



موجودی قدیمی با کاربردهای جدید:

بررسی نانوبادی‌های شتری در درمان و تشخیص بیماری‌ها

حمید باخرد^۱، مجتبی غنی‌زاده^۲

۱. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲. دانشجوی داروسازی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

شترسانان در سرمشان نوع خاصی از ایزوتیپ IgG را دارا می‌باشند که به علت نداشتن زنجیره سبک آنتی‌بادی زنجیره سنگین HCAB نام‌گذاری شده‌اند. بخش متغیر این نوع آنتی‌بادی (VHH)، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که منجر به کاربرد وسیع آن در بیوتکنولوژی شده‌است. برخی از مزایای نانوبادی‌ها قابلیت تولید آسان و انبوه آن‌ها در میکروارگانیسم‌ها و توانایی استفاده از آن‌ها در سیستم‌هایی از قبیل نمایش فاژی، مخمری یا ریبوزومی می‌باشد. به علت خصوصیات منحصر به فرد آن‌ها از جمله اندازه حلالیت، پایداری درونی، آسانی اتصال چند نانوبادی به یکدیگر، قابلیت شناسایی اپی‌توپ‌های نامعمول و یا مخفی، توانایی اتصال به حفرات و یا سایت‌های فعال آنزیمی، سهولت و سرعت در کشف دارو و در نهایت، سهولت در تولید از دیگر شکل‌های آنتی‌بادی‌های متداول متمایز گردیده و باعث برتری محسوس آن‌ها در کاربردهای بیوتکنولوژی و پزشکی شده است.

■ ساختار آنتی‌بادی‌ها

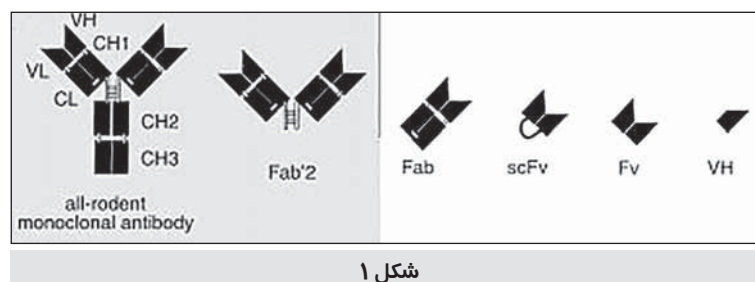
آنتی‌بادی مولکول گلیکوپروتئینی است که از دو زنجیره سنگین و دو زنجیره سبک ساخته شده است که از طریق پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. هر زنجیره از دو بخش متغیر (V) و ثابت (C) تشکیل شده‌است. هر زنجیره سبک از یک بخش ثابت و یک بخش متغیر تشکیل شده است و زنجیره سنگین از یک بخش متغیر و بسته به کلاس آنتی‌بادی، از سه الی چهار بخش ثابت تشکیل شده است. بخش متغیر از هر رشته شامل چهار منطقه ثابت (FR)^۱ و سه منطقه بسیار متغیر (CDR)^۲ تشکیل شده است. مناطق متغیر HV و LV در سمت N-ترمینال، به آنتی‌ژن متصل می‌شوند و تعیین‌کننده ویژگی، تنوع و تمایل اتصال به آنتی‌ژن هستند (۱،۲). IgG فراوان‌ترین ایمنوگلوبولین در خون انسان می‌باشد و به همین دلیل از این ایزوتیپ جهت ساخت آنتی‌بادی نوترکیب در صنعت داروسازی استفاده می‌شود. در سال ۱۹۸۸ تکنیک مهندسی آنتی‌بادی و بیان قطعات آنتی‌بادی در E.coli به‌وسیله skerra و همکارانش ابداع شد. پس از مدتی تولید قطعات آنتی‌بادی در میکروارگانیسم‌ها به علت قیمت کمتر

به آنتی‌بادی کامل ترجیح داده شد. از جمله قطعات آنتی‌بادی می‌توان VH، Fv، scFv، Fab، Fab2، dsFv را نام برد (۳).

Fv شامل VH و VL بوده و فاقد هر نوع پیوند کووالانسی می‌باشد و بنابراین، برای مدت بسیار کوتاهی پایدار است. scFv^۳ قطعات VH و VL بوده که از طریق لینک پپتیدی به هم متصل شده‌اند. dsFv^۴ قطعات VH و VL بوده که از طریق باند دی‌سولفیدی به هم متصل می‌شوند. این فرم در سرم نسبت به حرارت پایدارتر از scFv می‌باشد. Fab شامل VH و CH1، از رشته سنگین و CL و VL از رشته سبک است که بین CH1 و CL پیوند دی‌سولفیدی وجود دارد. پایدارتر از scFv می‌باشد و قادر به دیمریزه شدن نیست به همین علت تعیین تمایل آن راحت‌تر است (۴،۵).

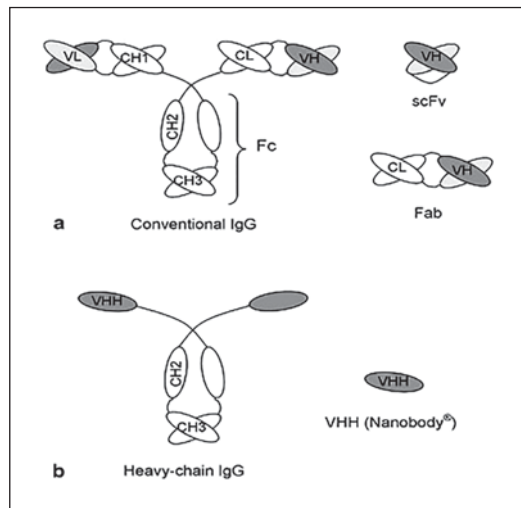
■ آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری (نانوبادی)

آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین در اواخر دهه ۱۹۸۰ توسط پروفیسور ریموند هامرز^۵ در دانشگاه وریج^۶ بروسلاز خون شتر جدا شدند. آن‌ها این نوع آنتی‌بادی را به علت نداشتن زنجیره سبک



شکل ۱

شکل ۲ - نمایش شماتیک آنتی‌بادی‌های معمول (a)، آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (b) و قطعات مشتق شده از آنتی‌بادی‌ها. قسمت‌های متغیر زنجیره سنگین (VH) و سبک (VL) مشتق شده از آنتی‌بادی‌ها به رنگ خاکستری تیره و روشن نشان داده شده‌اند. آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین همان‌طور که در شکل نشان داده است فاقد زنجیره سبک و قسمت CH1 می‌باشند.



و زنجیره سنگین به نمایش گذاشته شده است. اگرچه آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین در ماهی‌های غضروفی نیز شناسایی شده‌اند (۸) ولی اغلب تحقیقات صورت گرفته در زمینه بیوتکنولوژی به دلیل سهولت کار و روند ایمن‌سازی، بر روی آنتی‌بادی‌های برگرفته شده از شترسانان صورت پذیرفته است.

■ ویژگی‌های VHH (نانوبادی)

در آنتی‌بادی زنجیره سنگین، دومین متصل شونده به آنتی‌ژن بر خلاف آنتی‌بادی معمولی که ترکیبی از دو دومین VL و VH می‌باشد، تنها از یک دومین تشکیل شده‌اند که VHH نامیده می‌شود (۹). ویژگی قابل توجه VHH جایگزین شدن چهار اسید آمینه در منطقه FR2 است (۱۰). این اسید آمینه‌ها در ساختار دومین VH آنتی‌بادی‌های کلاسیک حفاظت شده می‌باشند و به‌طور معمول با سطح آب گریز

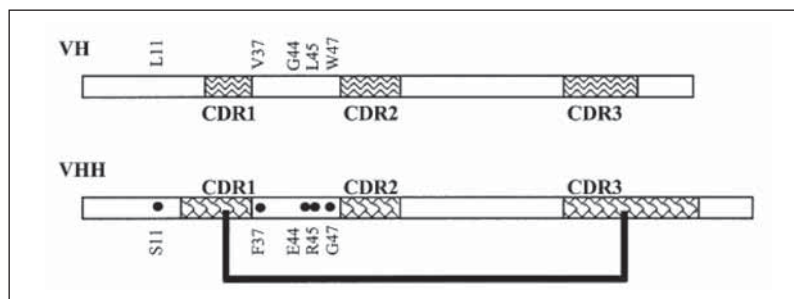
آنتی‌بادی زنجیره سنگین (HCAb) نام‌گذاری کردند (۶).

آنتی‌بادی زنجیره سنگین دارای ساختمان متفاوتی نسبت به آنتی‌بادی معمولی می‌باشد. آنتی‌بادی معمولی از دو زنجیره سنگین و دو زنجیره سبک تشکیل شده است که از طریق پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. منطقه اتصال به آنتی‌ژن شامل دومین VL و VH است. اما آنتی‌بادی زنجیره سنگین فاقد زنجیره سبک و دومین CH1 می‌باشد. شترها قادر به تولید آنتی‌بادی‌هایی هستند که با وجود نداشتن زنجیره سبک دارای عملکرد بوده و انتهای آمین آن‌ها خاصیت اتصال به آنتی‌ژن را کاملاً حفظ کرده است. چنین بخش‌های تک دومین آنتی‌بادی که با نام VHH و یا نانوبادی شناخته می‌شوند دارای کاربردهای فراوانی در بخش بیوتکنولوژی می‌باشند (۷). در شکل (۲) تفاوت آنتی‌بادی معمولی

است، از جمله این که تاکنون در میزبان‌های مختلفی مثل *E. coli*، ساکارومایسس سرویزیه لاکتوباسیلوس و سایر میکروارگانیسم‌ها بیان شده است (۱۷). دارای حلالیت و پایداری بالایی می‌باشد (۱۸) در مقایسه با آنتی‌بادی‌های منوکلونال دارای تمایل قابل مقایسه‌ای هستند و قادر می‌باشند به مولکول‌های کوچک و هاپتن متصل شوند (۱۹). در مقایسه با آنتی‌بادی کلاسیک، VHH به pH اسیدی، قلیایی، دمای بالا، هضم به وسیله پروتئاز مقاومت بیشتری نشان می‌دهند و به همین دلیل قادر می‌باشند از معده عبور کنند و در روده باقی بمانند. بنابراین، می‌توان VHH را به صورت خوراکی مصرف کرد (۱۹).

از آن جا که VHH با دومین VH انسانی همولوژی بالایی است تاکنون در مطالعات بالینی و پیش بالینی که روی نانوبادی‌ها صورت گرفته هیچ ایمونوژنیسیتی دیده نشده است (۱۹). VHH به علت اندازه کوچکش دارای کاربردهایی مثل نفوذ

دومین VL واکنش می‌دهند. اگرچه بیشتر خاصیت آب دوستی VHH به دلیل جایگزینی اسید آمینه‌های ذکر شده می‌باشد، برخی اسید آمینه‌های دیگر که در ساختارهای VH به طور معمول با قسمت CDR1 در ارتباط هستند، نیز تغییر یافته و با اسید آمینه‌های آب دوست جایگزین می‌شوند (۱۱، ۱۲، ۱۳). همچنین قسمت‌های CDR آنتی‌بادی‌های VHH نیز دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند. قسمت انتهایی CDR1 این آنتی‌بادی‌ها دارای تنوع و تغییرپذیری بیشتری می‌باشد (۱۴، ۱۵) و همچنین در بیشتر آنتی‌بادی‌های شتری VHH دارای CDR3 بلندتری می‌باشد که توسط یک باند دی‌سولفیدی با سیستمین موجود در CDR1 یا FR2 پایدار می‌شود (۱۲) (شکل ۳). با توجه به مطالعات ساختاری، VHH دوکی شکل، دارای قطر ۲/۵ nm و طول ۴ nm می‌باشد که به همین دلیل نانوبادی نیز نام‌گذاری شده‌اند (۱۶). VHH به دلایل گفته شده دارای مزایای متعددی



شکل ۳- تفاوت‌های بین VH و VHH بر پایه مقایسه توالی cDNA. موقعیت‌های CDRها بین قسمت‌های سفید رنگ Framework نشان داده شده است. قسمت‌های CDR1 و CDR3 در ژن‌های VHH بزرگ‌تر از همان قسمت‌ها در ژن VH هستند و معمولاً توسط یک پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل می‌شوند (پیوند توسط یک خط نشان داده شده است). موقعیت و نام اسید آمینه‌های تعویض شده در قسمت‌های Framework-1 و Framework-2 در VHH در شکل نشان داده شده است.

گرفته می‌شوند و یا قادر هستند واکنش‌های مولکولی خاصی را متوقف کنند. به عنوان مثال بیماری خواب با موفقیت توسط VHH‌های Apolipoprotein L-1 پیوند داده شده به آنزیم که قادر به شناسایی انگل تریپانوزوم می‌باشند درمان شده است. این آنتی‌بادی‌ها قادر می‌باشند با نفوذ به درون بافت‌ها این انگل را شناسایی کرده و سبب لیز آن شوند (۲۶). در زمینه‌های سرطان نیز VHH‌های تولید شده علیه Carcinoembryonic antigen (CEA) که به آنزیم بتا - لاکتام متصل شده‌اند، می‌توانند این آنزیم را به سطح سلول‌های سرطانی حمل کرده و سبب تبدیل پیش‌داروی تزریق شده غیرسمی، به محصول سمی شده که در میکرومحیط سلول‌های سرطانی باقی می‌ماند و سبب مرگ آن‌ها می‌شود (۲۷).

بسیاری از VHH‌های دیگر جهت درمان سرطان‌ها و یا بیماری‌های التهابی تولید شده‌اند که پایه عملکرد آن‌ها مهار هدفمند واکنش‌های مولکولی می‌باشد. آنتی‌بادی‌های VHH تولید شده علیه گیرنده EGF می‌تواند مانع اتصال فاکتور رشد اپیدرمال به این گیرنده شده و از رشد تومورها جلوگیری کند (۲۸، ۲۹). همچنین VHH‌های تولید شده علیه $TNF\alpha$ می‌توانند جهت درمان بیماری روماتوئید آرتریت و بیماری کورن^۷ استفاده شوند (۳۰).

■ کاربردهای VHH در زمینه تشخیص بیماری‌ها

آنتی‌بادی‌های VHH در زمینه‌های تشخیصی نیز کاربردهای فراوانی دارند. در آزمایش‌های

به بافت، باقی ماندن در بافت هدف، عبور از منافذ غشایی اندامک‌های درون سلولی و رسیدن به هدف درون اندامک می‌باشد (۲۱، ۲۰). یکی از کاربردهای آنتی‌بادی نوترکیب، درمان سرطان است. آنتی‌بادی باید بر موانعی چون کلیرانس سیستمیک و عبور از سیستم عروقی غلبه کند تا به جایگاه‌های اتصال روی سلول سرطانی برسد. به علاوه دو متغیر تمایل یا آویدیتی برای آنتی‌ژن سطحی تومور و اندازه مولکولی، روی نفوذ به تومور تاثیر می‌گذارد. در تومور، انتقال ماکرومولکول تحت تاثیر انتشار است. سرعت انتشار تابعی از اندازه و تقریباً به‌طور معکوس با وزن مولکولی متناسب است. بنابراین انتظار می‌رود که نانوبادی تک ظرفیتی، ده مرتبه سریع‌تر از IgG کامل، تومور را اشباع کند (۱۹).

■ کاربردهای VHH در زمینه‌های درمانی و بیوتکنولوژی

اگرچه VHH جهت استفاده در محصولات نیازمند پایداری بالا می‌باشند، نظیر استفاده در شامپوها جهت پیشگیری از شوره سر، استفاده در ستون‌های تخلیص براساس تمایل ایمنی (۲۳، ۲۲) و یا استفاده به عنوان بیوسنسور (۲۴) کاربرد فراوانی دارند، ولی این آنتی‌بادی‌ها در زمینه درمانی دارای پتانسیل فراوانی هستند. اکنون VHH‌های متعددی در حال بررسی جهت استفاده در سرطان‌ها (۲۵)، و یا بیماری‌های عفونی، التهابی و یا عصبی می‌باشند (جدول ۱).

اکنون بسیاری از بیماری‌ها با موفقیت توسط VHH‌ها درمان شده‌اند، چنین آنتی‌بادی‌هایی معمولاً به عنوان اهدافی جهت حمل آنزیم‌های سمی به کار

جدول ۱

منبع	عامل بیماری	آنتی‌ژن هدف	VHH ظرفیت	متصل شده به	بیماری
Baral et al. 2006	Trypanosomes	VSG oligomannose	Monovalent	Apolipoprotein L-I	بیماری خواب
Van der Vaart et al. 2006	Rotavirus	ناشناخته	Monovalent	---	اسهال نوزاد
Pant et al. 2006	Rotavirus	ناشناخته	Monovalent	پروتئین سطح سلولی لاکتوباسیل	اسهال نوزاد
Harmsen et al. 2006	E. coli	F4 fimbriae	Monovalent	---	اسهال خوک
Kruger et al. 2006	S. mutans	I/II adhesion	Monovalent	---	پوسیدگی دندان
Harmsen et al. 2007	FMD virus	VP1	Monovalent	پلی اتیلن گلیکول	FMD
El khattabi et al. 2006	N. meningitidis	LPS	Monovalent	---	عفونت خون
Cortez-Retamozo et al. 2004	---	CEA	Monovalent	بتا لاکتاماز	سرطان
Roovers et al. 2007	---	EGF receptor	Bivalent	VHH ضد آلبومین	سرطان
Coppieters et al. 2006	---	TNF α	Bivalent	VHH ضد آلبومین	آرتریت
Muruganandam et al. 2002	---	α (2,3)-Sialoglycoprotein	Monovalent	---	اختلال‌های مغزی
Gueorguieva et al. 2006	---	Bax	Monovalent	---	بیماری‌های عصبی

داد (۳۳). اندازه کوچک VHH‌ها سبب استفاده‌های متعددی از آن‌ها در زمینه‌های بیوتکنولوژی شده است. با استفاده از VHH‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های درون سلولی و اتصال آن‌ها به مواد فلورسانت (Chromobodies) می‌توان پروتئین‌های درون سلول زنده را هدف قرار داد و حرکت آن‌ها و یا تغییرات پس از ترجمه‌ای را در آن‌ها را مورد مطالعه قرار داد. چنین Chromobody‌هایی می‌توانند آنتی‌ژن‌ها در قسمت‌های مختلف سلولی در طول فاز S و میتوز شناسایی کرده و حرکات آن‌ها را دنبال کنند (۳۴).

■ داروهای بر پایه نانوبادی

در سال ۲۰۰۲ شرکت Ablynx در بلژیک تاسیس شد که هدف آن تولید نانوبادی‌های درمانی علیه بیماری‌های مختلف بود. این شرکت با همکاری شرکت‌های داروسازی معتبر دنیا محصولات مختلف دارویی بر پایه نانوبادی‌ها تولید کرده است که این محصولات در حال طی کردن فازهای مختلف برای دریافت مجوز FDA هستند (۳۵). جدول (۲) آخرین وضعیت محصولات این شرکت برای گرفتن مجوزهای لازم را نشان می‌دهد. اسامی تجاری برخی از داروهای این شرکت به شرح زیر می‌باشد.

- ALX-0061 (anti-IL-6R)
- ALX-0141 (anti-RANKL)
- ALX-0171 (anti-RSV)
- ALX-0761 (anti-IL-17A & F)
- Caplacizumab (anti-vWF)
- Ozoralizumab (anti-TNF)

تشخیص سرطان، VHH‌ها دارای اهمیت به‌سزایی می‌باشند. به‌عنوان مثال، جهت تشخیص مراحل ابتدایی سرطان پروستات از سنجش میزان آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA)^۱ در سرم استفاده می‌شود. ولی ایزوفرم‌های متعددی از این آنتی‌ژن در سرم وجود دارد که برخی از آن‌ها ارتباط نزدیک‌تری با اختلال‌های پروستات دارند. بدین منظور VHH‌هایی طراحی و تولید شدند که می‌توانند بین ایزوفرم‌های مختلف آنتی‌ژن اختصاصی پروستات تفاوت قایل شوند. این آنتی‌بادی‌ها قادر به القا و یا تشخیص تغییرات ساختاری مشخصی در ایزوفرم‌های مختلف این آنتی‌ژن می‌باشند. چنین ویژگی می‌تواند در تشخیص مراحل مختلف سرطان پروستات به کار گرفته شود (۳۱). همچنین با استفاده از VHH‌های تولید شده علیه گیرنده EGF و به‌کارگیری تکنیک‌های عکس‌برداری فلورسانت می‌توان سلول‌های دارای افزایش تولید این گیرنده را با دقت بالایی تشخیص داد (۳۲).

سیستی سرکوسیس^۲ بیماری است که توسط لارو کرم حلقوی Taenia solium ایجاد می‌شود. انسان با حمل این کرم در روده میزبان نهایی آن می‌باشد. آلودگی توسط این انگل می‌تواند منجر به بیماری عصبی سیستس سرکوسیس (NCC) گردد که می‌تواند مشکلات بهداشتی و اقتصادی فراوانی در کشورهای در حال توسعه به همراه داشته باشد. اکنون با استفاده از VHH‌های تولید شده علیه T. solium و آزمایش‌های سرولوژیکی می‌توان آلودگی به این انگل را به‌راحتی تشخیص

جدول ۲ - فهرست داروهای شرکت Ablynx و مراحل FDA طی شده مربوط به هر دارو

	Therapeutic area	Product name	Target	Discovery	Pre-clinical	Phase I	Phase II	Phase III
Fully owned	Haematology	caplacizumab	vWF					
	Inflammation/Immunology/Infection	Various						
	Oncology	Various						
	Pulmonology	ALX-0171	RSV					
	Ocular	NA						
	Ocular	NA						
CoCo	Inflammation/Immunology	NA						MERCK SERONO
	Oncology/Neurology	Various		Potential to evolve into at least 4 co-co programmes				MERCK SERONO
	Immunology/Inflammation	ALX-0761	IL-17F/IL-17A					MERCK SERONO
		ALX-0061	IL-6R					abbvie
		ozoralizumab	TNF α					EDDING & PRAUS
	Bone disorders	ALX-0141	RANKL					EDDING & PRAUS
	Neurology	NA						MERCK
	Oncology	ALX-0751						MERCK
	Pulmonology	NA						Boehringer Ingelheim
Fully partnered	Various	NA						Boehringer Ingelheim
	Immunology	NA						NOVARTIS
	Immunology	NA						Boehringer Ingelheim
	Immunology	Various						MERCK

Validated targets (clinic)
1st in class

نتیجه‌گیری

آنتی‌بادی‌ها از ابزار مهم تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی بالینی به‌شمار می‌روند. جذابیت آنتی‌بادی‌ها تنها به‌خاطر توانایی ذاتی آن‌ها در شناسایی تعداد زیادی از اپی‌توپ‌ها، با تمایل و ویژگی بالا نیست؛ بلکه به‌خاطر پایداری و امکان مهندسی نمودن آن‌ها نیز می‌باشد. به‌قسمت متغیر آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری، VHH گفته می‌شود؛ که یکی از قطعات جالب توجه در خانواده آنتی‌بادی‌ها می‌باشد (۱۷). این دسته از آنتی‌بادی‌ها، با وزن نسبی ۱۵ کیلو دالتون، کوچک‌ترین آنتی‌بادی‌های طبیعی هستند که قادر به شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن‌ها

می‌باشند (۱۷). این مولکول‌ها به‌طور اختصاصی و با تمایل زیاد به هدف‌های مولکولی متصل می‌شوند. VHH‌ها همچنین قادر به شناسایی آنتی‌ژن‌هایی هستند که توسط آنتی‌بادی‌های کلاسیک شناسایی نمی‌شوند. از این قبیل می‌توان جایگاه فعال آنزیم‌ها و اپی‌توپ‌های مخفی را نام برد. آنتی‌بادی‌های VHH به‌عنوان ابزاری مفید در بیوتکنولوژی مطرح می‌باشد. این دومین‌های تک رشته‌ای نسبت به دیگر مشتقات آنتی‌بادی‌های کلاسیک، از ویژگی‌های جذابی برخوردار بوده و این امر باعث شده است این نوع از آنتی‌بادی‌ها در درمان و تشخیص بیماری‌ها اهمیت زیادی پیدا کنند.

زیر نویس‌ها

1. Frame work
2. complementarity determining regions
3. Single-chain variable fragment
4. disulfide-stabilized Fv antibody fragment
5. Raymond Hamers
6. Vrije
7. Corhn's disease
8. Prostate specific antigen
9. Cyticercois

منابع

1. Jestin JL, Volioti G, Winter G. Improving the display of proteins on filamentous phage. *Res Microbiol* 2001; 152:187-91.
2. Pande J, Szweczyk MM, Grover AK. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology advances* 2010
3. Kretzschmar T, von Ruden T. Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13:598-602.
4. Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 502-520.
5. Holliger P, Bohlen H. Engineering antibodies for the clinic. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18(4): 411-419.
6. Deffar K. Nanobodies-the new concept in antibody engineering. *Afr J Biotechnol* 2010; 8(12).
7. Muyldermans S. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veter Immunol and Immunopathol* 2009; 128(1-3): 178-183.
8. Greenberg AS. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 1995; 374(6518): 168-173.
9. Verheesen P. Reliable and controllable antibody fragment selections from Camelid non-immune libraries for target validation. *Biochimica Biophysica Acta* 2006; 1764(8): 1307-1319
10. Bond CJ, Marsters JC, Sidhu SS. Contributions of CDR3 to VHH domain stability and the design of monobody scaffolds for naive antibody libraries. *J Mol Biol* 2003; 332(3): 643-655.
11. Harmsen MM. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol* 2000; 37(10): 579-590.
12. Muyldermans S. Sequence and structure of V(H) domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 1994; 7(9): 1129-1135.
13. Lesk AM, Chothia C. Elbow motion in the immunoglobulins involves a molecular ball-and-socket joint. *Nature* 1988; 335(6186): 188-190.
14. Vu KB. Comparison of llama V(H) sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* 1998; 34(16-17): 1121-1131.
15. Nguyen VK. Camel heavy-chain antibodies: Diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* 2000; 19(5): 921-930.
16. Conrath K. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol* 2005(1): 112-125.
17. Kastelic D. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. *J Immunol Method* 2009; 350(1-2): 54-62.
18. Huang L. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosensors Bioelectronics* 2005; 21(3): 483-490.
19. Kolkman JA. Nanobodies-from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discovery Today: Technologies*; 2010.
20. Thys B. In vitro antiviral activity of single domain antibody fragments against poliovirus. *Antiviral Res* 2010; 87(2): 257-264
21. Yau KYF. Affinity maturation of a VHH by mutational hotspot randomization. *J Immunol Method* 2005; 297(1-2): 213-224.
22. Dolk E. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in

منابع (ادامه)

- shampoo. *App Environmental Microbiol* 2005; 71(1): 442-450.
23. Verheesen P. Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. *Biochimica Biophysica Acta* 2003; 1624(1-3): 21-28.
24. Pleschberger M. An S-layer heavy chain camel antibody fusion protein for generation of a nanopatterned sensing layer to detect the prostate-specific antigen by surface plasmon resonance technology. *Bioconjugate Chem* 2004; 15(3): 664-671.
25. Coppieters K. Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheum* 2006; 54(6): 1856-1866.
26. Baral TN. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nature Med* 2006; 12(5): 580-584.
27. Cortez-Retamozo V. Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. *Cancer Res* 2004; 64(8): 2853-2857.
28. Roovers RC. Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(3): 303-317.
29. Tijink BM. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol Cancer Therapeut* 2008; 7(8): 2288.
30. Maass DR. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Method* 2007; 324(1-2): 13-25.
31. Saerens D. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J Biological Chem* 2004; 279(50): 51965-51972.
32. Bazl MR. Production of chimeric recombinant single domain antibody-green fluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells. *Hybridoma* 2007; 26(1): 1-9.
33. Deckers N. Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *Int J Parasitol* 2008: 1-9.
34. Rothbauer U. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature Method* 2006; 3(11): 887-889.
35. <http://www.ablynx.com/>