موجودی قدیمی با کاربردهای جدیـد:

بررسی نانوبادی‌های شتری در درمان و تشخیص بیماری‌ها

حمید باخرد[1]، مجتبی غنی‌زاده[2]

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

۲. دانشجوی داروسازی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

شترسـانان در سرمشـان نوع خاصی از ایزوتیپ IgG را دارا می‌باشند که به‌علت نداشتن زنجیره سبک آنتی‌بـادی زنجیره سـنگین HCAb نام‌گذاری شـده‌اند. بخش متغیر این نوع آنتی‌بـادی (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. به‌علت خصوصیات منحصر به فرد آن‌ها از جمله اندازه حلالیت، پایداری درونی، آسـانی اتصال چند نانوبادی به یکدیگر، قابلیت شناسـایی اپی‌توپ‌های نامعمول و یا مخفی، توانایی اتصال به حفرات و یا سـایت‌های فعال آنزیمی، سـهولت 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.

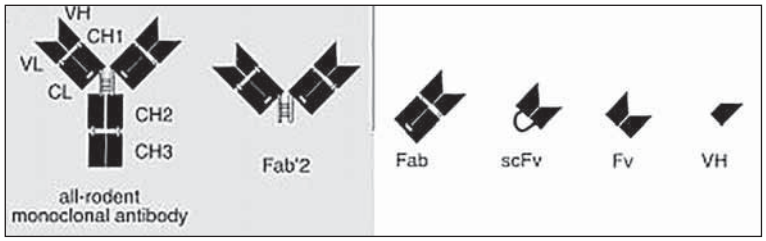
■ ساختار آنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بـادی مولکـول گلیکوپروتئینی اسـت که از دو زنجیره سـنگین و دو زنجیره سـبک ساخته شـده است که از طریق پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شـده‌اند. هر زنجیره از دو بخش متغیر (V) و ثابت (C) تشـکیل شده‌اسـت. هر زنجیره سبک از یـک بخش ثابت و یک بخش متغیر تشـکیل شده است و زنجیره سنگین از یک بخش متغیر و بسـته به کلاس آنتی‌بادی، از سه الی چهار بخش ثابت تشـکیل شده است. بخش متغیر از هر رشته شـامل چهار منطقه ثابت (FR)[1] و سه منطقه بسیار متغیر (CDR)[2] تشـکیل شده اسـت. مناطق متغیر HV و LV در سمت N- ترمینال، به آنتی‌ژن متصل می‌شـوند و تعیین‌کننـده ویژگی، تنـوع و تمایل اتصال به آنتی‌ژن هسـتند (۱،۲). IgG فراوان‌ترین ایمنوگلوبولین در خون انسـان می‌باشد و به همین دلیـل از این ایزوتیـپ جهت سـاخت آنتی‌بادی نوترکیب درصنعت داروسـازی اسـتفاده می‌شود. در سـال ۱۹۸۸ تکنیک مهندسی آنتی‌بادی و بیان قطعـات آنتی‌بـادی در E.coli به‌وسـیله skerra و همکارانش ابداع شـد. 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).

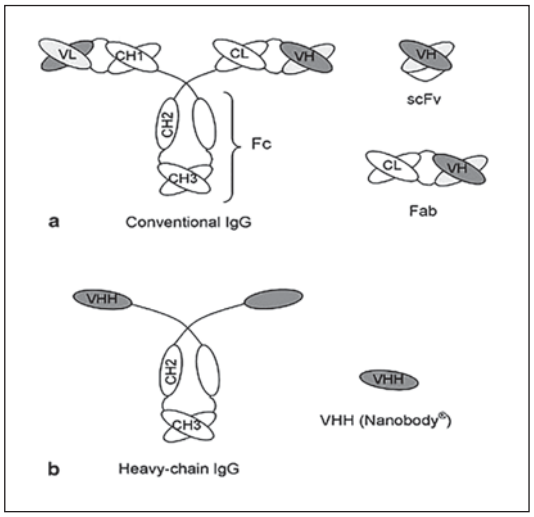
Fv شـامل VH و VL بـوده و فاقد هر نوع پیوند کووالانسـی می‌باشد و بنابراین، برای مدت بسیار کوتاهی پایدار است. scFv[3] قطعات VH و VL بوده که از طریق لینک پپتیدی به هم متصل شـده‌اند. dsFv[4] قطعـات VH و VL بوده کـه از طریق باند دی‌سـولفیدی به هم متصل می‌شوند. این فرم در سـرم نسـبت به حرارت پایدارتر از scFv می‌باشد. Fab شـامل VH و CH1، از رشـته سنگین و CL و VL از رشـته سبک است که بین CL و CH1 پیوند دی‌سولفیدی وجود دارد. پایدارتر از scFv می‌باشد و قادر به دیمریزه شدن نیست به همین علت تعیین تمایل آن راحت‌تر است (۴،۵).

■ آنتی‌بادی‌هـای زنجیـر سـنگین شـتری (نانوبادی)

آنتی‌بادی‌هـای زنجیره سـنگین در اواخر دهه ۱۹۸۰ توسـط پروفسور ریموند هامرز[5] در دانشگاه وریج[6] بروسـل از خون شـتر جدا شدند. آن‌ها این نوع آنتی‌بادی را به علت نداشـتن زنجیره سـبک



شکل ۱



شکل ۲ ـ نمایش شماتیک آنتی‌بادی‌های معمول (a)، آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (b) و قطعات مشتق شده از آنتی‌بادی‌ها. قسمت‌های متغییر 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.

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 VH و VL 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 کاملا 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 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.

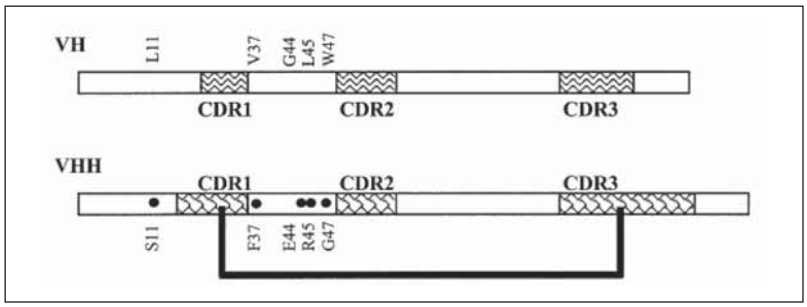
■ ویژگی‌های VHH (نانوبادی)

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

دومین VL واکنش می‌دهند. اگرچه بیشتر خاصیت آب دوستی VHH به‌دلیل جایگزینی اسید آمینه‌های ذکر شده می‌باشد، برخی اسید آمینه‌های دیگر که در ساختارهای VH به‌طور معمول با قسمت CH1 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 (۱۵، ۱۴) و همچنین در بیشتر آنتی‌بادی‌های شتری VHH دارای CDR3 بلندتری می‌باشد که توسط یک باند دی‌سولفیدی با سیستئین موجود در CDR1 یا FR2 پایدار می‌شود (۱۲) (شکل ۳). با توجه به مطالعات ساختاری، VHH دوکی شکل، دارای قطر ۲/۵ nm و طول۴nm می‌باشد که به همین دلیل نانوبادی نیز نام‌گذاری شده‌اند (۱۶).

VHH به دلایل گفته شده دارای مزایای متعددی است، از جمله این‌که 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). درمقایسه با آنتی‌بادی کلاسیک، VHH به pH اسیدی، قلیایی، دمای بالا، هضم به‌وسیله 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 آن‌جا که VHH با دومین VH انسانی دارای 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



شکل ۳ ـ 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 معمولا 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 Frameworke-2 در ژن VHH در شکل نشان داده شده است.

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. به‌علاوه 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 تقریبا 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 محصولاتی که 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 به‌عنوان 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 معمولا به‌عنوان اهدافی جهت حمل آنزیم‌های سمی به‌کار گرفته می‌شوند و یا قادر هستند واکنش‌های مولکولی خاصی را متوقف کنند. به‌عنوان مثال بیماری خواب با موفقیت توسط VHHهای پیوند داده شده به آنزیم Apolipoprotein L-1 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 ـ لاکتام متصل شده‌اند، می‌توانند این آنزیم را به سطح سلول‌های سرطانی حمل کرده و سبب تبدیل پیش داروی 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 (۲۹، ۲۸). همچنین VHHهای تولید شده علیه TNFα می‌توانند جهت درمان بیماری روماتویید 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

جدول ۱

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

تشخیص سرطان، VHHها دارای اهمیت به‌سزایی می‌باشند. به‌عنوان مثال، جهت تشخیص مراحل ابتدایی سرطان پروستات از سنجش میزان آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA)[8] 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).

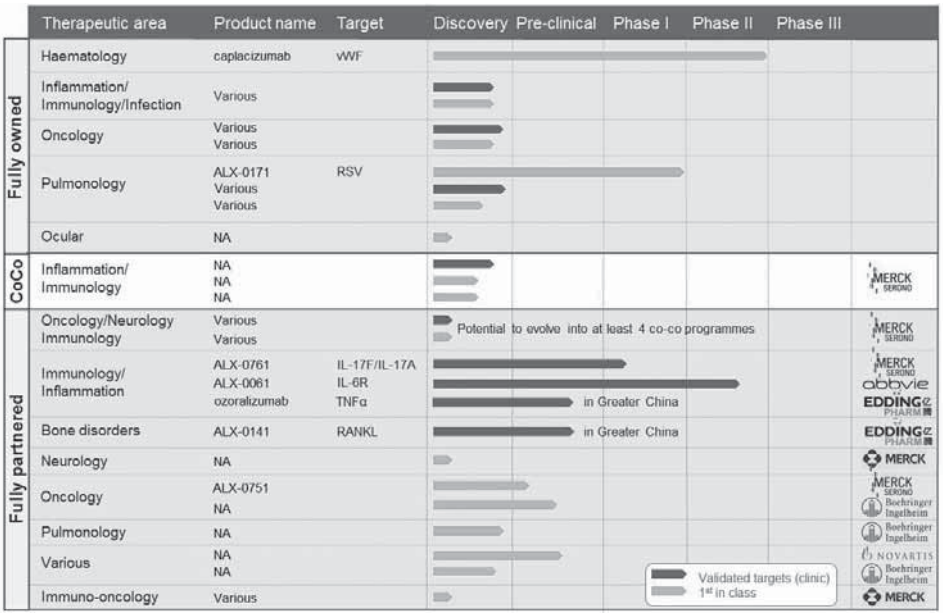
سیستی سرکوسیس[9] بیماری است که توسط لارو کرم حلقوی Taenia solium ایجاد می‌شود. انسان با حمل این کرم در روده میزبان نهایی آن می‌باشد. آلودگی توسط این انگل می‌تواند منجر به بیماری عصبی سیستس سرکوسیس (NCC) گردد که می‌تواند مشکلات بهداشتی و اقتصادی فراوانی در کشورهای در حال توسعه به همراه داشته باشد. اکنون با استفاده از VHHهای تولید شده علیه T.solium و آزمایش‌های سرولوژیکی می‌توان آلودگی به این انگل را به‌راحتی تشخیص 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)

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



■ نتیجه‌گیری

آنتی‌بادی‌هـــا از ابزار مهم تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی بالینی به‌شمار می‌روند. جذابیت آنتی‌بادی‌ها تنها به‌خاطر توانایی ذاتی آن‌ها در شناســایی تعداد زیادی از اپی‌توپ‌ها، با تمایل و ویژگی بالا نیســت؛ بلکه به‌خاطر پایداری و امکان مهندسی نمودن آن‌ها نیز می‌باشد. به قسمت متغیر آنتی‌بادی‌های زنجیره ســنگین شتری، VHH گفته می‌شــود؛ که یکی از قطعات جالب توجه در خانواده آنتی‌بادی‌ها می‌باشد (۱۷). این دســته از آنتی‌بادی‌ها، با وزن نســبی ۱۵ کیلــو دالتون، کوچک‌تریــن آنتی‌بادی‌های طبیعی هســتند که قادر به شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن‌ها می‌باشــند (۱۷). این مولکول‌ها به‌طور اختصاصی و با تمایل زیاد به هدف‌های مولکولی متصل می‌شوند. VHHها همچنین قادر به شناســایی آنتی‌ژن‌هایی هستند که توسط آنتی‌بادی‌های کلاسیک شناسایی نمی‌شوند. از این قبیل می‌توان جایگاه فعال آنزیم‌ها و اپی‌توپ‌هــای مخفی را نام بــرد. آنتی‌بادی‌های VHH به عنوان ابزاری مفید در بیوتکنولوژی مطرح می‌باشد. این دومین‌های تک رشته‌ای نسبت به دیگر مشتقات آنتی‌بادی‌های کلاســیک، از ویژگی‌های جذابی برخوردار بوده و این امر باعث شده است این نوع از آنتی‌بادی‌ها در درمان و تشخیص بیماری‌ها اهمیت زیادی پیدا کنند.

زیرنویس‌ها

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. Cycticercosis

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. Szewczyk MM. Grover AK. Phage display: Concept, innovations, applications and future. Biotechnology advances 2010

3. Kretzschmar T. von Ruden T. Antibody discovery: phage display. Curr Opinion 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/