Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

REVIEW ARTICLE

Nanobody and Its Therapeutic Applications

Maryam Darvish

Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received July 24, 2017; Accepted October 15, 2017)

Abstract

Background and purpose: Monoclonal antibodies market has grown since approval of Muromonab-CD3 (trade name Orthoclone OKT3) in 1986 as immuno- suppressor. Nevertheless, the undesirable effects of these large specific biomolecules calls for further attempts for more effective alternatives. Variable domain of heavy chain (VHH) are the smallest antibody fragments called Nanobody (Nb), derived from camelid heavy chain-only antibodies (HcAb) by DNA recombinant gene technology. In this study, some of the unique structural and functional features of Nbs are summarized. The main context of this review speculate about several experimental therapeutic applications of Nbs against a wide range of diseases ranging from infectious, animal toxin, autoimmune, and cancer disease in three different functional platforms. Data about structural and functional features of Nbs and their therapeutic effects were retrieved from articles indexed in PubMed, Science direct, and Google Scholar. Development and employment of Nbs in different researches show that their unique physicochemical properties make them a useful tool for biomedical applications and drug discovery. This is because of some exceptional feathers such as small size, extraordinary stability, high affinity even for occluded epitopes, and cost-effective production. This review provides an overview of efficacy and success of Nbs as more promising therapeutic agents over conventional antibodies against multiple diseases.

Keywords: Nanobody, VHH, phage display, monoclonal antibodies

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (159): 143-161 (Persian).

مجـــلـــه دانـشـــگاه عـــلـــوم پـــزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۵۹ فروردین سال ۱۳۹۷ (۱۶۱-۱۴۳)

نانوبادی و کاربردهای درمانی آن

مریم درویش

چکیده

سابقه و هدف: بازار دارویی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از زمان تایید آنتی بادی بازدارنده سیستم ایمنی (Muromonab-CD3) در سال ۱۹۸۶ که با نام تجاری Orthoclone OKT3 معروف است، رشد چشمگیری یافته است. با این وجود، اثرات ناخواسته این مولکول‌های اختصاصی بزرگ باعث می‌شود که تلاش‌های بیش‌تری برای یافتن جایگزین موثرتر انجام گردد. VHH (variable domain of heavy chain)، کوچک‌ترین قطعه آنتی‌بادی است که از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شترسانان به وسیله تکنولوژی DNA نوترکیب مشتق می گردد که به نانوبادی نیز موسوم است.

مواد و روش ها: در این مطالعه ما به خلاصه ای از خصوصیات ساختاری و عملکردی ویژه نانوبادی ها می پردازیم. قسمت مهم این مقاله به بررسی تعدادی از کاربردهای درمانی نانوبادی علیه طیف وسیعی از بیماری ها از قبیل بیماری های عفونی، سموم حیوانات، بیماری های خودایمنی و سرطان در قالب سه فرمت مختلف عملکردی می پردازد. در این مقاله مروری، اطلاعات مربوط به ویژگی‌های ساختاری- عملکردی نانوبادی ها و اثرات درمانی آن‌ها از مقالات نمایه شده در پایگاه های اطلاعاتی PubMed, Science direct, Google scholar استخراج گردیده است.

یافته ها: ایجاد و به کارگیری نانوبادی ها در پژوهش های مختلف نشان می دهد که خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی این مولکول های زیستی، آن ها را به عنوان ابزار مفید برای کاربردهای زیست پزشکی و کشف دارو تبدیل نموده است. این مسئله به خاطر اندازه کوچک، تمایل اتصال بالا برای اپی توپ های مخفی، ایمونوژنسیته پایین و تولید مقرون به صرفه آن ها می باشد.

استنتاج: مقاله حاضر، بررسی اجمالی از موفقیت ها و کارآیی نانوبادی ها به عنوان یک عامل درمانی امیدبخش تر نسبت به آنتی بادی های معمول علیه بیماری های مختلف فراهم می آورد.

واژه های کلیدی: نانوبادی، VHH، نمایش فاژی، آنتی بادی مونوکلونال

مقدمه

آنتی‌بادی‌های شتری ایزوتیپی از ایمونوگلوبین G می‌باشند که در سرم برخی از شترسانان مانند Camels, Alpacas, Llamas Bactrian, Dromedaries وجود دارند. این آنتی‌بادی‌ها در سال ۱۹۹۳ توسط گروهی از محققین بلژیکی شناسایی شدند(۱). این نوع آنتی‌بادی‌ها که بخشی از کل آنتی‌بادی‌های شتر را تشکیل می‌دهند و علاوه بر آن‌ها وجود دارند، بر خلاف آنتی‌بادی‌های کلاسیک (IgG) که چهار زنجیره‌ای (هتروتترامر) هستند، فقط دارای دو زنجیره سنگین (هومودایمر) بوده و فاقد زنجیره سبک هستند. به این دلیل، به آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (Heavy chain antibodies) نیز معروفند. زنجیره سنگین به جای چهار دومین، دارای سه دومین کروی

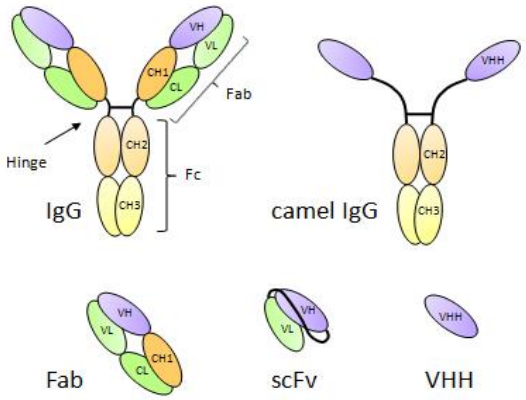
مولف مسئول: مریم درویش- اراک: میدان بسیج، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی
استادیار، بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
E-mail: Maryam_darvish@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۶/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۲۴

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

می‌باشد. دو ناحیه قسمت ثابت (CH2 وCH3)[1] مانند آنتی‌بادی‌های کلاسیک در این آنتی‌بادی‌ها وجود دارند، اما دومین مربوط به CH1 در این آنتی‌بادی‌ها حضور ندارد. بنابراین ناحیه متغیر[2] متصل شونده به آنتی ژن (Fragment antigen binding) در این آنتی‌بادی‌ها به یک دومین زنجیره سنگین ختم می‌شود که VHH (Variable domain of Camel's HCAbs) نام دارد (تصویر شماره ۱) و به وسیله بازو[3] به قسمت Fc[4] متصل می‌شود. بنابراین قطعه VHH به‌عنوان کوچک‌ترین واحد عملکردی یک آنتی بادی (حتی در عدم حضور زنجیره سبک) برای اتصال به آنتی ژن معرفی شده است که به single domain نیز مشهور است(۲).



تصویر شماره ۱: آنتی بادی های معمولی، قطعات مختلف آن ها و آنتی بادی شتری

در حال حاضر حدود ۳۰ درصد از محصولات بیولوژیک، داروها هستند که از این تعداد، بیش‌تر آن‌ها آنتی‌بادی‌ها هستند. از این میان، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از اهمیت ویژه‌ای در درمان و تشخیص برخوردارند. امروزه بسیاری از بیماری‌های عفونی، سرطان، خودایمنی و آلرژی، درمان وابسته به آنتی بادی دارند. در کل، عوارض جانبی داروهای حاصل از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در مقایسه با داروهای شیمیایی بسیار کم‌تر است. با این وجود، کاربرد این داروها در برخی موارد با عوارض جانبی همراه است. از طرفی هزینه بالای آن‌ها، بودجه زیادی را به بیماران متحمل می‌نماید. برخی از محدودیت‌های کاربرد این آنتی‌بادی‌ها عبارتند از ۱- اندازه بزرگ (۱۵۰ کیلو دالتون)، که قدرت نفوذ آن‌ها را به بافت‌ها و سلول‌های هدف کاهش می‌دهد و ۲- ایجاد پاسخ ایمنی در میزبان که کاهش عملکرد بیولوژیک را درپی دارد(۳).

به منظور کاهش عوارض جانبی و افزایش عملکرد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، ایجاد مولکول جایگزین کوچک‌تر همراه با افزایش قدرت اثربخشی دارویی همواره مورد توجه محققین بوده است. به همین منظور، استفاده از قطعات کوچک‌تر آنتی‌بادی با قدرت اتصالی مناسب به آنتی‌ژن مانند Fab, [5]Fv, [6] scFv متداول شده است (تصویر شماره ۱). با این وجود پایداری و اثر بخشی این قطعات نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول کم‌تر است. نوع آنتی‌بادی تک دومینی که به‌طور طبیعی در شتر و کوسه ماهی‌ها وجود دارد، نسبت به دیگر قطعات آنتی‌بادی دارای خصوصیات قابل توجهی می باشد که آن‌ها را از آنتی‌بادی‌های معمول متمایز ساخته و استفاده از آن‌ها را برای اهداف درمانی وتشخیصی توجیه می‌نماید. در ادامه به برخی از خصوصیات منحصر به فرد این آنتی‌بادی‌ها می‌پردازیم.

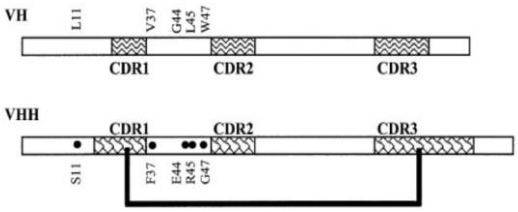
ساختار و ویژگی های VHH

از لحاظ ساختاری، آنتی بادی های تک دومینی مانند آنتی بادی های معمول، دارای ۴ ناحیه حفاظت شده یا FR[7] می باشند که به وسیله سه ناحیه CDR[8] احاطه شده اند. ناحیه CDR3 در اتصال آنتی بادی به آنتی ژن نقش محوری دارد. طول این ناحیه در VHH شامل ۱۶-۱۸ اسید آمینه می‌باشد. درحالی‌که در نوع موشی و انسانی (VH) به ترتیب دارای ۹ و ۱۲ اسید آمینه است

1. Constant
2. Variables
3. Hinge
4. Fragment crystalline
5. Fragment variable
6. Single chain variable fragment
7. Framework Region
8. Complementary Determining Region

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

که این تفاوت به علت فقدان زنجیره سبک در ناحیه متغیر VHH می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها به لحاظ توالی اسیدآمینه‌ای بیش از ۸۰ درصد با آنتی‌بادی‌های انسانی هومولوژی دارند و هر دو به خانواده ژنی Family III تعلق دارند. در ناحیه FR2 این آنتی‌بادی‌ها، اسیدهای آمینه هیدروفیل به جای اسیدهای آمینه هیدروفوب قرار دارند که شامل جایگزینی‌های: V37F/V37Y, G44E, L45R W47G می‌باشند (تصویر شماره ۲)(۴). جایگزینی اسیدهای آمینه هیدروفیل باعث افزایش حلالیت VHH در مقایسه با VH می‌شود که این مزیت بیان این آنتی‌بادی‌ها را نیز در سیستم‌های بیانی افزایش می‌دهد. طویل بودن ناحیه CDR3 امکان اتصال بهتر آنتی‌بادی در جایگاه فعال آنزیم‌ها را فراهم می‌آورد. هم‌چنین نبود زنجیره سبک سبب افزایش سطح موثر برای واکنش آنتی‌بادی با هدف مورد نظر می‌گردد. همان‌طورکه در تصویر شماره ۲ مشخص است، وجود باند دی‌سولفیدی بین ناحیه CDR1 و CDR3 پایداری در شرایط غیر نرمال مانند دمای بالا، وجود پروتئاز و شرایط اسیدی را فراهم می‌آورد(۵).



تصویر شماره ۲: تفاوت اسیدهای آمینه ناحیه FR2 در VHH و VH

در حقیقت پارامترهای فیزیکوشیمیایی مطلوب VHH سبب کاربردهای فراوان آن درعلوم پزشکی و بیوتکنولوژی شده است. عدم وجود زنجیره سبک و نبود تغییرات پس از ترجمه، امکان کلونینگ و بیان آن را در سیستم‌های پروکاریوتی مانند باکتری و یوکاریوتی مانند مخمر به خوبی فراهم آورده است(۷،۶). پروتئین بیان شده از قطعه VHH با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون که دارای ابعادی در مقیاس نانومتر می باشد (ارتفاع ۴/۸ نانومتر و قطر ۲/۲ نانومتر)، اولین بار توسط شرکت Ablynx به نانوبادی[1] معروف شد(۸). درحقیقت سایز کوچک نانوبادی‌ها امکان طراحی فرمت‌های عملکردی گوناگون برای دارورسانی هدفمند را فراهم می‌آورد(۹). قطعه VHH از طریق جداسازی آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتر ایمن شده وکلونینگ مخازن ژنی کلون‌های لنفوسیتی ایجاد شده به کمک روش نمایش فاژی[2] قابل دستیابی است. در مجموع خصوصیات بیوشیمیایی و فارماکوکینتیک نانوبادی‌ها، این مولکول‌های کوچک را به عنوان ابزار ایده‌آل برای دارو رسانی هدفمند، ایمنوتراپی و تشخیص پزشکی تبدیل نموده است.

روش نمایش فاژی

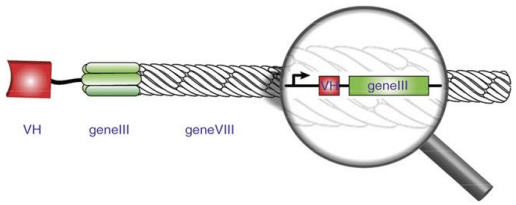
روش نمایش فاژی در سال ۱۹۸۵ توسط George Smith ابداع شد. امروزه این روش کاربردهای گوناگونی در زمینه واکنش های لیگاند - رسپتور و مهارکننده که اساس آن پروتئین - پروتئین اینتراکشن است، پیدا نموده است. هم‌چنین در تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای اهداف تحقیقی و درمانی نیز کاربردهای فراوانی یافته است. مبنای روش نمایش فاژی بر به کارگیری فاژهای خانواده Ff (اغلب فاژهای رشته‌ای مانند M13, Fd, f1) و انتخاب آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن طی مراحل غنی‌سازی[3] از کتابخانه آنتی‌بادی مورد نظراست(۱۰). در این روش، قطعه ژنی تکثیر یافته از نواحی متغیر، آنتی‌بادی‌های حاصل از لنفوسیت‌های نمونه موردنظر را با یکی از ژن‌های پروتئین‌های پوششی فاژ (معمولاً ژن III) متصل نموده که نتیجه آن بیان شدن قطعه آنتی‌بادی نوترکیب مورد نظر به همراه پروتئین پوششی در سطح فاژ می‌باشد (تصویر شماره ۳).

امروزه شرکت‌های دارویی بزرگ مانند Novartis, Ablynx, Boehringer سرمایه‌گذاری کلانی برای توسعه نانوبادی‌ها در زمینه‌های تشخیصی و درمانی

1. Nanobody
2. Phage display
3. Panning

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

نموده‌اند و در حال انجام تحقیق در فازهای مختلف بالینی برای وارد نمودن نانوبادی‌ها به بازار دارویی دنیا هستند. افزایش عملکرد نانوبادی‌ها با استراتژی‌های مختلف برای اهداف مختلف آنتی‌ژنی امکان‌پذیر است که در این مقاله به بررسی نحوه به کارگیری نانوبادی‌ها جهت اهداف درمانی مختلف می‌پردازیم.



تصویر شماره ۳: نحوه قرارگیری و نمایش پروتئین نوترکیب کنار ژن III فاژ رشته ای

مواد و روش ها

در این مطالعه مروری، جست‌وجوی الکترونیکی مقالات از پایگاه‌های اینترنتی Google scholar Science direct, و PubMed بدون محدودیت زمانی صورت گرفت. جستجو با کلید واژه‌های ذیل انجام شد:

Nanobody/Single domain antibodies/VHH/therapeutics

در جستجوی اولیه از میان مقالات جستجو شده، مقالات موردنظر براساس عنوان و چکیده مرتبط با موضوع پژوهش انتخاب گردید.

یافته ها

بر اساس تعریف WHO[1] بیماری‌های عفونی شامل عفونت‌های باکتریایی، ویروسی، انگل‌ها یا قارچ‌ها می‌گردد که غالباً دارای درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. مصرف مداوم آنتی‌بیوتیک‌ها سبب بروز انواع مقاومت‌های دارویی می‌گردد. علاوه بر این، هزینه بالای درمان وجود یک جایگزین درمانی مناسب‌تر را توجیه می‌نماید. با توجه به قابلیت‌های ذاتی نانوبادی‌ها، تحقیقات بسیاری برای به کارگیری این مولکول‌های کوچک علیه برخی از عوامل عفونی، سرطان، گزش حیوانات سمی و بیماری‌های سیستم ایمنی انجام شده است که به بررسی این موارد می‌پردازیم:

۱- نقش مهاری نانوبادی علیه عوامل عفونی

الف- نقش مهاری نانوبادی علیه باکتری ها

به منظور مبارزه با عفونت‌های باکتریایی توسط نانوبادی‌ها، استراتژی‌های مهاری مختلفی وجود دارد که براساس نوع هدف و عملکرد فاکتور بیماریزا انجام می‌گردد. باکتری مولد توکسین روده‌ای (Enterotoxigenic E. coli) سبب خسارات فراوانی در صنعت دامداری می‌گردد. بیان دو عامل بیماریزا در این دو باکتری مسئول بروز علائم شدید در میزبان می‌باشد. اولین فاکتور بیماریزا، نوعی فاکتور ادهسین به نام پیلی[2] است که در سطح باکتری بیان می‌گردد. نوعی Fimbriae (F18) در مرحله اول عفونت‌زایی باکتری ETEC سبب اتصال باکتری به رسپتور لکتین سلول‌های روده میزبان خوک می‌گردد. دومین عامل، توکسینی می‌باشد که سبب دهیدراتاسیون شدید می‌گردد. Moonens و همکاران نانوبادی با تمایل بالای اتصال در شرایط درون تنی به دست آوردند که از طریق مهار رقابتی اتصال F18 گلیکواسفنگولیپیدهای شاخص گلبول قرمز باکتری ETEC عمل می‌نمود(۱۱). علاوه بر F18، باکتری ETEC ادهسین F4 را نیز کد می‌کند. به منظور جلوگیری از پروتئولیز نانوبادی در سیستم گوارشی میزبان، نانوبادی K922 به کمک نوترکیبی DNA shuffling با ۱۰ اسید آمینه تغییر یافته و پایداری ۴۱ درصدی به پروتئاز معده نسبت به نانوبادی قبلی K609 گزارش گردید. هم‌چنین اتصال قطعه Fc IgA به نانوبادی مهاری علیه عامل F4 و بیان آن در دانه‌های Arabidopsis thaliana سبب کاهش عفونت روده‌ای گردید. این مطالعه می‌تواند اساس ایمنی‌زایی غیرفعال خوراکی گردد(۱۲-۱۵).

1. World Health Organization

2. Fimbriae

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

روش دیگر به کارگیری نانوبادی علیه عفونت‌های باکتریایی از طریق فیوژن پروتئین‌ها می‌باشد. در مطالعه Kruger و همکاران، نانوبادی اختصاصی علیه باکتری Streptococcus mutans مولد پوسیدگی دندان با گلوکز اکسیداز بیان شد. این رویکرد می‌تواند به عنوان عامل پیشگیری‌کننده پوسیدگی دندان که توسط سویه فوق ایجاد می‌گردد، به کار گرفته شود. هم‌چنین نانوبادی موثر و مهاری S36 نیز علیه این فاکتور ایجاد شد که علاوه بر دارا بودن تمایل اتصال نقش حفاظتی آن در مدل حیوانی نیز به اثبات رسید(۱۶،۱۵). از آن‌جاکه نانوبادی‌ها دارای اندازه کوچک می‌باشند، استفاده از سازه‌های چندظرفیتی آن‌ها نقش ویژه ای در افزایش عملکرد و تمایل اتصال علیه Campylobacter jejuni دارند(۱۷).

سیستم آنزیمی باکتری دارای قابلیت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد مقاومت‌های جدید می‌باشد. به طور مثال آنزیم بتا لاکتاماز که در پاسخ به بتالاکتام در باکتری ایجاد می گردد، حساسیت آنتی بیوتیکی را از بین می‌برد. بنابراین استراتژی موثر دیگر، به کارگیری نانوبادی علیه عوامل بیماریزا مانند آنزیم‌های ترشحی یا توکسین‌های باکتریایی است. نانوبادی مهاری علیه دو نوع از این آنزیم‌ها به نام TEM-1 و BcII سبب مهار مقاومت آنتی بیوتیک و ایجاد حساسیت به آمپی‌سیلین گردید. این استراتژی برای مهار انواع بتالاکتامازها مناسب است. باکتری Helicobacter pylori که در محیط معده فعال می‌باشد، آنزیم اوره آز را بیان می‌کند که باعث زخم‌های معده می‌گردد. درمان این نوع زخم در بیماران همراه با مقاومت دارویی است. نانوبادی مهاری علیه زیر واحد UreC باکتری فعالیت اوره آز باکتری را در محیط معده متوقف می نماید. این تحقیق می تواند به عنوان درمانی جدید علیه این عفونت در جوامع انسانی مطرح گردد(۱۸).

باکتری کلستریدیوم بوتولینوم[1] دارای نوروتوکسین بوتولینوم BoNT[2] است که از طریق استنشاق یا خوراکی وارد بدن انسان می‌شود. این توکسین یک عامل مهارکننده عصبی- ماهیچه‌ای بسیار قوی می‌باشد که از طریق مهار آزادسازی نوروترانسمیتر استیل کولین از انتهای اعصاب محیطی باعث ایجاد بوتولیسم می‌شود. نحوه عملکرد آن بر روی نورون‌های حرکتی شامل تجزیه پروتئولیتیک پروتئین SNARE [3] می‌باشد که توسط دومین متالوپروتئیناز انجام می‌گردد. ایجاد ضد توکسین‌هایی که مانع عملکرد پروتئاز قبل از ورود توکسین و ظهور علائم گردند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. با توجه به قابلیت اتصالی نانوبادی‌ها در جایگاه آنزیمی و تمایل اتصال بالای اتصال این مولکول‌های کوچک در این زمینه، نانوبادی خنثی‌کننده پروتئاز گزارش شده است(۱۹،۲۰).

ب- نقش مهاری نانوبادی علیه انگل تریپانوزوما

عامل بیماری خواب آفریقایی، انگل Trypanosoma brucei می‌باشد که به واسطه ناقل بندپایان وارد جریان خون پستانداران می‌گردد. انگل دارای ویژگی‌های منحصر به فردی جهت غلبه بر سیستم ایمنی میزبان است و به واسطه داشتن اپی‌توپ‌های متغیر گلیکوپروتئین سطحی اختصاصی (VSG)[4] از استراتژی تغییر مداوم آنتی‌ژنیک برای فرار از سیستم ایمنی میزبان بهره می‌گیرد که فرصت عدم حذف به وسیله آنتی‌بادی را برای انگل فراهم می‌آورد. به همین دلیل واکسن تایید شده‌ای علیه این انگل وجود ندارد. علاوه بر این انگل دارای اپی‌توپ‌های حفاظت شده مخفی و غیر ایمونوژن است. هدف گیری این اپی‌توپ‌ها توسط نانوبادی‌ها استراتژی موثر در مهار و لیز این انگل است. اثر بخشی نانوبادی علیه این انگل وابسته به خصوصیات تمایل بالای اتصال، وزن مولکولی پایین آن است(۲۱). بنابراین به‌کارگیری سیستم‌های رهایش دارو مانند سیکلودکسترین به همراه نانوبادی ۳۳ و داروی ضد

1. Clostridium botulinum

2. Botulinum neurotoxin
3. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
4. variant-specific surface glycoprotein

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

انگل سبب افزایش فعالیت تریپانوزولیتیک شده و میزان دوز مهاری دارو را نیز به‌طور موثری کاهش می‌دهد(۲۲). در گزارش دیگری، نانوبادی غیر لیز کننده با اتصال به بتالاکتاماز به ایمونوتوکسین تغییر یافت که از طریق تبدیل پیش دارو به ماده‌ای کاملاً سمی در سطح انگل تبدیل می‌گردد. در مطالعه Baral و همکاران، اتصال نانوبادی به آپولیپوپروتئین کوتاه L1 که جزیی از HDL و مارکر طبیعی سرم انسان است، انجام شد. این بیومارکر علاوه بر تاثیر بر روی عفونت های باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت، ایجاد ایمنی ذاتی می نماید که قادر به لیز انگل در فرم‌های حساس و مقاوم در انسان است(۲۲).

برای کنترل مراحل تکوین انگل در ناقل و جلوگیری از انتشار این بیماری مبتنی بر ناقل، یک راه حل دیگر، استفاده از ناقل‌های موتاسیون یافته ژنتیکی است. بر این اساس،Sodalis glossinidius نوترکیب مانع انتقال فرم کامل انگل می‌گردد(۲۴،۲۳).

ج- نقش مهاری نانوبادی علیه ویروس ها

مبارزه با ویروس‌ها و مهار انتشار آن‌ها توسط نانوبادی‌ها در سطوح مختلف مانند اتصال، ورود به سلول، تکثیر و حذف پروتئین‌های سطحی موثر است. هم‌چنین به کارگیری نانوبادی‌ها در این زمینه، شناخت ما را از روند انتقال سلولی ویروس افزایش می‌دهد. یک فرمت عملکردی موثر علیه ویروس، اینترابادی‌ها می‌باشد که قادرند در داخل سلول، ویروس را در مراحل اولیه مهار نمایند. هم‌چنین استراتژی نانوبادی چند زیر واحدی برای هدف گیری اپی‌توپ‌ها راه حل مناسبی است که نه تنها سبب افزایش میزان خنثی‌سازی ویروس می‌گردد، بلکه از فرار ویروس نیز جلوگیری می‌نماید. نانوبادی‌های پیشگیری‌کننده مانند لاکتوباسیل تغییر بیان یافته یا لاکتوبادی ها، سبب مهار اتصال ویروس می‌گردند(۲۵). در این زمینه به بحث در مورد ویروس‌های انفلوانزا، نقص ایمنی اکتسابی و هپاتیت B در انسان می‌پردازیم:

ویروس آنفلوانزا[1]

این ویروس عامل ایجاد بیماری تنفسی آنفلوانزا می‌باشد که به وسیله ویروس آنفلوانزای A,B ایجاد می‌گردد. سالانه با توجه به تغییر فصل و به خصوص در فصل زمستان، اپیدمی فرا منطقه‌ای به عنوان معضل بهداشتی ایجاد می‌کند. کانال پروتون ماتریکس M2 ویروس، پروتئین ساختاری مسئول حذف پوشش ویروس در اندوزوم است. نانوبادی مهاری علیه کانال پروتون ماتریکس M2 مانع همانندسازی ویروس می‌گردد و خاصیت حفاظتی بر روی موش‌های دریافت‌کننده دوز کشنده ویروس دارد. پروتئین ساختاری دیگر، گلیکوپروتئین پوشش ویروس یا هماگلوتینین (HA)[2] می‌باشد که مسئول اتصال و ورود به سلول میزبان می‌باشد. تغییر آنتی ژنیک این فاکتور همراه با اپیدمی فرامنطقه‌ای است(۲۶،۲۵).

البته واکسن پیشگیری کننده فصلی علیه ویروس وجود دارد که دارای ترکیب آنتی‌ژنی مناسب برای گروه هدف می‌باشد و نقش حفاظتی در مقابل ویروس دارد(۲۷). با این وجود اپیدمی غیر قابل پیش‌بینی در مورد سویه ویروس H1N1 در سال ۲۰۰۹ ایجاد شد که به عنوان تب مکزیکی رایج گردید. سویه ویروس H5N1 از سال ۲۰۰۳ موجب تلفات زیادی در جمعیت طیور و خسارات فراوان اقتصادی به ویژه در جنوب شرقی آسیا گردید که سبب بیماری آنفلوانزای مرغی در پرندگان گشت و قابل انتقال به انسان بود. با وجود داروی ضد ویروس oseltamivir، میزان مرگ و میر حاصل از عفونت ویروسی حدود ۶۰ درصد می‌باشد. بنابراین وجود گزینه ضد ویروس دارویی مناسب‌تر ضروری است. نتایج بررسی و به کارگیری نانوبادی علیه این ویروس موید موثر بودن نانوبادی و عدم اتصال هماگلوتینین به اسید سیالیک و نقش حفاظتی نانوبادی دو ظرفیتی ویروس نسبت به فرم مونومر در شرایط برون تنی بود(۲۸).

1. Influenza virus
2. Hemagglutinin

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV)[1]

ویروس نقص ایمنی اکتسابی از سال ۱۹۸۱ در بسیاری از نقاط دنیا باعث ایدز (AIDS)[2] و مرگ بیش از ۲۵ میلیون نفر گردیده است. این بیماری توسط نوعی رتروویروس حاوی RNA ایجاد می‌گردد. اگرچه درمان کنونی، قادر به مهار همانندسازی ویروس است، اما منجر به ریشه‌کنی کامل ویروس نمی‌گردد. علاوه بر عوارض جانبی، هزینه‌ها و مقاومت دارویی مزید بر علت می‌باشد. تجویز داروهای موجود بر اساس فاز ویروس و چرخه سلولی رترو ویروس متفاوت است که بر روی ۴ پروتئین ویروسی و یک پروتئین سلولی عمل می‌نماید. پروتئین‌های ویروس شامل ریورس ترانس کریپتاز، اینتگراز، پروتئاز، gp41 و CCR5 می‌باشد. ورود ویروس به سلول به وسیله گلیکوپروتئین ترایمر پوششی ویروس gp120 انجام می‌گردد. پروتئین gp120 به سطح سلول CD4 میزبان متصل شده و با تغییرات کانفورمیشنی سبب اتصال gp41 به غشا پلاسمایی می‌گردد. روش مهاری موثر برای کنترل اپیدمیک در سراسر دنیا، ایجاد واکسن فرا منطقه‌ای است که مانع ورود و انتقال ویروس گردد که عملاً تولید چنین واکسنی دشوار است(۳۰،۲۹).

در حال حاضر تعداد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با خاصیت خنثی‌سازی وسیع ویروس محدود است(۳۱). دو آنتی‌بادی مونوکلونال 2G12, b12 علیه گلیکوپروتئین gp120 و آنتی‌بادی‌های 4E10, 2F5 علیه گلیکوپروتئین gp41 از سرم افراد عفونی شده زیر نوع B (فرم غالب در افراد اروپایی و امریکایی) جدا گردید(۳۳،۳۲). با این وجود، ایمنی‌زایی با ویروس نوترکیب gp120 و gp41 منجر به ایجادآنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده با طیف وسیع نگردید. به نظر می‌رسد نانوبادی‌ها با اندازه کوچک و بهره‌گیری از CD3 طویل خود بتوانند به اپی‌توپ‌های مخفی ویروس دسترسی داشته باشند. نتایج موید نقش خنثی‌سازی ویروس توسط نانوبادی بود که با آنتی‌بادی مونوکلونال قابل مقایسه بود(۳۴). بنابراین می‌توان از نانوبادی به عنوان فاکتور ضد عفونت یا واکسن در این زمینه بهره جست.

برای انتقال RNA ویروسی که هنوز پردازش بر روی آن انجام نشده است، پروتئینی به نام Rev ضروری است که به کمک رسپتور خروج هسته‌ای آن به نام CRM-1 عمل می‌نماید(۳۵). در واقع پروتئین Rev، عناصر پاسخ دهنده به ویروس RRE[3] ساختارهای ثانویه RNA) را بر روی ویروس پردازش نشده شناسایی می‌نماید. بنابراین نانوبادی مهاری که مانع اینتراکشن Rev با CRM و یا Rev با RRE گردد، سبب مهار همانندسازی ویروس می‌گردد. با توجه به نقش مهم این پروتئین در همانندسازی ویروس، می‌توان برای هدف گیری درمانی از آن بهره جست. هم‌چنین اینترابادی مانع اینتراکشن Rev-Rev و مولتی مریزاسیون Rev می‌گردد و تشکیل کمپلکس خروج هسته‌ای ویروس و تولید HIV سلولی را مهار می‌نماید(۳۶).

Nef[4] پروتئین ساختاری چندعملکردی و به عنوان فاکتور بیماری‌زای دیگر ویروس می‌باشد که برای عفونت‌زایی کامل ویروس ضروری است. این پروتئین بیش‌تر در اطراف هسته وجود دارد و سبب کاهش بیان CD4 و MHCI، سیگنالینگ سلولی و افزایش عفونت‌زایی ذرات ویروس می‌گردد که به‌طور مستقل از مکانیسم CD4 عمل می نمایند. بنابراین هدف‌گیری این فاکتور نیز نقش مهمی در مهار ویروس دارد. در مجموع نانوبادی نقش مداخله‌کننده در عملکرد Nef در شرایط درون تنی و برون تنی نشان داد(۳۷).

ویروس هپاتیت B

هپاتیت B یک معضل بهداشتی جهانی می‌باشد که توسط ویروس HBV ایجاد می‌گردد و سالیانه منجر به ۵۰۰-۷۰۰ هزار مورد مرگ می‌گردد. با وجود واکسن

1. Human Immunodeficiency Virus
2. Acquired immunodeficiency syndrome
3. Rev responsive element
4. Negative factor

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

پیشگیری کننده، درمان های مبتنی بر اینترفرون و مهارکننده‌های ریورس ترانسکریپتاز، تنها درمان تایید شده می‌باشد. با این وجود اینترفرون تنها در ۴۰ درصد افراد موثر است(۳۸). استراتژی جدید برای درمان هپاتیت مزمن، ایجاد اینترابادی داخل سلولی برای مهار همانندسازی ویروس در شرایط برون تنی است. نانوبادی علیه سه پروتئین S,M,L موجود در ذرات ویروسی قادر به شناخت دومین S از HBSAg بود(۳۹). به منظور بیان نانوبادی در سیستم یوکاریوتی ناحیه کدکننده نانوبادی در وکتور بیانی که دارای توالی هدف شبکه آندوپلاسمی و سیگنال KDEL است، قرار گرفت. نتایج ترانزفکت همزمان سلول‌های هپاتوما به وسیله پلاسمید بیان کننده ویروس و نانوبادی وجود نانوبادی در شبکه اندوپلاسمی را به همراه دومین S را تایید نمود که نشانگر تجمع داخل سلولی پروتئین دومین S به واسطه نانوبادی بود. میزان ذرات ویروسی در مطالعه برون تنی دیگر، کاهش ۱۰ تا ۱۰۰ برابری ذرات ویروس هپاتیت در خون توسط نانوبادی بود(۳۷).

نوکلئوکپسید ویروس یک هدف آنتی‌ژنی دیگر برای مهار ویروس است. نوکلئوکپسید در سیتوپلاسم به وسیله ۱۸۰-۲۴۰ پروتئین تشکیل می‌گردد. نوکلئوکپسید جهت اینتراکشن با لوپ سیتوپلاسمی پروتئین‌های غشا ویروس به سمت شبکه اندوپلاسمی حرکت می‌کند و منجر به جوانه زدن ویروس در مسیر ترشحی می‌گردد و یا ممکن است به سمت هسته انتقال داده شود که در آن جا ژنوم خود را قطعه قطعه و آزاد نماید که این مسئله دلیل عفونت مداوم ویروس است(۴۰،۴۱). به نظر می‌رسد که نوکلئوکپسید نیز هدف مناسب مهار نانوبادی قرار گیرد(۳۹).

۲- نقش مهاری نانوبادی به عنوان پادزهر

در حال حاضر درمان موثر برای عقرب‌گزیدگی و مارگزیدگی، ایمنوتراپی غیر فعال با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال حاصل از ایمن‌سازی اسب‌ها با سم این موجودات است. این آنتی‌سرم‌ها شامل قطعات Fab و $F(ab')_2$ حاصل از سرم حیوان ایمن شده با سم مورد نظر است. با وجود کاربرد گسترده آنتی سرم برای درمان عقرب‌گزیدگی، درمان با آنتی سرم با محدودیت‌های فراوانی از قبیل اندازه بزرگ آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال است که مانع از توزیع سریع و انتشار آن برای خنثی‌کنندگی مولکول‌های سم در بدن می‌گردد. علاوه بر این، علیرغم جداسازی قسمت ثابت و کاهش اثرات جانبی مضر، ازدیاد حساسیت نوع ۱، ۳، شوک آنافیلاکسی و بیماری سرم از محدودیت‌های اجتناب‌ناپذیر سرم درمانی است(۴۲). نتایج حاصل از ایمن سازی شتر با سم عقرب ایرانی Hottentotta saulcyi نشان داد که مولکول‌های سم، قادر به ایجاد پاسخ ایمنی بودند و آنتی‌بادی پلی کلونال ایجاد شده قادر به شناخت سم در شرایط درون تنی و خنثی سازی اثرات سم در شرایط برون تنی بود. بر این اساس، آنتی سرم شتری نیز مانند آنتی سرم تجاری، پتانسیل کافی برای خنثی‌سازی اثرات سم عقرب را داشت(۴۳). امروزه استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب جهت درمان گزش جانوران توکسیک مطرح گردد که با ابداع روش‌های جدید مولکولی، پیشرفت‌های بسیاری در علوم پزشکی و ایمنوتراپی فراهم آورده است. علاوه بر استفاده از قطعات مختلف آنتی‌بادی علیه سم، نتایج به کارگیری نانوبادی علیه سم، نتایج مطلوبی در ایمنوتراپی داشته است: در سال ۲۰۰۸، نانوبادی علیه فراکشن اصلی سم عقرب (AahI′ Androctonus australis hector) ایجاد گردید. نتایج حاصل نشان داد فرمت دی والان نانوبادی دارای پایداری بهتر و تمایل اتصال بیش تر برای اتصال به آنتی ژن است(۴۴). استراتژی دیگر در این زمینه، استفاده از نانوبادی‌های bispecific بود که به منظور خنثی‌سازی همزمان دو فراکشن AahI/AahII سم عقرب مزبور و با هدف بهینه‌سازی پارامترهای بیولوژیک انجام شد(۴۵). یکی از استراتژی‌های کاهش ایمنوژنسیته

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

نانوبادی، انسانی کردن[1] توالی آن می‌باشد که با ایجاد موتاسیون برخی اسیدهای آمینه انجام شد(۴۶).

در ایران نیز طی دهه گذشته همزمان با به کارگیری نانوبادی‌ها، گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از نانوبادی‌ها علیه سم عقرب ایرانی صورت گرفته است که نتایج رضایت‌بخشی در مقیاس آزمایشگاهی داشته است:

نتایج حاصل از اثر خنثی‌کنندگی نانوبادی علیه سم عقرب ایرانی Hottentotta saulcyi در شرایط برون‌تنی نشان داد که اولاً نانوبادی ۱۲ در غلظت ۴۵ میکروگرم قادر به خنثی‌کنندگی یک دوزکشنده سم ($2LD_{50}$) در موش‌های C57/BL بود. ثانیاً نه تنها این نانوبادی قادر به خنثی‌کنندگی یک دوزکشنده بود، بلکه در غلظت ۱۴۰ میکروگرم، اثرات توکسیک سم را در موش‌های چالش شده با سم عقرب حداکثر تا $5LD_{50}$ خنثی نمود. ثالثاً: طراحی یک روش شبیه سازی عقرب‌گزیدگی طبیعی در مدل موشی نشان داد که نانوبادی حتی در زمان ۲۰ دقیقه پس از تزریق یک دوزکشنده سم و بروز علائم عقرب‌گزیدگی قادر به خنثی‌کنندگی اثرات توکسیک سم بود. نتایج حاصل از اثر خنثی‌کنندگی سم با نانوبادی نقش محافظتی نانوبادی را در مقابل اثرات توکسیک ونوم عقرب تایید نمود(۴۷).

۳- نقش مهاری نانوبادی در درمان سرطان

در حال حاضر نقش بیولوژیکی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در درمان سرطان از طریق دومین عملکردی آن‌ها و با فعالیت ADCC[2] و CDC[3] می‌باشد. با این وجود سایز بزرگ این مولکول‌ها نفوذ بافتی آن‌ها را برای اتصال به هدف مورد نظر محدود ساخته است. نانوبادی‌ها می‌توانند به عنوان یک جایگزین موثرتر برای اهداف درمانی مطرح شوند. آن‌ها قادرند به صورت هوموژن در بافت‌های توموری به عنوان یک ماده ضد سرطان وآنتاگونیست دارویی عمل نمایند. در حال حاضر داروهای مبتنی بر نانوبادی به ۳ طریق نقش عملکردی خود را در این زمینه ایفا می نمایند:

۱- هدف‌گیری به عنوان آنتاگونیست دارویی

۲- هدف‌گیری به واسطه اتصال به جزء عملکردی

۳- هدف‌گیری به‌واسطه قرارگیری درسطح نانوذرات ارائه دهنده دارو

نقش آنتاگونیستی نانوبادی ها

اولین کاربرد نانوبادی‌ها به عنوان آنتاگونیست‌های درمانی، برای پروتئین‌های افزایش بیان یافته سطح سلول‌های سرطانی بود که به واسطه مهار اتصال لیگاند و مکانیسم آبشاری سیگنالینگ انجام گرفت. رهبری زاده و همکاران اولین گزارش را در مورد MUC-1 ارائه نمودند(۴۸). در این زمینه گزارشات متعددی در زمینه به کارگیری نانوبادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌های مختلف انجام شده است:

یکی از این موارد، فاکتور رشد اپیدرمی EGFR[4] می‌باشد که عامل بسیاری از سرطان‌های کارسینومایی است و در ۳۰ درصد از سرطان‌های سینه و ۱۰-۳۰ درصد از سرطان‌های مری و معده فعال می‌شود. نانوبادی‌های آنتاگونیست قادرند رشد تومور را از طریق توقف مسیر سیگنالینگ و القا آپوپتوز ایجاد نمایند. در حال حاضر، دو آنتی‌بادی مونوکلونال cetuximab و matuzumab برای مهار این فاکتور توموری به‌کار می روند. نانوبادی تارگت کننده فاکتور رشد اپیدرمی و رسپتور آن قادرند که به صورت رقابتی مانع اتصال EGF شده و مسیر سیگنالینگ را در تومورهای جامد و چندین میلوما با اثر بخشی قابل مقایسه با داروی cetuximab متوقف نماید(۴۹-۵۱).

c-MET رسپتور تیروزین کیناز فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF) است. هدف‌گیری همزمان دو فاکتور رشد کبدی و رسپتور آن به‌طور موثرتری مسیر

1. Humanization
2. Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
3. Complement Dependent Cytotoxicity
4. Epidermal Growth Factor Receptor

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

سیگنالینگ را متوقف می‌نماید. اهمیت این مهار در عامل بودن این فاکتور در چندین میلوما می‌باشد که شامل مهار توقف مهاجرت سلولی و استئوبلاستوژنز ناشی از HGF است. هم‌چنین اتصال دو نانوبادی همزمان علیه EGFR و HGF باعث نقش هم افزایی در مهار مسیر سیگنالینگ وکاهش مقاومت‌دارویی می گردد(۵۲). اتصال موتیف پپتید نفوذ کننده بافت توموری (RDG) به نانوبادی سبب افزایش قدرت نانوبادی مهارکننده EGFR در شرایط درون تنی و برون تنی می گردد(۵۳).

یکی از ویژگی‌های بافت توموری، عدم چسبندگی سلول‌ها به ماتریکس و متعاقباً متاستاز و تهاجم آن به بافت‌های دیگر است. اینتگرین آلفا-بتا (VLA-3) از خانواده رسپتورهای اینتگرینی است که در چسبندگی سلول‌ها به ماتریکس حائز اهمیت است و در روند سرطان دچار اختلال می گردد. بنابراین نانوبادی مهاری علیه این رسپتور از پیشروی سرطان و متاستازجلوگیری می‌نماید(۷۲). بنابراین سیتواسکلت سلولی تغییر یافته در سرطان می‌تواند هدف دیگری برای عملکرد نانوبادی‌ها باشد(۵۷،۵۵).

اتصال نانوبادی به جز عملکردی

با توجه به عدم وجود قطعه Fc در نانوبادی، اتصال یک جزء توکسین به نانوبادی (ایمونوتوکسین) یک رویکرد مناسب دیگر برای افزایش موفقیت در هدف‌گیری بافت توموری می‌باشد. این مسئله باعث فراهم‌سازی اختصاصیت و نفوذ تقویت شده بافتی توسط نانوبادی و قدرت تخریب تومور توسط توکسین می‌شود. هم‌چنین باعث‌کاهش اثرات توکسیک سیستمیک دارو می گردد(۵۶).

مکانیسم موثر دیگر در حذف تومور به وسیله اتصال یک جزء اپوپتوتیک می‌باشد. نتایج مطالعه Fang و همکاران نشان داد ترانزفکت سلول‌های بنیادی عصبی با فیوژن پروتئین نوترکیب نانوبادی و ژن اپوپتوتیک TRAIL علیه EGFR یک استراتژی موفق دیگر جهت رهاسازی نانوبادی اپوپتتیک از سلول‌های بنیادی عصبی در ناحیه تومور است. بنابراین سازه مزبور هم سبب مرگ سلول توموری می گردد و هم از تکثیر و تهاجم سلول‌های گلیوبلاستوما جلوگیری می‌نماید(۵۷).

استراتژی جدید در مهار تهاجم بافت توموری، مهندسی لنفوسیت‌های T با رسپتور آنتی ژنی کایمریک (CARs)[1] به وسیله یک جز تارگت‌کننده مانند نانوبادی می‌باشد. این مکانیسم فعال‌سازی، غیر وابسته به MHC می‌باشد که به معنای ایمنوتراپی به‌وسیله انتقال لنفوسیت‌های T (T-body) اختصاصی آنتی‌ژن توموری به بیمار می‌باشد. رسپتور آنتی ژنی کایمریک شامل یک دومین شناسایی‌کننده آنتی ژن توموری در خارج سلول، یک ناحیه ترانس ممبران و یک منطقه بازو یا رابط است که بخش خارج سلولی را به دومین سیگنالینگ متصل می کند. منطقه اتصال به آنتی ژن، این لنفوسیت‌ها را قادر می‌سازد که علاوه بر اتصال به آنتی‌ژن‌های توموری به اپی‌توپ‌هایی که به وسیله TCR معمولی شناسایی نمی‌شوند، پاسخ دهند. در این روش، لنفوسیت‌های T، نفوذ بهینه به تومور، رهایی سیتوکین و سیتوتوکسیسیتی را فراهم می‌آورند و نانوبادی، هدف‌گیری اختصاصی آنتی ژن را به‌واسطه اندازه‌کوچک وکاهش ایمنوژنسیته فراهم می‌آورد. اتصال نانوبادی به دومین انتقال پیام لنفوسیت T توسط ناحیه بازو انجام می گردد. اتصال ژن خودکشی‌کننده در ساختار CAR مانع از توکسیسیتی به سلول‌های سالم می گردد. لنفوسیت‌های مهندسی شده بیان کننده رسپتور آنتی ژنی کایمریک سبب لیز سلول توموری می گردد؛ نمونه بارز لنفوسیت اختصاصی MUC1 و گلیکوپروتئین همراه تومور TAG72 و HER2 می باشند که به طور پایداری، رسپتور کایمریک را در شرایط درون تنی بیان می کنند(۵۸).

مهار تومور به کمک نانوبادی های موجود در سطح سیستم رهایش دارو

به منظور دارو رسانی هدفمند و اختصاصی، نانوبادی را به سطح حامل‌های دارویی دیگر مانند

1. Chimeric Antigen Receptors

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

نانوذرات از طریق شیمیایی متصل نموده و در داخل این مجموعه کپسول مانند داروی مورد نظر را بارگذاری می‌نمایند. این سیستم دارورسانی، بدن را در برابر اثرات توکسیک و سیستمیک دارو محافظت نموده و سبب حلالیت داروهای هیدروفوب در ساختارهای هیدروفیل مانند لیپوزوم یا میسل می‌گردد. هم‌چنین امکان بارگذاری بیش‌تر داروها را فراهم آورده و سبب کاهش دفعات دارودهی و ایمونوژنسیته می‌گردد. در این میان سیستم‌های مبتنی بر لیپوزوم بیش‌تر استفاده شده‌اند که شامل دولایه فسفولیپیدی با حفره مرکزی جهت بارگیری مولکول زیستی و بهینه‌سازی پارامترهای فارماکوکینتیک رهایی دارو می‌باشند. مزیت دیگر چنین سیستم‌های بزرگ نانوبادی-نانوذرات، افزایش ماندگاری دارو در بدن می‌باشد که با توجه به خصوصیت نفوذ افزایش یافته بافت توموری (EPR) [1] مشکل اندازه چنین سیستم‌هایی مرتفع می‌گردد و نانوبادی نیز سبب مهار رشد تومور می‌گردد(۵۶).

مورد دیگر، اتصال نانوبادی به سیستم حامل دارویی متشکل از نانوبادی و لیپوزوم پگیله شده است که مسیر سیگنالیک EGFR را هدف می‌گیرد و سبب مهار سرطان‌های کولون، ریه، پانکراس و سرطان اپی‌تلیال می‌گردد. در این زمینه دو رویکرد مهاری وجود دارد. در رویکرد خارجی، آنتی ادی مونوکلونال برای اتصال به لیگاند رقابت می‌نماید و در رویکرد داخلی، مهارکننده‌های تیروزین کینازها هستند که با ATP برای اتصال رقابت می‌نمایند(۵۹). در پژوهش Oliveira و همکاران مشخص شد که نانوبادی EGa1 متصل به لیپوزوم و پگیله شده علیه EGFR مانع اتصال لیگاند EGF به رسپتور شده، سبب محو رسپتور مزبور می‌گردد و تکثیر سلول را مهار می‌نماید. داروی دوکسوروبیسین نیز سبب افزایش اثربخشی فرمولاسیون دارویی می‌گردد. به این ترتیب که لیپوزوم داروی مزبور را در بافت هدف بسته به شرایط فیزیکوشیمی رها می‌نماید و نانوبادی آزاد شده سبب مهار بیان EGFR می‌گردد، بنابراین مهار کامل تومور وابسته به هر دو فاکتور دارو و نانوبادی است(۶۰).

استراتژی دیگر، کونژوگه کردن نانوبادی با نانوذرات منشعب از طلا برای درمان هدفمند از طریق گرما می باشد. در این روش تابش اشعه لیزر به تومور در محدوده نزدیک به مادون‌قرمز انجام می‌گیرد. در این محدوده تومورها جذب کم و نانوذرات طلا جذب خوبی دارند. گرمای ایجاد شده سبب تخریب تومور می گردد. از آن‌جا که نانوبادی قابلیت پایداری در شرایط بالای دمایی را داراست، می‌توان از آن به‌عنوان لیگاند مناسبی برای هدف‌گیری بافت توموری به واسطه نانوذرات طلا بهره جست(۶۱).

روش درمانی اخیر مبتنی بر پروتئین‌های طبیعی یا پروآپوپتوزیس برای ژن درمانی سرطان و القا آپوپتوز است. مثال بارز در این زمینه، استفاده از پروتئین پروآپوپتوتیک کوتاه شده tBid [2] به عنوان یک ترانزژن طبیعی می باشد. این ژن با دارا بودن اندازه کوچک و عدم نیاز به تغییرات پس از ترجمه به وسیله پروموتور ژن‌های سرطانی قابل بیان است(۶۲). استراتژی مبتنی بر نانوبادی با استفاده از این نوع پروموتر، رویکردی مناسب برای ژن درمانی هدفمند سرطان است. از طرفی استفاده از پلی‌کاتیون‌های PEI [3] امکان بارگذاری مولکول DNA را به میزان زیادی فراهم می‌آورد که کونژوگاسیون آن با پلی‌اتیلن گلیکول سبب رهاسازی موثر مولکول‌های زیستی می‌گردد(۶۴،۶۳). بر این اساس صادق‌زاده و همکاران موفق شدند نانوبادی ضد MUC1 را به کونژوگه مزبور که حاوی پلاسمید بیان کننده tBid پایین دست MUC1 بود، متصل نموده و آپوپتوز در سلول‌های توموری بیان‌کننده MUC1 القا نمایند. به این ترتیب نانوبادی به کمک روش ژن درمانی برای رهایی ترانزژن آپوپتوتیک به کار رفت(۶۵).

1. Enhanced permeability and retention

2. Truncated Bid
3. Polyethylenimine polyplex

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

۴- نقش مهاری نانوبادی علیه بیماری های خودایمنی

التهاب به معنای افزایش غیرطبیعی پاسخ سیستم ایمنی بدن علیه آسیب یا عفونت می‌باشد که به دو دسته حاد و مزمن تقسیم می‌گردد. التهاب حاد به منظور حفظ هوموستازی ایجاد می‌گردد و در صورت تداوم سبب ایجاد التهاب مزمن می‌گردد که اساس پیدایش بیماری‌های خودایمنی و آترواسکلروز[1] و غیره می‌گردد(۶۶). داروهای ضد التهاب که در روند مکانیسم آبشاری التهاب تداخل ایجاد می‌نمایند، در سطح مهار سیتوکین‌ها عمل می‌نمایند. به علاوه G پروتیئن‌های متصل به رسپتور نیز به عنوان یکی دیگر از اهداف بیماری‌های خودایمنی مطرح هستند چرا که در بیش‌تر سلول‌ها و بافت‌های درگیر در التهاب‌های حاد و مزمن بیان می‌شوند. با این وجود موفقیت داروهای رایج در هدف‌گیری این نوع رسپتور کافی نیست. از طرفی امروزه تحقیقات جدید، جزئیات بیش‌تری از ساختار این نوع رسپتورها را کشف نموده است که امکان طراحی داروهای جدید را فراهم می‌آورد. از میان این داروها می‌توان مولکول‌های کوچک و موثر مانند نانوبادی‌ها را نام برد که امکان هدف‌گیری دقیق این پروتئین‌ها را فراهم می‌آورد.

یکی از عوامل ایجادکننده التهاب، فاکتور نکروزدهنده تومور TNF[2] است که نقش مهمی در التهاب و بیماری‌های خودایمنی دارد و سبب بیماری آرتریت روماتوئید RA[3] همراه با التهاب مزمن می‌گردد. درمان رایج آنتی‌بادی‌های مونوکلونال infliximab و adalimumab علیه TNF-a و IL-6R است. نتایج به کارگیری نانوبادی‌ها برای مهار این رسپتورها در فاز بالینی موفقیت‌آمیز بوده که می‌تواند گامی موثر برای کاهش هزینه‌های درمان کنونی گردند.

تحقیقات دیگر نشان داد که نانوبادی‌هایی که به طور انتخابی TNF1 را هدف قرار دهد، موثرتر می‌باشند. دلیل این موضوع این است که سیگنال TNF از طریق دو رسپتور TNFR1 و TNFR2 عمل می نماید که اولی در مکانیسم‌های پیش التهابی و مورد دوم نقش تنظیم‌کننده ایمنی دارد. بنابراین مهارکننده‌هایی که TNFR2 را نیز هدف قراردهند، منجر به عوارض جانبی می‌گردند. در این زمینه چندین نانوبادی علیه TNF در فازهای مختلف بالینی در حال انجام است (جدول شماره ۱) (۶۷-۷۱).

رسپتورهای کموکاینی هدف مهم دارویی دیگر برای مهار بیماری‌های التهابی مانند آسم، آرتریت روماتویید و اسکلروزیس چندگانه توسط نانوبادی‌ها می‌باشند(۷۲). از آن‌جاکه در برخی از بیماری‌های خودایمنی، اتو آنتی‌بادی علیه IgG ایجاد می‌گردد، حذف اتوآنتی‌بادی در مهار این نوع بیماری‌ها موثر است. تکنیک جدید برای حذف این آنتی‌بادی‌ها، استفاده از پلاسمافریزیس است که بیماران لوپوس اریتروماتوز و Goodpasture syndrome با همودیالیز درمان شدند. در این روش، اتوایمونوگلوبین IgG به کمک ستون‌های پوشیده شده با نانوبادی علیه IgG به خوبی حذف شدند(۷۳).

تحقیقات نانوبادی ها در فازهای مختلف کارآزمایی بالینی

با توجه به قابلیت‌های ویژه نانوبادی‌ها در اتصال به آنتی ژن و پارامترهای فیزیکوشیمیایی برجسته دیگر، تحقیقات بسیاری در دهه اخیر در فازهای بالینی علیه آنتی ژن‌های مختلف آغاز شده و در حال انجام است. اولین مطالعه در سال ۲۰۰۷ علیه فاکتور vWF[4] توسط شرکت دارویی Ablynx انجام شد. در حال حاضر شرکت‌های متعددی، تحقیقات به کارگیری نانوبادی‌ها را در زمینه‌های درمانی و تشخیصی آغاز نمودند. مطالعات در زمینه درمانی علیه بیماری‌هایی مانند خودایمنی، سرطان، تحلیل سیستم عصبی و ویروس‌ها انجام شده و بعضاً در حال انجام است. در جدول شماره ۱، مطالعات بالینی نانوبادی‌ها علیه بیماری‌های مختلف خلاصه شده است.

1. Atherosclerosis
2. Tumor necrosis factor
3. Rheumatoid arthritis
4. Von Willebrand factor

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

جدول شماره ۱: مطالعات کارآزمایی بالینی نانوبادی ها

نوع بیماری	نام محصول	آنتی ژن هدف	نوع نانوبادی	فاز بالینی	نتیجه مطالعه
التهابی (آرتریت روماتویید)- لوپوس	ALX-0061	رسپتور اینترلوکین۶	تک ظرفیتی واجد آنتی بادی آلبومین	II	تایید اثربخشی و سلامت دارو پس از ۲۴ ساعت- در حال بررسی در IIb تعیین میزان دوز دارو در حال بررسی
خود ایمنی (آرتریت روماتویید)	ATN-103 (Ozoralizumab), ATN-192	فاکتور نکروز دهنده تومور	دوظرفیتی انسانی بدون PEG دو ظرفیتی انسانی با PEG	II I	اتمام در فاز II اتمام در فاز یک
پسوریازیس	ALX-0761	اینترلوکین ۱۷	دو ظرفیتی واجد آنتی بادی آلبومین	I	اتمام در فاز یک
آسم	ALX-0962	ایمونوگلوبین E	تک ظرفیتی واجد آنتی بادی آلبومین	-	توقف در فاز پیش بالینی
آلزایمر	BI 1034020	آلفا بتا	دو ظرفیتی باPEG	II	توقف در فاز پیش بالینی
وون ویلبراند	(ALX-0081) Caplacizumab	vWF	دو ظرفیتی	III	در حال ورود به فاز سه
روتاویروس	ARP1	روتاویروس	یک ظرفیتی	II	اتمام در فاز دو
سرطان	ALX-0651	CXCR4	دو ظرفیتی	I	توقف در فاز یک
	ARP1	DR5	چهار ظرفیتی	I	به علت سمیت کبدی متوقف شد

نانوبادی ها به عنوان کوچک ترین قطعه آنتی بادی با قدرت اتصال مطلوب آنتی ژنی می‌باشند که به کمک تکنولوژی DNA نوترکیب به روش نمایش فاژی از لنفوسیت‌های شتر ایمن شده با آنتی‌ژن مورد نظر حاصل می‌گردند. ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مطلوب این مولکول‌های کوچک از قبیل تمایل اتصال بالا، ایمونوژنسیته پایین، پایداری بالا و بیان در سیستم‌های ساده و ارزان پروکاریوتی به منظور تولید انبوه فراورده‌های نوترکیب، امکان بهره‌گیری از آن‌ها را به عنوان مولکول بیولوژیک و جایگزین مناسب آنتی‌بادی‌های مونوکلونال رایج هموار نموده است. با توجه به موفقیت‌های حاصل شده از مطالعات نانوبادی ها علیه بیماری‌های مختلف در فازهای تحقیقات بالینی به نظر می‌رسد در آینده نزدیک، نانوبادی‌ها به عنوان اهدف دارویی و تشخیصی موثر در علوم پزشکی مطرح گردند.

References

1. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Bajyana Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light-chains. Nature 1993; 363(6428): 446-448.
2. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol 2001; 74(4): 277-302.
3. Unciti-Broceta JD, Del Castillo T, Soriano M, Magez S, Garcia-Salcedo JA. Novel therapy based on camelid nanobodies. Ther Deliv 2013; 4(10): 1321-1336.
4. Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. J Immunol 1991; 147(5): 1709-1719.
5. Omidfar K, Rasaee MJ, Kashanian S, Paknejad M, Bathaie Z. Studies of thermostability in Camelus bactrianus (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth factor receptor expressed by Pichia. Biotechnol Appl Biochem 2007; 46(pt 1): 41-49.
6. Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Lett 1997; 414(3): 521-526.
7. Rahbarizadeh F,Ahmadvand D, Sharifzadeh Z. Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting. Immunol Invest 2011;

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

40(3): 299-338.

8. Kolkman JA, Law DA. Nanobodies-from llamas to therapeutic proteins. Drug DiscovToday Technol. 2010; 7(2): 139-146.
9. Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, et al. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2006; 54(6): 1856-1866.
10. Carlos FB, Burton DR, Scott JK. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor. NY; 2001.
11. Moonens K, De Kerpel M, Coddens A, Cox E, Pardon E, Remaut H, et al. Nanobody mediated inhibition of attachment of F18 Fimbriae expressing Escherichia coli. PLoS One 2014; 9(12): e114691.
12. Moonens K, Gideonsson P, Subedi S, Bugaytsova J, Romaõ E, Mendez M, et al. Structural insight in the inhibition of adherence of F4 fimbriae producing enterotoxigenic Escherichia coli by llama single domain antibodies. Vet Res 2015; 46: 14.
13. Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bemmel AM, Niewold TA, van Zijderveld FG. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 72(3): 544-551.
14. Harmsen MM, van Solt CB, Hoogendoorn A, van Zijderveld FG, Niewold TA, van der Meulen J, et al. Escherichia coli F4 fimbriae specific llama single-domain antibody fragments effectively inhibit bacterial adhesion in vitro but poorly protect against diarrhoea. Vet Microbiol 2005; 111(1-2): 89-98.
15. Virdi V, Coddens A, De Buck S, Millet S, Goddeeris BM, Cox E, et al. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic Escherichia coli infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110(29): 11809-11814.
16. Szynol A, de Soet JJ, Sieben-van Tuyl E, Bos JW, Frenken LG. Bactericidal effects of a fusion protein of llama heavy-chain antibodies coupled to glucose oxidase on oral bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(9): 3390-3395.
17. Kruger C, Hultberg A, Marcotte H, HermansP, Bezemer S, Frenken LG,et al. Therapeutic effect of llama derived VHH fragments against Streptococcus mutans on the development of dental caries. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 72(4): 732-737.
18. Ardekani LS, Gargari SL, Rasooli I, Bazl MR, Mohammadi M, Ebrahimizadeh W, et al. A novel nanobody against urease activity of Helicobacter pylori. Int J Infect Dis 2013; 17(9): 723-728.
19. Conway JO, Sherwood LJ. Collazo MT, Garza JA. Hayhurst, A. Llama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptaplex immunoreagents. PLoS One 2010; 5(1): e8818.
20. Dong J, Thompson AA, Fan Y, Lou J, Conrad F, Ho M, et al. A single-domain llama antibody potently inhibits the enzymatic activity of botulinum neurotoxin by binding to the non-catalytic alpha-exosite binding region. J Mol Biol 2010; 397(4): 1106-1118.
21. Caljon G, Caveliers V, Lahoutte T,

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

Stijlemans B, Ghassabeh GH, Van Den Abbeele J, et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier. Br J Pharmacol 2012; 165(7): 2341-2353.

22. Baral TN, Magez S, Stijleman B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, et al. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. Nat Med 2006; 12(5): 580-584.
23. De Vooght L, Caljon G, De Ridder K, Van Den Abbeele J. Delivery of a functional anti-trypanosome Nanobody in different tsetse fly tissues via a bacterial symbiont Sodalis glossinidius. Microb Cell Fact 2014; 13: 156.
24. De Vooght L, Caljon G, Stijlemans B, De Baetselier P, Coosemans M, Van den Abbeele J. Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody(R) in Sodalis glossinidius. A bacterial symbiont of the tsetse fly. Microb Cell Fact 2012; 11: 23.
25. Vanlandschoot P, Stortelers C, Beirnaert E, Ibanez LI, Schepens B, Depla E, et al, Nanobodies(R): new ammunition to battle viruses. Antiviral Res 2011; 92(3): 389-407.
26. Wei G, Meng W, Guo H, Pan W, Liu J, Peng T, et al. Potent neutralization of influenza A virus by a single-domain antibody blocking M2 ion channel protein. PLoS One 2011; 6 (12): e28309.
27. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. Science 2008; 320(5874): 340-346.
28. Hultberg A, Temperton NJ, Rosseels V, Koenders M, Gonzalez-Pajuelo M. Schepens B, et al. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. PLoS One 2011; 6(4): e17665.
29. WyattR, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. Science 1998; 280 (5371): 1884-1888
30. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. Curr Opin Immunol 1997; 9(4): 551-562.
31. Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick M. B, Wang M, Chappey G, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. J Virol 2004; 78(23): 13232-13252.
32. Sanders RW, Venturi M, Schiffner L, Kalyanaraman R, Katinger H, Lloyd K O, et al. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. J Virol 2002; 76 (14): 7293-7305.
33. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessell AJ, Van Ryk D, Xiang SH, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. Nature 2007; 445 (7129): 732-737.
34. Forsman A, Beirnaert E, Aasa-Chapman MM, Hoorelbeke B, Hijazi K, Koh W, et al. Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. J Virol 2008; 82(24): 12069-12081.
35. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell 1997; 90(6): 1051-1060.
36. Vercruysse T, Pardon E, Vanstreels E, Steyaert J, Daelemans D. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. J Biol Chem 2010; 285(28): 21768-21780.

37. 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): 20565-20570.
38. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. J Clin Virol 2005; 34 (Suppl 1): S1-3.
39. Serruys B, Van Houtte F, Verbrugghe P, Leroux-Roels G, Vanlandschoot P. Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. Hepatology 2009; 49(1): 39-49.
40. Feld J, Lee JY, Locarnini S. New targets and possible new therapeutic approaches in the chemotherapy of chronic hepatitis B. Hepatology 2003; 38 (3): 545-553.
41. Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(17): 9849-9854
42. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon 1998; 36(6): 823-846.
43. Darvish M, Ebrahimi SA, Shahbazzadeh D, Bagheri KP, Behdani M, Shokrgozar MA. Camelid antivenom development and potential in vivo neutralization of Hottentotta saulcyi scorpion venom. Toxicon 2016; 113: 70-75.
44. Hmila I, Abderrazek RBA, Saeren D, Benlasfar Z, Conrath K, Ayeb ME, et al. VHH, bivalent domains and chimeric heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI. Mol Immunol 2008; 45(14): 3847-3856.
45. Hmila I, Saerens D, Abderrazek R, Vincke C, Abidi N, Benlasfar Z, et al. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. FASEB J 2010; 24(9): 3479-3489.
46. Abderrazek RB, Vincke C, Hmila I, Saerens D, Abidi N, El Ayeb M, et al. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahII10 nanobody with improved neutralization of AahII Scorpion toxin. Protein Eng Des Sel 2011; 24(9): 727-735.
47. Darvish M, Behdani M, Shokrgozar MA, Bagheri KP, Shahbazzadeh D. Development of protective agent against Hottentotta saulcyi venom using camelid single-domain antibody. Mol Immunol 2015; 68(pt B): 412-420.
48. Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh Moghadam M, Allameh AA, Sadroddiny E. Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybrid Hybridomics 2004; 23(3): 151-159.
49. Omidfar K, Amjad Zanjani FS, Hagh AG, Azizi MD, Rasouli SJ, Kashanian S. Efficient growth inhibition of EGFR over-expressing tumor cells by an anti-EGFR nanobody. Mol Biol Rep 2013; 40(12): 6737-6745.
50. Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, et al. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. Cancer Immunol Immunother 2007; 56(3): 303-317.
51. Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, el Khoulati R, de Bruin RC, Ferguson KM, et

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

al. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. Int J Cancer 2011; 129(8): 2013-2024.

52. Vosjan MJ, Vercammen J, Kolkman JA, Stigter-van Walsum M, Revets H, van Dongen GA, et al. Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. Mol Cancer Ther 2012; 11(4): 1017-1025.
53. Sha H, Zou Z, Xin K, Bian X, Cai X, Lu W, et al. Tumor-penetrating peptide fused EGFR single-domain antibody enhances cancer drug penetration into 3D multicellular spheroids and facilitates effective gastric cancer therapy. J Control Release 2015; 200: 188-200.
54. Kaczmarek JZ, Skottrup PD. Selection and characterization of camelid nanobodies towards urokinase-type plasminogen activator. Mol Immunol. 2015; 65(2): 384-390.
55. Van Impe K, Bethuyne J, Cool S, Impens F, Ruano-Gallego D, De Wever O A, et al. nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. Breast Cancer Res 2013; 15(6): R116.
56. Oliveira S, Heukers R, Sornkom J, Kok RJ, van Bergen En Henegouwen PM. Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. J Control Release 2013; 172(3): 607-617.
57. Fang T, Duarte JN, Ling J, Li Z, Guzman JS, Ploegh HL. Structurally Defined alphaMHC-II Nanobody-Drug Conjugates: A Therapeutic and Imaging System for B-Cell Lymphoma. Angew Chem Int Ed Engl 2016; 55(7): 2416-2420.
58. Iri-Sofla FJ, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Rasaee MJ. Nanobody-based chimeric receptor gene integration in Jurkat cells mediated by phiC31 integrase. Exp Cell Res 2011; 317(18): 2630-2641.
59. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 2008; 358(11): 1160-1174.
60. Oliveira S, Schiffelers RM, van der Veeken J, van der Meel R, Vongpromek R, van Bergen En Henegouwen PM, et al. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. J Control Release 2010; 145(2): 165-175.
61. Melancon M, Lu W, Li C. Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy. Mater Res Bull. 2009; 34(6): 415-421.
62. Kazhdan I, Long L, Montellano R, Cavazos DA, Marciniak RA. Targeted gene therapy for breast cancer with truncated Bid. Cancer Gene Ther 2006; 13(2): 141-149.
63. Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, Wagner E. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/ DNA complexes. J Control Release 2003; 91(1-2): 173-181.
64. Parhamifar L, Sime W, Yudina Y, Vilhardt F, Mörgelin M, Sjölander A. Ligand-induced tyrosine phosphorylation of cysteinyl leukotriene receptor 1 triggers internalization and signaling in intestinal epithelial cells. PLoS One 2010; 5(12): e14439.
65. Sadeqzadeh E, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Rasaee MJ, Parhamifar L, Moghimi SM. Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells. J Control Release 2011; 156(1): 85-91.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 2:12 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

66. Wang, RX. Colgan SP. Special pro-resolving mediator (SPM) actions in regulating gastro-intestinal inflammation and gut mucosal immune responses. Mol Aspects Med. 2017.
67. Kratz F, Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. J Control Release 2012; 161(2): 429-445.
68. Giersberg M, Floss DM, Kipriyanov S, Conrad U, Scheller J. Covalent dimerization of camelidae anti-human TNF-alpha single domain antibodies by the constant kappa light chain domain improves neutralizing activity. Biotechnol Bioeng 2010; 106(1): 161-166.
69. Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, et al. Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. Mucosal Immunol 2010; 3(1): 49-56.
70. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 2003; 3(9): 745-756.
71. Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. Cytokine Growth Factor Rev 2011; 22(5-6): 311-319.
72. Bradley ME, Dombrecht B, Manini J, Willis J, Vlerick D, De Taeye S, et al. Potent and efficacious inhibition of CXCR2 signaling by biparatopic nanobodies combining two distinct modes of action. Mol Pharmacol 2015; 87(2): 251-262
73. Klooster R, Maassen BT, Stam JC, Hermans PW, Ten Haaft MR, Detmers FJ, et al. Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology. J Immunol Methods 2007; 324(1-2): 1-12.