

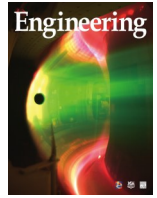


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Immunology—Review

靶向膜蛋白的抗体药物开发的新进展

Georgina To'a Salazar^a, 黄子逸^{b,c,d}, 张凝艳^a, 张学光^{b,c,d,e,*}, 安志强^{a,*}

^a Texas Therapeutics Institute, Brown Foundation Institute of Molecular Medicine, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX 77030, USA

^b Jiangsu Institute of Clinical Immunology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215123, China

^c Jiangsu Key Laboratory of Clinical Immunology, Soochow University, Suzhou 215123, China

^d Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Tumor Immunology, The First Affiliation Hospital of Soochow University, Suzhou 215123, China

^e State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2020

Revised 21 August 2020

Accepted 16 November 2020

Available online 30 September 2021

关键词

抗体治疗

复杂膜蛋白

离子通道

转运蛋白

膜结合酶

G 蛋白偶联受体

药物发现

摘要

在疾病干预的众多膜蛋白靶标中,G 蛋白偶联受体(GPCR)作为人体内最大的膜受体蛋白家族,成为很多药物的重要靶点,其次是离子通道、转运蛋白和激酶等。膜蛋白在细胞信号转导和运输中发挥了关键作用,当前药物研发面临的挑战在于进一步发掘此类膜蛋白的潜在靶点的干预价值,开发治疗性抗体药物。鉴于特异性抗体能够识别膜蛋白的灵敏特性,以及随着基因工程技术的进步,对已有抗体进行加工改造可获得适应多个靶点蛋白的特异性抗体。然而,成功分离特异靶向膜蛋白抗体取决于一系列因素。我们更易研制和识别结构简单且具有长片段胞外区的抗体分子,但对于高难度的靶点蛋白,如GPCR和其他复杂膜蛋白往往难以得到具有活性的候选抗体。目前若要开发针对复杂膜蛋白(如GPCR、离子通道、转运蛋白和激酶)的抗体药物,必须从抗原靶点设计、抗体筛选策略、先导抗体优化及药物研发模式方面进行考虑。深入研究靶标膜蛋白的结构有助于推进治疗性抗体药物的开发进程。本文概述了抗体靶向复杂膜蛋白的优势和挑战,以及膜蛋白抗原制备和抗体研发策略的最新进展。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

根据抗体协会(Antibody Society)的名单,截至2021年9月,有127种抗体在美国和欧盟上市[1]。其中,超过一半(77/127)以膜蛋白为靶标。然而,这些抗体中的大多数都是靶向具有简单跨膜区和较长胞外区(ECD)的膜蛋白,如酪氨酸激酶受体。仅有三种靶向结构复杂的膜蛋白,如G 蛋白偶联受体(GPCR)。值得注意的是,获批药物中约40%通过靶向GPCR复合物发挥药理作用,

体现了膜蛋白类治疗性抗体的开发潜力[2]。事实上,离子通道、转运蛋白、GPCR和激酶是药物研发中最大的一类药物靶点[3]。

业界和相关研究团队已有多篇关于膜蛋白抗体的优秀综述[2-7]。本文主要探讨治疗性抗体研发现状和技术革新,以致致力于研发和识别更复杂的膜蛋白抗体,包括GPCR、离子通道、转运蛋白和激酶。GPCR和离子通道是小分子化合物重要的作用靶点。分析2016年美国食品药品监督管理局(FDA)批准的药物靶标发现,GPCR和离

* Corresponding authors.

E-mail addresses: xueguangzh@126.com (X.-G. Zhang), Zhiqiang.An@uth.tmc.edu (Z. An).

子通道在小分子治疗药物中分别占比 33% 和 18% [8]。GPCR 和离子通道是生物医药研究和临床研发高度关注的热点[9]。如何选择膜蛋白靶点是 小分子药物开发中遇到的一个关键问题，虽然小分子比抗体更容易到达作用部位，但抗体能有效识别复杂膜蛋白的胞外区。以 CC 趋化因子受体 4 (CCR4) 为例，该基因编码的蛋白属于 GPCR 家族，CCR4 抗体 mogamulizumab 批准用于治疗复发或难治性蕈样真菌病和 Sézary 综合征[10]。另一个例子是预防偏头痛的药物 erenumab，其抑制了降钙素基因相关肽受体 (CGRPR) 的生物活性[11]。靶向膜蛋白的抗体制备策略之一是抗体工程化改造。当特定蛋白构象改变与疾病状况相关时，抗体药物在选择性、特异性和效应功能方面具有许多额外的优势，单克隆抗体 BIL010t 靶向非功能性的胞外 ATP 激活离子通道无功能的嘌呤受体 P2X7 (nfP2X7)，目前正在利用该抗体进行治疗基底细胞癌的临床试验[12]。抗体偶联药物通过改善药代动力学增加了药物活性，Gptx-1 多肽毒素偶联抗体在有效阻断 Nav1.7 离子通道的同时延长了抗体半衰期，并能更好地作用于神经纤维[13]。除了直接作用外，抗体还可以通过抗体依赖的细胞毒 (ADCC) 和补体依赖的细胞毒 (CDC) 等效应发挥功能。利用 mogamulizumab 证明

了可通过改造抗体可结晶片段 (Fc) 区来提高药效和安全性[14]。

蛋白质晶体技术和其他结构生物学手段有助于我们更好地解析膜蛋白的三维结构[15]。模拟膜蛋白天然结构制备环状多肽抗原，从而成功研发靶向这些蛋白的治疗性抗体[16]。抗体的分离纯化也得益于技术进步，大肠杆菌 GroEL 作为分子佐剂进行 DNA 免疫，诱导了针对靶向蛋白的特异性抗原，提高 DNA 免疫在体内激发抗体产生的效率[17]。

膜蛋白靶向抗体药物的发展经历了四个关键技术。第一是分离稳定天然蛋白构象的抗原；第二是克服免疫耐受，即免疫系统对类似自身抗原结构不产生免疫应答；第三个关键点则需要考虑这些靶分子多样化的胞外区 (抗体的作用区域)；第四是筛选有效作用于膜蛋白功能位点的特定抗体。不同的研发策略以及新技术和新方法正被用于解决上述关键技术以开发更高效的抗体药物。表 1 [12,18-40]列出了正在进行临床前研究和已用于临床治疗的膜蛋白靶点抗体药物。我们根据靶点类型、抗原结构、抗体形式和抗体生产平台将这些抗体进行分类，并给出配体、结合位点、作用机制、有效性、表位、治疗适应症和副作用等详细信息 (表 1)。

表 1 靶向膜蛋白抗体研发的关键技术及面临的挑战

Target	Target class	Antibody drug	Company	Antigen format	Antibody format	Indication	References
CCR4	GPCR	Mogamulizumab/Poteligeo	Kyowa Hakko Kirin	Purified N-terminal peptide	Humanized glyco-engineered IgG1	Mycosis fungoides or Sézary syndrome	[18-20]
CCR5	GPCR	PRO 140/Leronlimab	CytoDyn	L1.2 - CCR5 ⁺ cells	Humanized version of murine mAb	GVHD, HIV, triple negative breast cancer	[21-24]
CGRPR	GPCR	Erenumab/Aimovig	Amgen/Novartis	Soluble N-terminal ECD expressed in HEK 293 cells	Human IgG2	Migraine prevention	[25-29]
C5aR	GPCR	IPH5401	Innate Pharma MedImmune LLC	L1.2 cells overexpressing C5aR	IgG	Cancer	[30]
LGR5	GPCR	BNC-101	Bionomics	NA	Humanized monoclonal antibody	Metastatic colorectal cancer	[31]
	GPCR	MCLA-158 (also targeting EGFR)	Merus	NA	Fabs from combinatorial libraries of rearranged hypervariable V _H and V _L sequences from nonimmunized human donors	Colorectal cancer	[32]

Target	Target class	Antibody drug	Company	Antigen format	Antibody format	Indication	References
GLP-1	GPCR	JY09	Beijing Dongfang Biotech Co., Ltd.	NA	Construction with human IgG2 Fc fragment and peptide agonist	Diabetes or obesity	[33]
CB1	GPCR	Nimacimab	Bird Rock Bio	NA	NA	Fibrosis, metabolic and inflammatory diseases	[34]
CXCR4	GPCR	Ulocuplumab	Bristol-Myers Squibb	Cells overexpressing CXCR4	Human IgG4 monoclonal	Multiple myeloma	[35]
Orai-1	Calcium release activated channel		Amgen	Cells overexpressing Orai-1	XenoMouse produced human antibodies	Autoimmune disease	[36]
			Novo Nordisk	Extracellular loop 2 peptide	Humanized murine antibodies		[37]
nfP2X7	Ligand-gated ion channel	BIL010t	Biosceptre	Peptide of region uniquely exposed in this variant of P2X7 (nfP2X7)	IgG	Cancer	[12]
Glucose transporter inward-open or outward-open states	Transporter	LM043, LM048	Integral Molecular	Virus-like particles	IgG1-Fc	Diabetes	[38]
MMP-14 Protease	Membrane-bound enzyme	3A2	UC Riverside and SBP Medical Discovery Institute	Catalytic domain of MMP-14	Fab from synthesized human Fab library	Cancer	[39]
Human apelin receptor	GPCR	JN241-9	Amgen	Stabilized target protein in nanodiscs	Single-domain antibody derived from camelid heavy chain-only antibody	Chronic heart failure	[40]

NA: information not available; CCR5: C - C motif chemokine receptor 5; C5aR: complement component 5a receptor; HEK: human embryonic kidney; LGR5: leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5; GLP-1: glucagon-like peptide-1; CB1: cannabinoid receptor type 1; CXCR4: C - X - C motif chemokine receptor 4; Orai-1: calcium release-activated calcium channel protein 1; EGFR: epidermal growth factor receptor; nfP2X7: non-functioning P2X purinoceptor 7; MMP-14: matrix metalloproteinase-14; IgG: immunoglobulin G; Fc: fragment crystallizable region; Fab: antigen-binding fragment; GVHD: graft-versus-host disease; HIV: human immunodeficiency virus; V_H: variable light chain; V_L: variable light chain.

抗体工程技术提高了抗体结合靶抗原的特异性和有效性。改造抗体Fc区，能够减缓抗体药物的半衰期。此外，Fc区工程化改造还可以增强或减弱ADCC等Fc效应。膜蛋白通过其配体或其他相互作用的蛋白激活下游信号通路。许多膜蛋白抗体可有效识别并稳定GPCR和离子通道的结构域[12,41-43]，影响其参与的多种细胞信号转导过程。

ClinicalTrials.gov、PubMed数据库和抗体协会的相关资料给出了目前处于临床前和临床开发中的膜蛋白靶向抗体，本文挑选了其中具有代表性的例子，探讨了靶向膜蛋

白抗体的作用机制、膜蛋白抗原的制备以及抗体的研制。

2. 膜蛋白抗体的作用机制

GPCR的胞外区介导受体与配体相互作用，激活的受体将信号传递到细胞内并招募下游效应蛋白[44]。离子通道在细胞膜上形成一个孔道，疏水性氨基酸面向磷脂双层，离子可以通过这个通道穿过细胞膜的疏水核心[45]。离子通道、GPCR和其他跨膜蛋白参与了许多重要的细胞

生物学效应,其功能异常与多种疾病有关。因此,以它们为靶点开发的抗体在治疗和预防相关疾病方面有独特的优势[8-9]。研发膜蛋白治疗性抗体的几个要素:结构高度保守是机体维持正常功能不可或缺的,因此针对这些靶点的干预手段具有更广的选择性;跨膜蛋白(离子通道,GPCR)和膜结合的激酶(基质金属蛋白酶)的结构多样性,为干预调节这些蛋白的特定功能提供了许多思路,更易于研发靶向特异性的治疗抗体;通过多种方式优化改造抗体自身复杂的结构可设计出针对多靶点的单抗药物。

膜蛋白抗体与GPCR的结构及可能的互作位点如图1(a)所示。单抗与GPCR相互作用的一种方式是通过维持其活性状态。一项关于GPR56的研究利用激发型抗体阐明了GPCR信号对人脑胶质瘤发生、发展的作用[46]。另外一种效果是单抗促进GPCR形成二聚体功能单元,研究人员发现代谢型谷氨酸受体7和 $\beta 1$ 肾上腺素能受体通过识别二聚体可有效激活GPCR[47-48]。相对地,阻断型抗体可作为一种GPCR抑制剂,GIP是葡萄糖依赖性促胰岛素多肽,通过干预GIP-GIPR这一路径,有望治疗肥胖症和糖尿病患者[49]。Mogamulizumab是靶向CCR4的人源化单克隆抗体,2018年被批准用于治疗淋巴瘤、Sézary综合征和蕈样真菌病,但未表现出显著的促进或抑制GPCR活性效应[50]。Mogamulizumab通过清除肿瘤微环境中表达CCR4的肿瘤细胞以及肿瘤浸润的调节性T细胞发挥作用[18,51-52],通过Fc去岩藻糖基化加强了ADCC效应[18]。靶向GPCR的单抗erenumab是一种降钙素基因相关肽(CGRP)抑制剂,结合和拮抗降钙素基因相关肽受体(CGRPR)[25-26],2018年已被批准用于预防成人偏头痛[11]。离子通道系列抗体的效应途径如图1(b)所示;抗体诱导细胞表面受体产生内化,钙释放激活钙通道调节分子1(Orai-1)与自身免疫炎症性疾病相关,Orai-1蛋白形成了细胞膜钙离子通道,导致细胞外钙离子内流[37]。钙离子信号传导对于T细胞活化和功能是必需的[53]。针对结构复杂的膜蛋白靶点开发的单克隆抗体能够识别特殊构象[图1(c)],葡萄糖转运蛋白(GLUT4)单抗分为向内开放和向外开放的构象状态,对葡萄糖的摄取和代谢至关重要[38]。抗体作用于膜结合激酶,通过改变重链长CDR-H3区域,到达配体结合位点以催化目标蛋白酶[图1(d)]。具有超长CDR-H3的抗体来源于免疫骆驼血清[40,54],或人工合成的CDR-H3类似结构[39]。基质金属蛋白酶-14(MMP-14)就是一个长CDR-H3靶向作用的膜蛋白位点[39]。人apelin受体(APJ)是慢性心力衰竭患者的治疗靶点[40]。靶向apelin受体的抗体JN241-9属于A类GPCR,其N末端胞外区比B类GPCR更短。骆驼单域抗体

突变体JN241-9是首个GPCR抗体激动剂,相对较长的CDR3区域易于与疏水核心结合[40]。已有研究报道,治疗性抗体MEDI9447通过稳定非激活状态的构象和交联CD73二聚体,拮抗胞外5'-核苷酸酶(ecto-5'-nucleotidase,CD73)活性[图1(d)][54]。

3. 抗原制备

抗原制备是研制特异性调节膜蛋白功能的候选抗体的首要条件。理想的抗原应该包含与靶蛋白功能相关的所有关键位点,因此,膜蛋白抗原需具有相关作用的完整构象和转录后修饰;虽然不需要蛋白的完整分子,但抗体靶向表位的相关区域是必不可少的。为了便于大量生产有活性功能的抗原,我们常常对抗原的某些结构进行调整优化,这些改变应注意保留蛋白结构的完整性和生物活性,包括整体构象、配体结合、膜表达、抗原加工和相关表位。选择治疗性抗体的靶点因不同种类的膜蛋白而有所差异,一般情况下,抗原识别位点在胞外环区和靠近N末端部位[36-38,40]。膜蛋白胞内段是维持其结构和信号的传导区,如靶向GLUT4胞内功能区的LM043[38]。膜结合激酶抗体竞争结合酶与底物的作用部位[39],抗apelin受体的JN241-9识别受体-配体结合位点[40]。抗体药物偶联需要设计特定的抗原结合片段,单抗通过一个化学链与生物活性小分子药物相连,抗体和小分子作用于不同的靶点实现协同效应[21]。鉴于膜蛋白的分子量和结构复杂性,靶向这些蛋白的抗体必须覆盖广泛的抗原表位。抗原的表达形式同样遵循一定的策略,充分了解靶蛋白的结构和功能,可参考已有抗体的类似靶点结构。膜蛋白靶标的分类基于蛋白行使功能的方式,如用离子通道的生理功能区分刺激-分泌耦合,根据序列、功能和系统发育分析对GPCR进行分组[55-56]。开发新型抗原是探索膜蛋白生物功能和新药创制的突破口(图2)。新型的杯芳烃基表面活性剂和Salipro纳米膜技术为稳定生产膜蛋白抗原提供了新思路[4]。

3.1. 多肽

多肽是最简单的抗原形式,成本低且易于大量生产。以下三种情况首选多肽抗原:①抗体只需要与受体结合就能阻断特定细胞功能;②目标细胞的靶分子胞外N末端直接参与其功能;③膜蛋白有较长的胞外区。GPCR靶向单克隆抗体(抗CCR4)[19]和钙离子通道Orai-1抗体[37]就使用了多肽抗原。之前的研究表明,让链状的多肽成环约束了多肽的活动,可获得与天然构象相似的稳定抗原[57]

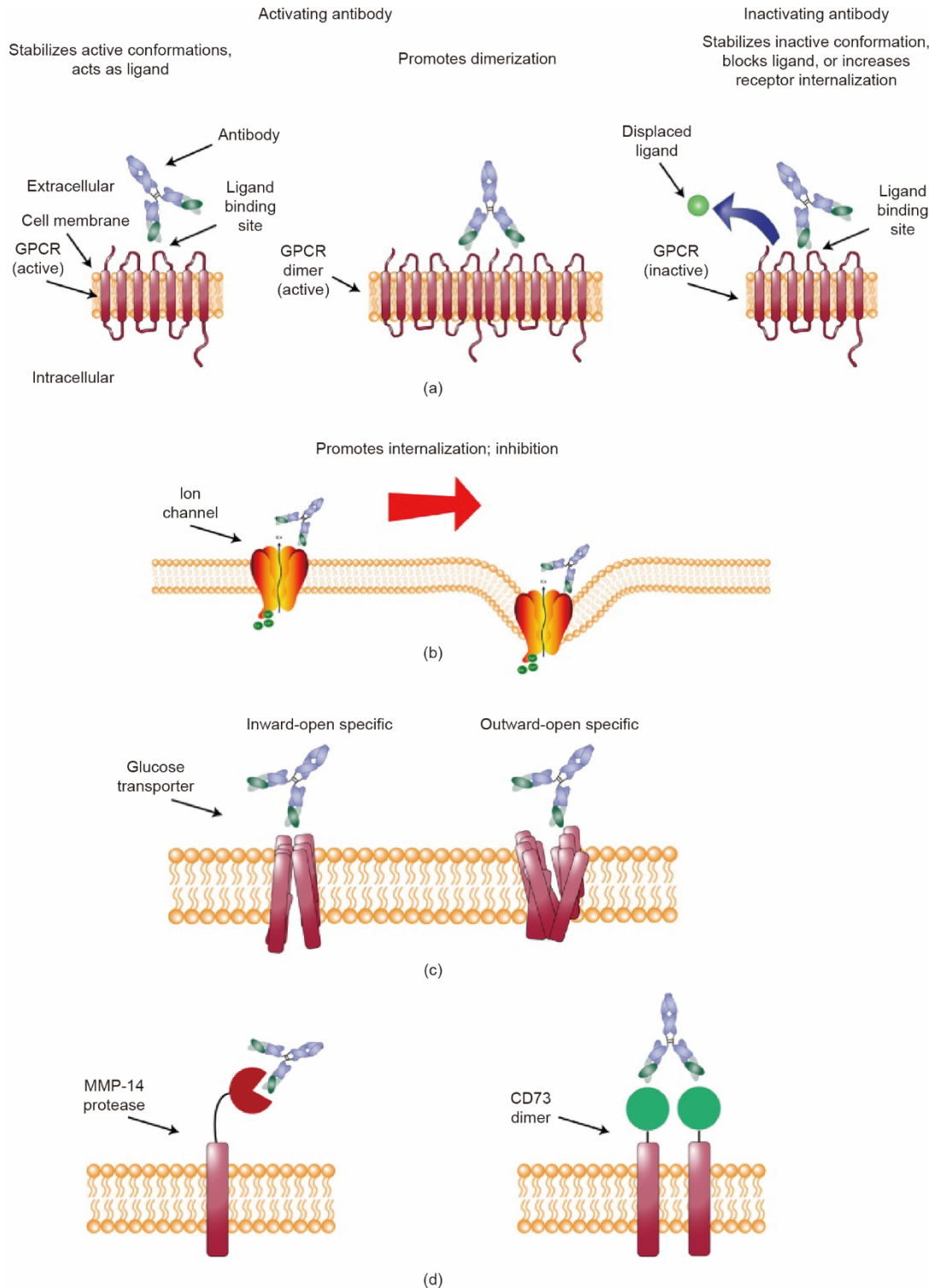


图1. 靶向膜蛋白的抗体作用机制。(a) 抗体激活 GPCR，作为配体活化或促二聚化；抗体抑制 GPCR，如与配体竞争位点。(b) 促进内化是抗体靶向离子通道的一种方式。(c) 靶向特定功能状态的特异性抗体，靶向细胞摄取葡萄糖的向内和向外开放状态。(d) 左侧图表示抗体针对 MMP-14 的结合部位，右侧图表示通过稳定无活性的构象（如 CD73 二聚体）来抑制酶的活性。

[图2 (a)]。例如，通过化学键将多肽装入 CLIPS 骨架，这项技术已成功用于趋化因子受体-2 (CXCR2) 抑制剂的研发[16]。N 末端未经修饰的线性多肽容易受到肽链外切酶的识别，改造后的环状多肽避免了酶降解失活，提高

了多肽分子的稳定性[图2 (a)]。

3.2. 细胞表达的模型多肽或蛋白

细胞膜的脂质环境保证了膜蛋白的正确折叠和活性，

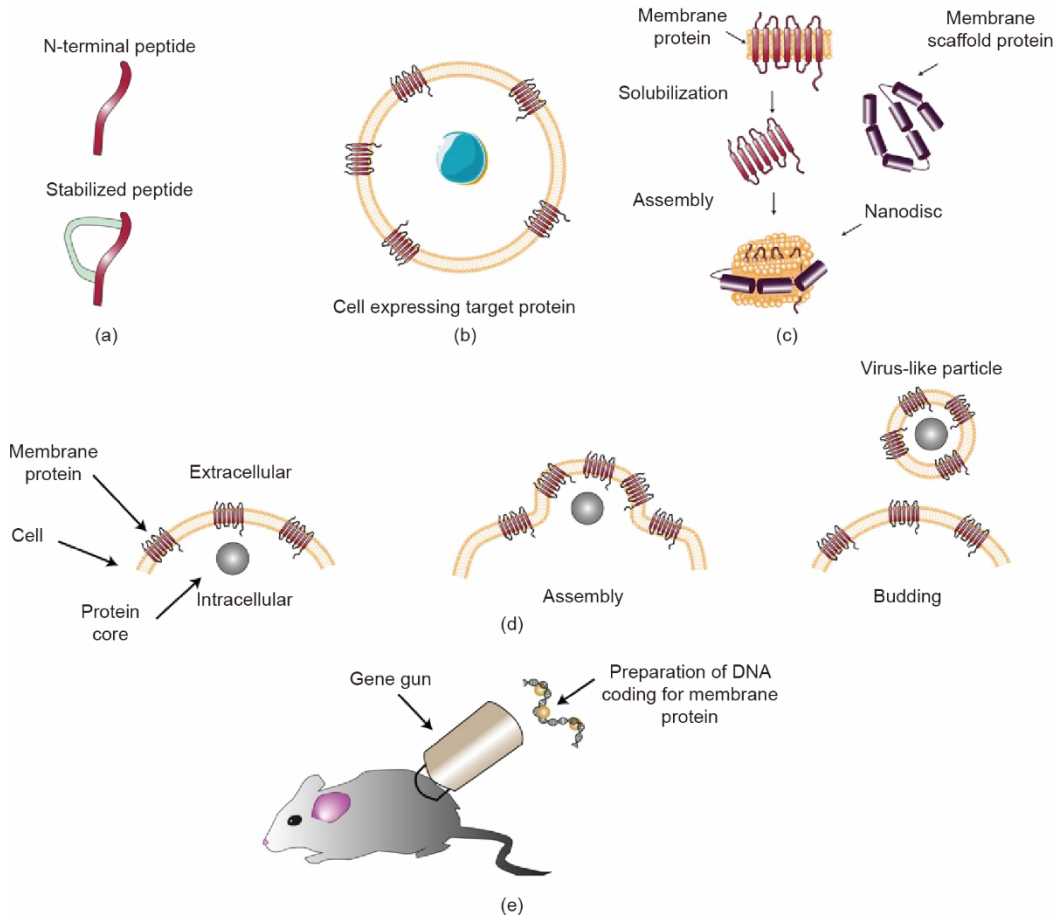


图2. 选择抗原形式。(a) 最简单的抗原形式是多肽, 可以通过化学键或环化等方法形成稳定多肽; (b) 细胞表达靶分子膜蛋白; (c) 脂质纳米圆盘保留了膜蛋白的关键结构, 避免产生非特异性抗体; (d) 病毒样颗粒是一种保持膜蛋白天然构象产生抗原蛋白的方法; (e) 用编码膜蛋白的DNA序列免疫动物提高动物免疫效率。

因此制备天然构象的膜蛋白抗原更易获得具有治疗功能的膜蛋白抗体。常用的方法有细胞表达多肽片段或靶蛋白[36,58]、利用纳米盘制备膜蛋白抗体[59]、利用具有较强免疫原性的病毒样颗粒[38,60]和DNA免疫技术制备膜蛋白抗体[61-62]。

利用细胞表达膜蛋白, 必须保证宿主细胞产生有功能性的、正确折叠的抗原蛋白, 并具备必要的翻译后修饰[图2 (b)], 同时选择适合高密度培养、瞬时转染表达量高的细胞系。MaxCyte瞬时电转染可快速生产大量抗原蛋白, 对于转染率较低的表达载体也能纯化得到一定数量的膜蛋白[63]。抗富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5) 单克隆抗体就是通过将LGR5多肽与受体活性修饰蛋白 (RAMP) 共转染细胞来表达LGR5抗原[64]。宿主细胞表达GPCR多肽或蛋白的细胞免疫方案也被用于研制离子通道抗体, 合成Orai-1 [36]和P2X7 [58]多肽免疫动物, 获得了离子通道的阻断型抗体。Orai-1单抗可治疗自身免疫性疾病患者[36-37], P2X7阻断剂对炎症性疾病有疗效[65]。

3.3. 纯化膜蛋白技术——脂质纳米圆盘 (nanodisc) 和苯乙炔马来酸脂质颗粒 (SMALP)

我们通常使用生物去垢剂分离和提纯膜蛋白, 突变可以使去垢剂中的蛋白结构更加稳定[66-67]。新型的纳米圆盘或脂盘可以提高膜蛋白折叠的准确率[68]。APJ蛋白在昆虫细胞中表达并在纳米圆盘和脂质体中进行高水平重组, 成功获得功能性APJ激动型抗体[40]。SMALP溶剂也具有类似的效果[69-70]。纳米圆盘和SMALP作为新型的膜蛋白表达技术, 替代了传统去垢剂。纳米圆盘由支架蛋白和磷脂分子构成了类似磷脂双分子层结构, 膜蛋白整合到纳米圆盘上[图2 (c)], 最大限度保留了蛋白的结构、功能和抗体识别的重要位点。

3.4. 病毒样颗粒和蛋白脂质体

其他模拟天然膜蛋白的抗原包括病毒样颗粒 (VLP), 是一种基于双层脂质的纳米结构, 与纳米圆盘相比, 它更趋近于天然细胞膜。病毒表达抗原蛋白技术与免疫方案的优化已被广泛用于靶向膜蛋白 (GPCR、离子通道和转运

蛋白) 抗体的研发[38,71-72]。用 VLP 表达抗原[图 2 (d)]免疫动物(鸡), 获得了依赖型 GLUT4 抗体, 用于研究 GLUT4 的生物学特性和糖尿病治疗[38]。

3.5. DNA 免疫

在宿主体内注射编码抗原蛋白的 DNA 载体, 使宿主既能表达膜蛋白, 又产生针对该蛋白的抗体[图 2 (e)]。基因枪包被 DNA 颗粒, 将其直接打入细胞并提呈给免疫细胞[73-74], 辅以佐剂增强免疫反应。 β 1-肾上腺素受体单抗通过互补 DNA (cDNA) 免疫联合注射类固醇激素合成急性调节蛋白 (StaR) 增强动物免疫反应[47]。大肠杆菌热休克蛋白作为 DNA 免疫的分子佐剂, 与内皮素受体蛋白 ETAR 共同发挥作用[17]。

4. 抗体研制

膜蛋白作为治疗性抗体的靶点, 可用于疾病诊断和治疗领域。其所面临的关键技术包括分析靶点蛋白的结构和功能、抗原制备方法, 以及抗体的分离和纯化。膜蛋白抗体的技术瓶颈阻碍了抗体从实验室走向临床应用。

抗体研发人员需具备发现和开发不同靶分子抗体的技术、多样化的抗体分离纯化策略、亲和力成熟手段、人源化技术、ADCC 增强技术等系统性优化抗体的工艺(图 3)。

开发先进的抗体研发技术有助于更高效地进行抗体分离, 抗体分离技术的进步也推动了开发难度较高的膜蛋白抗体的研发进展。

4.1. 源于动物和文库的抗体——稀有抗体的获得

抗原免疫动物是获得抗体的重要手段, 因此宿主动物的选择也是重要的一环[图 3 (a)]。野生型老鼠是一种常用动物, GPCR S1P₃ 是脂质信号分子。通过 S1P₃ 肽段免疫小鼠研制的 EDD 7H9 单抗对 S1P₃ 受体有拮抗作用[75], 能够抑制小鼠乳腺肿瘤生长及缓解败血症。前文提到的 Orai-1 是钙释放激活通道调节分子, 小鼠抗 Orai-1 单克隆抗体用于治疗自身免疫性疾病。合成 Orai-1 胞外环 (ECL2) 多肽免疫野生型 BALB/c 小鼠, 诱导小鼠产生靶向 Orai-1 的阻断抗体[37]。另外采用过表达 Orai-1 的转基因细胞免疫人源小鼠产生了靶向 Orai-1 ECL2 段的抗体[36]。

除了野生型 BALB/c 小鼠, 我们还会用到靶蛋白缺陷型小鼠。胰高血糖素样肽受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP1R) 是治疗 2 型糖尿病的有效靶点。GMA102

和 GMA105 单抗针对 GLP1R 位点, 纯化的 GLP1R 蛋白胞外段免疫 GLP1R 基因敲除小鼠[76], 随后将抗体的重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 序列连接载体, 转染真核细胞 HEK293-6E, 表达目标单抗并鉴定其功能[77]。目前两种单抗已经进入临床 I 期, 用于治疗 2 型糖尿病和肥胖症患者。

除了野生型小鼠和特定靶蛋白缺陷小鼠外, 我们还可以通过具有人免疫球蛋白基因的小鼠模型获得全人源抗体。这类基因工程小鼠在保留小鼠免疫系统的同时, 产生人源抗体[78]。Douthwaite 等[79]使用 VelocImmune 小鼠平台开发了抗甲酰胺受体 1 (FPR1) 的治疗性单克隆抗体, 并采用噬菌体文库完成抗体亲和力成熟。FPR1 单抗被用于治疗炎症相关疾病[80]。通过将纯化多肽注射到转基因小鼠体内, 对 GPCR 抗体 erenumab [25] 和 REMD-477 [81] 进行血浆分离并筛选高亲和力的人源抗体。Orai-1 人源抗体也来源于血浆纯化[36]。全人源抗体转基因小鼠平台 Medarex KM 被用于研制 C-X-C 基序趋化因子受体 4 (CXCR4) 抑制剂 ulocuplumab。该抑制剂正在进行临床 I 期试验, 用于治疗血液系统恶性肿瘤[35,82]。

研发难以获得的膜蛋白单抗, 往往需要选择非小鼠的特定的免疫动物。Biosceptre 公司的 nfP2X7 抗体通过了治疗基底细胞癌患者的 I 期临床试验, nfP2X7 是三磷酸腺苷 (ATP) 门控离子通道 P2X7 的一种异构体, nfP2X7 蛋白具有裸露在外的一段特殊肽段, 利用这段多肽结构免疫绵羊产生特异性抗体[12]。系统发育分析表明, 鸡与人源性较远, 因此免疫鸡分离候选抗体有着广阔的应用前景[49]。骆驼血清是纳米抗体的来源, CX3CR1 是一种参与 CD8⁺T 细胞募集的趋化因子受体, 与肾脏疾病相关。CX3CR1 抗体分离自骆驼[83]。克隆骆驼单抗可变区基因, 构建噬菌体抗体库, 以 Apelin 受体 APJ 为靶点, 在构建的抗体展示文库中分离 APJ 激动型抗体[40]。构建人源抗体以及合成抗体的噬菌体文库[图 3 (a)]是研制膜蛋白抗体的有效途径[38-39]。人源抗体文库从人供体分离 B 淋巴细胞, 再提取可变区序列。人工合成抗体文库则根据生物信息学的结构分析, 设计有效的抗体序列, 将扩增或人工合成的抗体 CDR 序列克隆到载体上, 转染表达宿主。

各种动物来源抗体都可以通过杂交瘤技术或 B 细胞克隆分离出具有特定功能的罕见单抗[图 3 (b)]。传统的杂交瘤技术将骨髓瘤细胞与分泌特异性抗体的 B 细胞融合, 筛选杂交瘤细胞分泌单抗, 识别特定抗原蛋白[84]。

4.2. 抗体形式的修饰

获得针对复杂膜蛋白的抗体后, 随之必须解决的问题

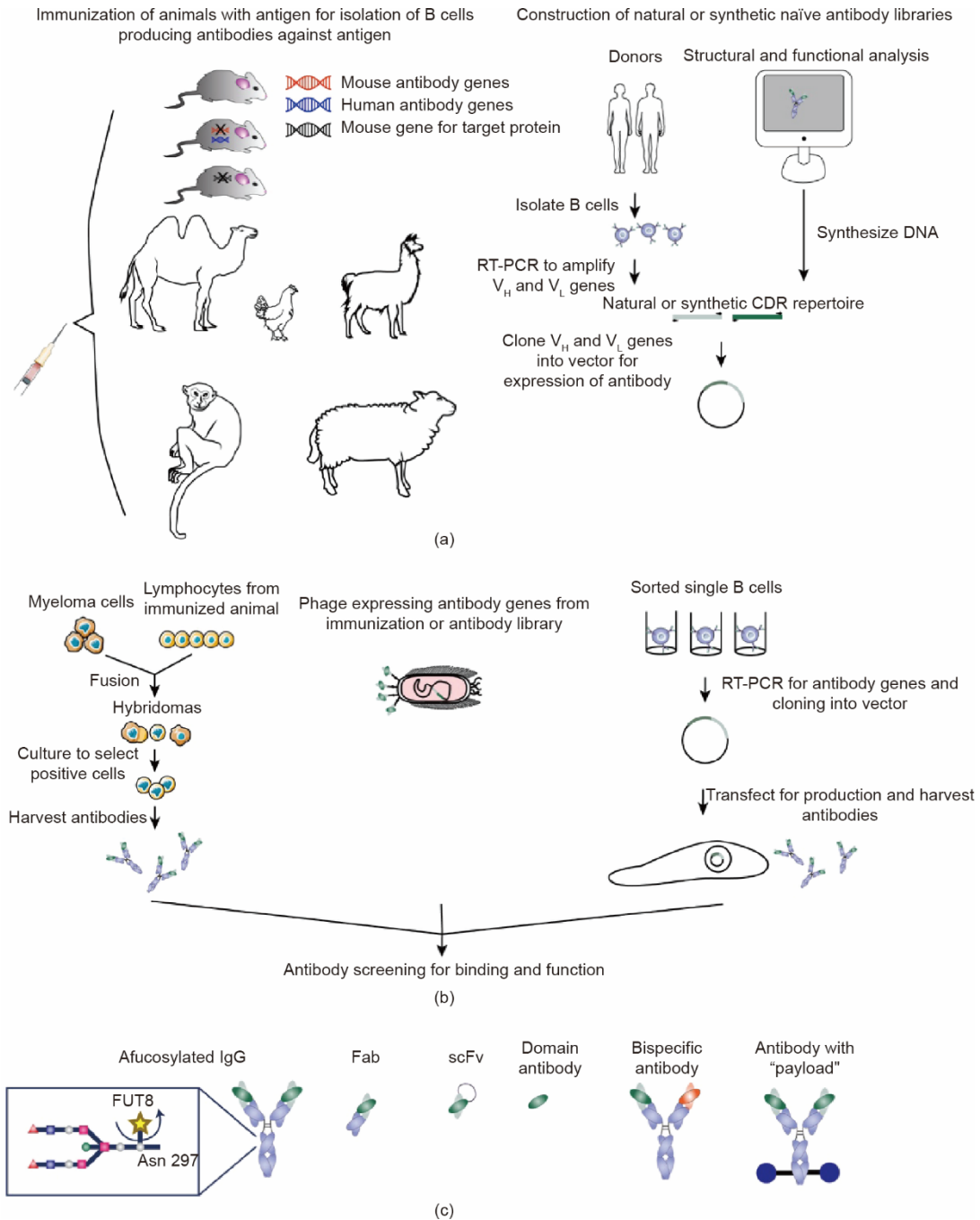


图3. 膜蛋白抗体的来源。(a) 多样化的候选抗体：免疫动物或构建天然或合成抗体文库。常用的动物有野生型小鼠、靶蛋白缺陷小鼠、人源化小鼠，特殊的免疫动物有绵羊、鸡、骆驼。人供体来源的单抗及其结构和功能分析构建天然或合成抗体库，克隆单抗的可变区序列并装入载体进行真核表达。(b) 第二阶段是通过筛选噬菌体文库、传统杂交瘤技术、B细胞克隆方法，从大量候选抗体中分离出最有望大规模生产的单抗。(c) 在候选抗体中进一步通过基因工程技术（去糖基化和构建不同形式的抗体）优化抗体功能，产生不同免疫球蛋白G (IgG) 亚型的单抗、抗原结合片段 (Fab) 抗体、单链抗体、结构域抗体、双特异性抗体以及抗体偶联药物、寡核苷酸或放射性元素。RT-PCR：逆转录聚合酶链反应；FUT8： α -1,6-岩藻糖基转移酶。

是治疗性抗体形式的精细化改造，以进一步提高疗效和特异性。图3 (c) 提供了一些精细化方法。例如，糖工程技术敲除 α -1,6-岩藻糖转移酶 (FUT8) 基因，去除了抗体Fc段的岩藻糖，去糖基化抗体对Fc受体具有更高的亲和力，增强了单抗药物的ADCC和CDC活性[14]。采用无核心岩藻糖单抗的POTELLIGENT®技术，在FUT8的敲

除细胞中表达的mogamulizumab单抗是第一款去糖基化修饰的抗体药物[14,85]。

抗体形式精细化的另一途径是，可以使用不同形式的抗体，研制针对复合物或复杂膜蛋白的抗体药物，如不同的IgG亚型、抗原结合片段 (Fab)、单链抗体片段 (ScFv) [57,71]、单域抗体[86]、纳米抗体[49]、双特异性

抗体[87]和偶联抗体[88] [图3 (c)]。

5. 总结

本文讨论了近年来抗体工程的技术革新以及靶向膜蛋白的治疗性抗体的研究进展。膜蛋白的抗原制备作为关键技术之一，是开发有功能的靶向抗体的前提条件。第二个关键技术涉及抗体优化和抗体表达平台。抗体与小分子和多肽药相比有其独特的优势，膜蛋白参与了各种正常生理过程，其功能异常与多种疾病相关。因此，重点研究膜蛋白分子的抗体开发，将为一类疾病诊断和治疗带来新的突破。治疗性抗体领域的新兴技术层出不穷，本文或许无法一一探讨，文中列举的技术方法是基于作者对治疗性抗体开发的理解和概括，希望对改进靶标抗原制备和抗体生产优化提供参考。另外，需要制定选择靶向膜蛋白的指南。筛选治疗靶点进行单抗研发是未来技术革新的重要方向。结合临床试验和亲和力测定，进而在体内外验证抗体活性。抗体的功能性取决于靶点的有效选择，抗原结构的微小变化影响了单抗的特异性识别。例如，为了抑制钙释放激活通道 Orai-1（其目的是缓解自身免疫性疾病），抗体的体外检测涉及钙离子流量、电流幅度、细胞周期分析、T细胞活化和细胞因子检测[36–37]。利用人源化移植抗宿主病（GVHD）小鼠模型在体内观察 Orai-1 抑制剂治疗 GVHD 的效果[37]。通过对膜蛋白结构进行分析，研制人 Apelin 受体激动剂抗体 JN241-9，进而测定环腺苷 3', 5'-单磷酸（cAMP）信号通路；通过病毒转导 β -arrestin（一种细胞质蛋白）报告细胞，构建细胞表面抗体展示文库[40]。针对 β 1 肾上腺素受体激动剂，需检测细胞内 cAMP 水平，采用酶互补法检测 β -arrestin 通路活性。利用 cAMP 水平变化评价大麻素受体 1（CB1）激动剂抗体的效价[89]。抗缓激肽 B2 受体（BKB2R）单克隆抗体的活性通过抗体诱导细胞中糖原合成酶激酶 3（GSK-3）磷酸化进行评估[90]。现有技术和理论进步已经使膜蛋白治疗性抗体在研发、纯化、筛选和改造方面有了长足的进步，相信在不久的将来会有更多靶向膜蛋白药物被用于疾病预防与临床治疗。

致谢

本研究得到美国得克萨斯州癌症预防与研究所（Cancer Prevention and Research Institute of Texas, USA）（PR150551、RP190561）、Welch 基金会（AU-0042-20030616）、国家自然科学基金（31700778、31320103918）和

江苏省医学重点学科（XK201135）项目资助。

Compliance with ethical guidelines

Georgina To'a Salazar, Ziyi Huang, Ningyan Zhang, Xue-Guang Zhang, and Zhiqiang An declare that they have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US [Internet]. Framingham: The Antibody Society; 2015 [cited 2021 Sep 16]. Available from: <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>.
- [2] Hutchings CJ, Koglin M, Olson WC, Marshall FH. Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(11):787–810.
- [3] Hutchings CJ, Colussi P, Clark TG. Ion channels as therapeutic antibody targets. *MAbs* 2019;11(2):265–96.
- [4] Dodd RB, Wilkinson T, Schofield DJ. Therapeutic monoclonal antibodies to complex membrane protein targets: antigen generation and antibody discovery strategies. *BioDrugs* 2018;32:339–55.
- [5] Douthwaite JA, Finch DK, Mustelin T, Wilkinson TC. Development of therapeutic antibodies to G protein-coupled receptors and ion channels: opportunities, challenges and their therapeutic potential in respiratory diseases. *Pharmacol Ther* 2017;169:113–23.
- [6] Wilkinson TC, Gardener MJ, Williams WA. Discovery of functional antibodies targeting ion channels. *J Biomol Screen* 2015;20(4):454–67.
- [7] Wulff H, Christophersen P, Colussi P, Chandy KG, Yarov-Yarovoy V. Antibodies and venom peptides: new modalities for ion channels. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18(5):339–57.
- [8] Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(1):19–34.
- [9] Oprea TI, Bologa CG, Brunak S, Campbell A, Gan GN, Gaulton A, et al. Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17(5):317–32.
- [10] Kasamon YL, Chen H, de Claro RA, Nie L, Ye J, Blumenthal GM, et al. FDA approval summary: mogamulizumab-kpkc for mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Clin Cancer Res* 2019;25(24):7275–80.
- [11] Shreiber AM. Erenumab (Aimovig) for migraine prophylaxis in adults. *Am Fam Physician* 2019;99(12):781–2.
- [12] Gilbert SM, Gidley Baird A, Glazer S, Barden JA, Glazer A, Teh LC, et al. A phase I clinical trial demonstrates that nfp2X7-targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2017;177(1):117–24.
- [13] Biswas K, Nixey TE, Murray JK, Falsey JR, Yin L, Liu H, et al. Engineering antibody reactivity for efficient derivatization to generate NaV1.7 inhibitory GpTx-1 peptide-antibody conjugates. *ACS Chem Biol* 2017;12(9):2427–35.
- [14] Beck A, Reichert JM. Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering. *MAbs* 2012;4(4):419–25.
- [15] Weierstall U, James D, Wang C, White TA, Wang D, Liu W, et al. Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat Commun* 2014;5(1):3309.
- [16] Boshuizen RS, Marsden C, Turkstra J, Rossant CJ, Sloopstra J, Copley C, et al. A combination of *in vitro* techniques for efficient discovery of functional monoclonal antibodies against human CXC chemokine receptor-2 (CXCR2). *MAbs* 2014;6(6):1415–24.
- [17] Fujimoto A, Kosaka N, Hasegawa H, Suzuki H, Sugano S, Chiba J. Enhancement of antibody responses to native G protein-coupled receptors using *E. coli* GroEL as a molecular adjuvant in DNA immunization. *J Immunol Methods* 2012;375(1–2):243–51.
- [18] Ito A, Ishida T, Utsunomiya A, Sato F, Mori F, Yano H, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exerts potent ADCC against primary ATLL cells mediated by autologous human immune cells in NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ^{null}

- mice *in vivo*. *J Immunol* 2009;183(7):4782–91.
- [19] Niwa R, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Shinkawa T, Uchida K, Nakamura K, et al. Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 2004;64(6):2127–33.
- [20] Ishii T, Ishida T, Utsunomiya A, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, et al. Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2010;16(5):1520–31.
- [21] Murga JD, Franti M, Pevear DC, Maddon PJ, Olson WC. Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(10):3289–96.
- [22] Olson WC, Rabut GEE, Nagashima KA, Tran DNH, Anselma DJ, Monard SP, et al. Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5. *J Virol* 1999;73(5):4145–55.
- [23] Trkola A, Ketas TJ, Nagashima KA, Zhao L, Cilliers T, Morris L, et al. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* 2001;75(2):579–88.
- [24] Shearer WT, DeVille JG, Samson PM, Moye Jr JH, Fletcher CV, Church JA, et al. Susceptibility of pediatric HIV-1 isolates to recombinant CD4-IgG2 (PRO 542) and humanized mAb to the chemokine receptor CCR5 (PRO 140). *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(2):518–21.
- [25] Shi L, Lehto SG, Zhu DX, Sun H, Zhang J, Smith BP, et al. Pharmacologic characterization of AMG 334, a potent and selective human monoclonal antibody against the calcitonin gene-related peptide receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2016;356(1):223–31.
- [26] Xu C, Shi L, Rao S, King C, Sun H, Zhu D, et al. EHMTI-0315. AMG 334, the first potent and selective human monoclonal antibody antagonist against the CGRP receptor. *J Headache Pain* 2014;15(S1):G43.
- [27] Amgen. Study to evaluate the efficacy and safety of Erenumab (AMG 334) in migraine prevention [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2019 Oct 9; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02456740>.
- [28] Amgen. Study to evaluate the efficacy and safety of Erenumab (AMG 334) compared to placebo in migraine prevention [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2019 Dec 11; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02483585>.
- [29] Amgen. A study to evaluate the efficacy and safety of Erenumab (AMG 334) in chronic migraine prevention [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2019 Dec 17; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02066415>.
- [30] PharmaInnate. IPH5401 (Anti-C5aR) in combination with Durvalumab in patients with advanced solid tumors [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2019 Dec 23; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03665129>.
- [31] LimitedBionomics. A phase I, dose escalation study of BNC101 in patients with metastatic colorectal cancer [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2019 Jan 16; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02726334>.
- [32] Merus NV. A study of bispecific antibody MCLA-158 in patients with advanced solid tumors [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2018 Aug 13; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03526835>.
- [33] Beijing Dongfang Biotech Co., Ltd. A study of JY09 in Chinese healthy subjects [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2016 Dec 7; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02971722>.
- [34] Bird Rock Bio, Inc. Study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics and exploratory efficacy of Nimacimab in patients with diabetic gastroparesis [Internet]. Bethesda: US National Library of Medicine; [updated 2020 Jan 18; cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03900325>.
- [35] Kashyap MK, Jones H, Sabbatini P, Kipps TJ, Shelat SG, Choi MY, et al. Ulocuplumab (BMS-936564/MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget* 2015;7(3):2809–22.
- [36] Lin FF, Elliott R, Colombero A, Gaida K, Kelley L, Moksa A, et al. Generation and characterization of fully human monoclonal antibodies against human Orai1 for autoimmune disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;345(2):225–38.
- [37] Cox JH, Hussell S, Sondergaard H, Roepstorff K, Bui JV, Deer JR, et al. Antibody-mediated targeting of the Orai1 calcium channel inhibits T cell function. *PLoS ONE* 2013;8(12):e82944.
- [38] Tucker DF, Sullivan JT, Mattia KA, Fisher CR, Barnes T, Mabila MN, et al. Isolation of state-dependent monoclonal antibodies against the 12-transmembrane domain glucose transporter 4 using virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(22):E4990–9.
- [39] Nam DH, Rodriguez C, Remacle AG, Strongin AY, Ge X. Active-site MMP-selective antibody inhibitors discovered from convex paratope synthetic libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(52):14970–5.
- [40] Ma Y, Ding Y, Song X, Ma X, Li X, Zhang N, et al. Structure-guided discovery of a single-domain antibody agonist against human apelin receptor. *Sci Adv* 2020;6(3):eaax7379.
- [41] Gupta A, Decailot FM, Gomes I, Tkalych O, Heimann AS, Ferro ES, et al. Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2007;282(8):5116–24.
- [42] Ring AM, Manglik A, Kruse AC, Enos MD, Weis WI, Garcia KC, et al. Adrenaline-activated structure of β_2 -adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature* 2013;502(7472):575–9.
- [43] Webb DR, Handel TM, Kretz-Rommel A, Stevens RC. Opportunities for functional selectivity in GPCR antibodies. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(2): 147–52.
- [44] GPCR [Internet]. Cambridge: Nature Education; c2014 [cited 2019 Dec 16]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471/>.
- [45] Ion channel [Internet]. Cambridge: Nature Education; c2014 [cited 2019 Dec 16]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/ion-channel-14047658/>.
- [46] Ohta S, Sakaguchi S, Kobayashi Y, Mizuno N, Tago K, Itoh H. Agonistic antibodies reveal the function of GPR56 in human glioma U87-MG cells. *Biol Pharm Bull* 2015;38(4):594–600.
- [47] Hutchings CJ, Cseke G, Osborne G, Woolard J, Zhukov A, Koglin M, et al. Monoclonal anti- β_1 -adrenergic receptor antibodies activate G protein signaling in the absence of beta-arrestin recruitment. *MAbs* 2014;6(1):246–61.
- [48] Ullmer C, Zoffmann S, Bohrmann B, Matile H, Lindemann L, Flor P, et al. Functional monoclonal antibody acts as a biased agonist by inducing internalization of metabotropic glutamate receptor 7. *Br J Pharmacol* 2012;167(7):1448–66.
- [49] Konitzer JD, Pramanick S, Pan Q, Augustin R, Bandholtz S, Harriman W, et al. Generation of a highly diverse panel of antagonistic chicken monoclonal antibodies against the GIP receptor. *MAbs* 2017;9(3):536–49.
- [50] FDA approves treatment for two rare types of non-Hodgkin lymphoma [Internet]. Silver Spring: US Food and Drug Administration; 2018 Aug 18 [cited 2020 Feb 20]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-treatment-two-rare-types-non-hodgkin-lymphoma>.
- [51] Ni X, Jorgensen JL, Goswami M, Challagundla P, Decker WK, Kim YH, et al. Reduction of regulatory T cells by Mogamulizumab, a defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 antibody, in patients with aggressive/refractory mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Clin Cancer Res* 2015;21(2):274–85.
- [52] Ogura M, Ishida T, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, et al. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2014; 32(11): 1157–63.
- [53] Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev* 2009;231(1):59–87.
- [54] Geoghegan JC, Diedrich G, Lu X, Rosenthal K, Sachsenmeier KF, Wu H, et al. Inhibition of CD73 AMP hydrolysis by a therapeutic antibody with a dual, noncompetitive mechanism of action. *MAbs* 2016;8(3):454–67.
- [55] Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. *Mol Pharmacol* 2003;63(6):1256–72.
- [56] Hu GM, Mai TL, Chen CM. Visualizing the GPCR Network: classification and evolution. *Sci Rep* 2017;7(1):15495.
- [57] Zhang Y, Pool C, Sadler K, Yan HP, Edl J, Wang X, et al. Selection of active ScFv to G-protein-coupled receptor CCR5 using surface antigen-mimicking peptides. *Biochemistry* 2004;43(39):12575–84.
- [58] Buell G, Chessell IP, Michel AD, Collo G, Salazzo M, Herren S, et al. Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood* 1998;92(10):3521–8.
- [59] Qiang M, Dong X, Zha Z, Zuo XK, Song XL, Zhao L, et al. Selection of an ASIC1a-blocking combinatorial antibody that protects cells from ischemic death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(32):E7469–77.
- [60] Mettler Izquierdo S, Varela S, Park M, Collarini EJ, Lu D, Pramanick S, et al.

- High-efficiency antibody discovery achieved with multiplexed microscopy. *Microscopy* 2016;65(4):341–52.
- [61] MacDonald L, Gao M, Morra M, Alessandri-Haber NM, LaCroix-Fralish ML, inventors; PharmaceuticalsRegeneron, Inc., assignee. Anti-ASIC1 antibodies and uses thereof. United States patent US 9371383B2. 2016 Jun 21.
- [62] Stortelers C, Pinto-Espinoza C, Van Hoorick D, Koch-Nolte F. Modulating ion channel function with antibodies and nanobodies. *Curr Opin Immunol* 2018;52:18–26.
- [63] Li LH, Shivakumar R, Feller S, Allen C, Weiss JM, Dzekunov S, et al. Highly efficient, large volume flow electroporation. *Technol Cancer Res Treat* 2002;1(5):343–9.
- [64] Sasaki Y, Kosaka H, Usami K, Toki H, Kawai H, Shiraiishi N, et al. Establishment of a novel monoclonal antibody against LGR5. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):498–502.
- [65] Danquah W, Rissiek B, Pinto C, Arnau SP, Amadi M, Iacenda D, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med* 2016;8(366):366ra162.
- [66] Robertson N, Zajayeri A, Errey J, Baig A, Hurrell E, Zhukov A, et al. The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery. *Neuropharmacology* 2011;60(1):36–44.
- [67] Tehan BG, Christopher JA. The use of conformationally thermostabilised GPCRs in drug discovery: application to fragment, structure and biophysical techniques. *Curr Opin Pharmacol* 2016;30:8–13.
- [68] Denisov IG, Sligar SG. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2016;23(6):481–6.
- [69] Lindhoud S, Carvalho V, Pronk JW, Aubin-Tam ME. SMA-SH: modified styrene-maleic acid copolymer for functionalization of lipid nanodiscs. *Biomacromolecules* 2016;17(4):1516–22.
- [70] Schmidt V, Sturgis JN. Modifying styrene-maleic acid co-polymer for studying lipid nanodiscs. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018;1860(3):777–83.
- [71] Van der Woning B, de Boeck G, Blanchetot C, Bobkov V, Klarenbeek A, Saunders M, et al. DNA immunization combined with scFv phage display identifies antagonistic GCGR specific antibodies and reveals new epitopes on the small extracellular loops. *MAbs* 2016;8(6):1126–35.
- [72] Frauenfeld J, Loving R, Armache JP, Sonnen AF, Guettou F, Moberg P, et al. A saposin-lipoprotein nanoparticle system for membrane proteins. *Nat Methods* 2016;13(4):345–51.
- [73] Bergmann-Leitner ES, Leitner WW. Vaccination using gene-gun technolog. In: Vaughan A, editor. *Malaria vaccines: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2015. p. 289–302.
- [74] Hansen DT, Craciunescu FM, Fromme P, Johnston SA, Sykes KF. Generation of high-specificity antibodies against membrane proteins using DNA–gold micronanoplexes for gene gun immunization. *Curr Protoc Protein Sci* 2018;91(1):29.20.1–22.
- [75] Harris GL, Creason MB, Brulte GB, Herr DR. *In vitro* and *in vivo* antagonism of a G protein-coupled receptor (SIP₃) with a novel blocking monoclonal antibody. *PLoS ONE* 2012;7(4):1–8.
- [76] Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Orskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology* 2014;155(4):1280–90.
- [77] Hennen S, Kodra JT, Soroka V, Krogh BO, Wu X, Kaastrup P, et al. Structural insight into antibody-mediated antagonism of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Sci Rep* 2016;6(1):26236.
- [78] Murphy AJ, Macdonald LE, Stevens S, Karow M, Dore AT, Pobursky K, et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(14):5153–8.
- [79] Douthwaite JA, Sridharan S, Huntington C, Hammersley J, Marwood R, Hakulinen JK, et al. Affinity maturation of a novel antagonistic human monoclonal antibody with a long VH CDR3 targeting the Class A GPCR formyl-peptide receptor 1. *MAbs* 2015;7(1):152–66.
- [80] Dufton N, Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formylpeptide receptor agonists. *Pharmacol Ther* 2010;127(2):175–88.
- [81] Yan H, Gu W, Yang J, Bi V, Shen Y, Lee E, et al. Fully human monoclonal antibodies antagonizing the glucagon receptor improve glucose homeostasis in mice and monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329(1):102–11.
- [82] Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B, Chen S, Pan C, Chong C, et al. BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis *in vitro* and shows antitumor activity *in vivo* in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2013;19(2):357–66.
- [83] Low S, Wu H, Jerath K, Tibolla A, Fogal B, Conrad R, et al. VHH antibody targeting the chemokine receptor CX3CR1 inhibits progression of atherosclerosis. *MAbs* 2020;12(1):1709322.
- [84] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495–7.
- [85] Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment. *Drug Des Devel Ther* 2009;3:7–16.
- [86] Jahnichen S, Blanchetot C, Maussang D, Gonzalez-Pajuelo M, Chow KY, Bosch L, et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(47):20565–70.
- [87] Robert R, Juglair L, Lim EX, Ang C, Wang CJH, Ebert G, et al. A fully humanized IgG-like bispecific antibody for effective dual targeting of CXCR3 and CCR6. *PLoS ONE* 2017;12(9):e0184278.
- [88] Gong X, Azhdarinia A, Ghosh SC, Xiong W, An Z, Liu Q, et al. LGR5-targeted antibody-drug conjugate eradicates gastrointestinal tumors and prevents recurrence. *Mol Cancer Ther* 2016;15(7):1580–90.
- [89] Kretz-Rommel A, Shi L, Ferrini R, Yang T, Xu F, Campion B, inventors; Inc. Ruiyi, assignee. Antibodies that bind human cannabinoid 1 (CB1) receptor. United States patent US 2015/023108. 2015 Oct 1.
- [90] Williams MS, Charles ML, inventors; IncDiaMedica, Williams MS, Charles ML, assignees. Anti-bradykinin B2 receptor (BKB2R) monoclonal antibody. United States patent US 2011/062967 2012 Jun 7.