of difficult to produce proteins[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(9): 2505-2517.
- [27] Unger T, Peleg Y. Recombinant protein expression in the baculovirus-infected insect cell system[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 800: 187-199.
- [28] Ciccarone VC, Polayes DA, Luckow VA. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using a baculovirus shuttle vector[J]. *Methods Mol Med*, 1998, 13: 213-235.
- [29] Murhammer DW. Review and patents and literature. The use of insect cell cultures for recombinant protein synthesis: Engineering aspects [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, 31(3): 283-310.
- [30] Ebihara T, Masuda A, Takahashi D, *et al.* Production of scFv, Fab, and IgG of CR3022 antibodies against SARS-CoV-2 using silkworm-baculovirus expression system[J]. *Mol Biotechnol*, 2021, 63(12): 1223-1234.
- [31] Ye Z, Gastfriend BD, Umlauf BJ, *et al.* Antibody-targeted liposomes for enhanced targeting of the blood-brain barrier [J]. *Pharm Res*, 2022, 39(7): 1523-1534.
- [32] He P, Xin W, Schulz P, *et al.* Bispecific antibody fragment targeting APP and inducing α -site cleavage restores neuronal health in an Alzheimer's mouse model[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(11): 7420-7432.
- [33] Zhang Y, Qian L, Kuang YZ, *et al.* An adeno-associated virus-mediated immunotherapy for Alzheimer's disease[J]. *Mol Immunol*, 2022, 144: 26-34.
- [34] Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease[J]. *Eur J Neurol*, 2020, 27(1): 27-42.
- [35] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, *et al.* Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice;

- implications for neurodegenerative disorders [J]. *Science*, 2000, 287(5456): 1265-1269.
- [36] Sominsky L, de Luca S, Spencer SJ. Microglia: key players in neurodevelopment and neuronal plasticity [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 94: 56-60.
- [37] Fassler M, Benaim C, George J. A single chain fragment variant binding misfolded alpha-synuclein exhibits neuroprotective and antigen-specific anti-inflammatory properties [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3822.
- [38] Zhou SJ, Wei J, Su S, *et al.* Strategies for bispecific single chain antibody in cancer immunotherapy [J]. *J Cancer*, 2017, 8(18): 3689-3696.
- [39] Rizzieri D. Zevalin® (ibrutinomab tiuxetan): after more than a decade of treatment experience, what have we learned? [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 105: 5-17.
- [40] de Aguiar RB, da Silva TA, Costa BA, *et al.* Generation and functional characterization of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-FGF₂ 3F12E7 monoclonal antibody [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1432.
- [41] 石英贤, 潘鑫艳, 冯强, 等. 抗 p21Ras 蛋白抗体研发及在肿瘤病理和肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2022, 38(6): 713-715.
- [42] Smith RA, Zammit DJ, Damle NK, *et al.* ASN004, A 5T4-targeting scFv-fc antibody-drug conjugate with high drug-to-antibody ratio, induces complete and durable tumor regressions in preclinical models [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(8): 1327-1337.
- [43] Lu Y, Huang J, Li F, *et al.* EGFR-specific single-chain variable fragment antibody-conjugated Fe₃O₄/Au nanoparticles as an active MRI contrast agent for NSCLC [J]. *MAGMA*, 2021, 34(4): 581-591.
- [44] Shabani S, Moghadam MF, Gargari SLM. Isolation and characterization of a novel GRP78-specific single-chain variable fragment (scFv) using ribosome display method [J]. *Med Oncol*, 2021, 38(9): 115.
- [45] 王俊宏, 吴昕, 王玫瑰, 等. 一种抗人 mCRP 单链抗体及其应用: CN105969777A [P]. 2016-09-28.
- [46] Hemadou A, Fontayne A, Laroche-Traineau J, *et al.* *In vivo* human single-chain fragment variable phage display-assisted identification of galectin-3 as a new biomarker of atherosclerosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(19): e016287.
- [47] Alizadeh S, Moazen S, Faraji SN, *et al.* Novel single-chain antibodies against highly conserved epitopes in the hemagglutinin of influenza A viruses: promising agents for universal therapies [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24(1): 17-23.
- [48] Kumar V. Understanding the complexities of SARS-CoV2 infection and its immunology: a road to immune-based therapeutics [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106980.
- [49] Liu BF, Zou F, Lu LJ, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells guided by the single-chain fv of a broadly neutralizing antibody specifically and effectively eradicate virus reactivated from latency in CD4⁺ T lymphocytes isolated from HIV-1-infected individuals receiving suppressive combined antiretroviral therapy [J]. *J Virol*, 2016, 90(21): 9712-9724.
- [50] Wang MY, Zhao R, Gao LJ, *et al.* SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 587269.
- [51] Kim HY, Lee JH, Kim MJ, *et al.* Development of a SARS-CoV-2-specific biosensor for antigen detection using scFv-Fc fusion proteins [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 175: 112868.
- [52] Ge SK, Wu R, Zhou TT, *et al.* Specific anti-SARS-CoV-2 S1 IgY-scFv is a promising tool for recognition of the virus [J]. *AMB Express*, 2022, 12(1): 18.
- [53] van Dorsten RT, Reh L, Trkola A, *et al.* Single-chain variable fragments of broadly neutralizing antibodies prevent HIV cell-cell transmission [J]. *J Virol*, 2022, 96(4): e0193421.
- [54] Kelly VW, Sirk SJ. Short FcRn-binding peptides enable salvage and transcytosis of scFv antibody fragments [J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17(2): 404-413.

Research progress of single-chain antibody fragments and their medical application

JIAO Zi-chen, WANG Zi-hao, KUANG Yu-zhu, ZHANG Lin-bo, ZHANG Wen-hui, FU Lu (*College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China*)

Abstract: Genetically engineered modification of antibodies generates various types of new small molecule antibodies, among which single-chain antibody (ScFv) has indisputable advantages including high specificity, high affinity, tissue permeability, excellent stability and low immunogenicity, easy preparation, and large-scale production, etc. ScFv has been widely applied in the fields of drug development and disease treatment. This review summarizes the new research progress and medical application of ScFv.

Key words: single-chain antibody; expression system; genetic engineered antibody