

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).

نانوبادی و کاربردهای درمانی آن

مریم درویش

چکیده

سابقه و هدف: بازار دارویی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از زمان تایید آنتی‌بادی 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 نو ترکیب مشتق می‌گردد که به نانوبادی نیز موسوم است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ما به خلاصه‌ای از خصوصیات ساختاری و عملکردی ویژه نانوبادی‌ها می‌پردازیم. قسمت مهم این مقاله به بررسی تعدادی از کاربردهای درمانی نانوبادی علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها از قبیل بیماری‌های عفونی، سموم حیوانات، بیماری‌های خودایمنی و سرطان در قالب سه فرمت مختلف عملکردی می‌پردازد. در این مقاله مروری، اطلاعات مربوط به ویژگی‌های ساختاری-عملکردی نانوبادی‌ها و اثرات درمانی آن‌ها از مقالات نمایه شده در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed, Science direct, Google scholar استخراج گردیده است.

یافته‌ها: ایجاد و به کارگیری نانوبادی‌ها در پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی این مولکول‌های زیستی، آن‌ها 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 توپ‌های مخفی، ایمونوژنسیته پایین و تولید مقرون به صرفه آن‌ها می‌باشد.

استنتاج: مقاله حاضر، بررسی اجمالی از موفقیت‌ها و کارآیی نانوبادی‌ها به عنوان یک عامل درمانی امیدبخش تر نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول علیه بیماری‌های مختلف فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: نانوبادی، VHH، نمایش فاژی، آنتی‌بادی مونوکلونال

مقدمه

و علاوه بر آن‌ها وجود دارند، بر خلاف آنتی‌بادی‌های کلاسیک (IgG) که چهار زنجیره‌ای (هتروترامر) 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

آنتی‌بادی‌های شتری ایزوتیپی از ایمونوگلوبین G می‌باشند که در سرم برخی از شترسانان مانند Camels, Alpaca, Llama, 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

E-mail: Maryam_darvish@yahoo.com

مؤلف مسئول: مریم درویش - اراک: میدان بسیج، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

استادیار، بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۲۴

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲

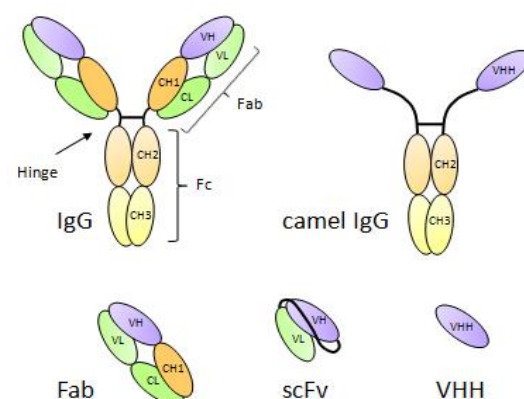
کم‌تر است. با این وجود، کاربرد این داروها در برخی موارد با عوارض جانبی همراه است. از طرفی هزینه بالای آن‌ها، بودجه زیادی را به بیماران متحمل می‌نماید. برخی از محدودیت‌های کاربرد این آنتی‌بادی‌ها عبارتند از ۱- اندازه بزرگ (۱۵۰ کیلو دالتون)، که قدرت نفوذ آن‌ها را به بافت‌ها و سلول‌های هدف کاهش می‌دهد و ۲- ایجاد پاسخ ایمنی در میزبان که کاهش عملکرد بیولوژیک را در پی 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 اتصال مناسب به آنتی‌ژن مانند ^5Fv ، $^6\text{scFv}$ ، ^7Fab 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 می‌باشد که آن‌ها را از آنتی‌بادی‌های معمول متمایز ساخته و استفاده از آن‌ها را برای اهداف درمانی و تشخیصی توجیه می‌نماید. در ادامه به برخی از خصوصیات منحصر به فرد این آنتی‌بادی‌ها می‌پردازیم.

ساختار و ویژگی‌های VHH

از لحاظ ساختاری، آنتی‌بادی‌های تک دومینی مانند آنتی‌بادی‌های معمول، دارای ۴ ناحیه حفاظت شده یا FR می‌باشند که به وسیله سه ناحیه CDR^۵ احاطه شده‌اند. ناحیه CDR3 در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن 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

می‌باشد. دو ناحیه قسمت ثابت (CH2 و CH3)^۱ مانند آنتی‌بادی‌های کلاسیک در این آنتی‌بادی‌ها وجود دارند، اما دومین مربوط به CH1 در این آنتی‌بادی‌ها حضور ندارد. بنابراین ناحیه متغیر^۲ متصل شونده به آنتی‌ژن (Fragment antigen binding) در این آنتی‌بادی‌ها به یک دومین زنجیره سنگین ختم می‌شود که دارد (تصویر شماره ۱) و به وسیله بازو^۳ به قسمت ^4Fc متصل می‌شود. بنابراین قطعه VHH به‌عنوان کوچک‌ترین واحد عملکردی یک آنتی‌بادی (حتی در عدم حضور زنجیره سبک) برای اتصال به آنتی‌ژن معرفی شده است که به single domain نیز مشهور است (۲).



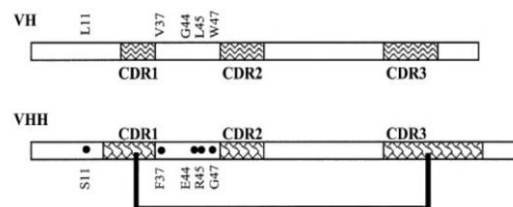
تصویر شماره ۱: آنتی‌بادی‌های معمولی، قطعات مختلف آن‌ها و آنتی‌بادی شتری

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 آنتی‌بادی دارند. در کل، عوارض جانبی داروهای حاصل از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در مقایسه با داروهای شیمیایی بسیار

5. Fragment variable
6. Single chain variable fragment
7. Framework Region
8. Complementary Determining Region

1. Constant
2. Variables
3. Hinge
4. Fragment crystalline

که این تفاوت به علت فقدان زنجیره سبک در ناحیه متغیر VHH می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها به لحاظ توالی اسید آمینه‌ای 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. همان‌طور که 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 VH و VHH

در حقیقت پارامترهای فیزیکوشیمیایی مطلوب VHH سبب کاربردهای فراوان آن در علوم 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 (۶، ۷). پروتئین بیان شده از قطعه VHH با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون که دارای ابعادی در مقیاس نانومتر می‌باشد (ارتفاع ۴/۸ نانومتر و قطر ۲/۲

نانومتر)، اولین بار توسط شرکت Ablynx به نانوبادی^۱ معروف شد (۸). درحقیقت سازه 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 و کلونینگ مخازن ژنی کلون‌های لئوسیتی ایجاد شده به کمک روش نمایش فاژی^۲ قابل دستیابی است. در مجموع خصوصیات بیوشیمیایی و فارماکوکینتیک نانوبادی‌ها، این مولکول‌های کوچک را به عنوان ابزار ایده‌آل برای دارو رسانی هدفمند، ایمونوتراپی و تشخیص پزشکی تبدیل نموده است.

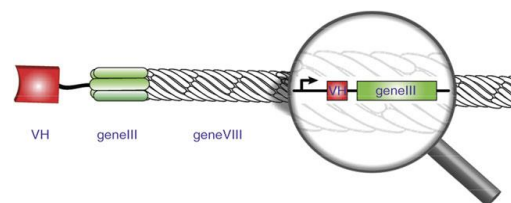
روش نمایش فاژی

روش نمایش فاژی در سال ۱۹۸۵ توسط George Smith ابداع شد. امروزه این روش کاربردهای گوناگونی در زمینه واکنش‌های لیگاند - ریسپتور 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^۳ از کتابخانه آنتی‌بادی مورد نظر است (۱۰). در این روش، قطعه ژنی تکثیر یافته از نواحی متغیر، آنتی‌بادی‌های حاصل از لئوسیت‌های نمونه مورد نظر 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

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 نو ترکیب کنار ژن III فاز رشته ای

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مروری، جست‌وجوی الکترونیکی مقالات از پایگاه‌های اینترنتی Science direct, Google scholar 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 مورد نظر براساس عنوان و چکیده مرتبط با موضوع پژوهش انتخاب گردید.

یافته‌ها

بر اساس تعریف WHO¹ 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 مهار نانوبادی علیه عوامل عفونی

الف- نقش مهار نانوبادی علیه باکتری‌ها

به منظور مبارزه با عفونت‌های باکتریایی توسط نانوبادی‌ها، استراتژی‌های مهار 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 آدهسین به نام پیلی^۲ است که در سطح باکتری بیان می‌گردد. نوعی Fimbriae (F18) در مرحله اول عفونت‌زایی باکتری ETEC سبب اتصال باکتری به رسپتور لکترین 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 آدهسین F4 را نیز کد می‌کند. به منظور جلوگیری از پروتئولیز نانوبادی در سیستم گوارشی میزبان، نانوبادی K922 به کمک نو ترکیبی 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 IgA Fc به نانوبادی مهار 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).

2. Fimbriae

1. World Health Organization

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 پیشگیری کننده پوسیدگی دندان که توسط سویه فوق ایجاد می‌گردد، به کار گرفته شود. هم‌چنین نانوبادی موثر و مهارى S36 نیز علیه این فاکتور ایجاد شد که علاوه بر دارا بودن تمایل اتصال نقش حفاظتی آن در مدل حیوانی نیز به اثبات رسید (۱۵، ۱۶). از آن‌جا که نانوبادی‌ها دارای اندازه کوچک می‌باشند، استفاده از سازه‌های چندظرفیتی آن‌ها نقش ویژه‌ای 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 می‌گردد، حساسیت آنتی‌بیوتیکی را از بین می‌برد. بنابراین استراتژی موثر دیگر، به کارگیری نانوبادی علیه عوامل بیماری‌زا مانند آنزیم‌های ترشحی یا توکسین‌های باکتریایی است. نانوبادی مهارى علیه دو نوع از این آنزیم‌ها به نام TEM-1 و BcII سبب مهار مقاومت آنتی‌بیوتیک 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 مهارى علیه زیر واحد UreC باکتری فعالیت اوره آز باکتری را در محیط معده متوقف می‌نماید. این تحقیق می‌تواند به عنوان درمانی جدید علیه این عفونت در جوامع انسانی مطرح گردد (۱۸).

باکتری کلستری‌دیوم بوتولینوم^۱ دارای نورو توکسین بوتولینوم^۲ BoNT^۲ است که از طریق استنشاق یا

خوراکی وارد بدن انسان می‌شود. این توکسین یک عامل مهار کننده 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^۳ 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 اتصال بالایی اتصال این مولکول‌های کوچک در این زمینه، نانوبادی خنثی کننده پروتئاز گزارش شده است (۱۹، ۲۰).

ب- نقش مهارى 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 اپی توپ‌های متغیر گلیکوپروتئین سطحی اختصاصی (VSG)^۴ 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 اپی توپ‌های حفاظت شده مخفی و غیر ایمونوژن است. هدف گیری این اپی توپ‌ها 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 به کارگیری سیستم‌های رهایش دارو مانند سیکلودکسترین به همراه نانوبادی^{۳۳} و داروی ضد

2. Botulinum neurotoxin

3. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors

4. variant-specific surface glycoprotein

1. Clostridium botulinum

ویروس آنفلوانزا^۱

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 مهارى 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 هم‌آگلوتینین (HA)^۲ می‌باشد که مسئول اتصال و ورود به سلول میزبان می‌باشد. تغییر آنتی ژنیک این فاکتور همراه با اپیدمی فرامنطقه‌ای است (۲۵، ۲۶).

البته واکسن پیشگیری کننده فصلی علیه ویروس وجود دارد که دارای ترکیب آنتی ژنی 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 مکزیکى 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 هم‌آگلوتینین به اسید سیالیک و نقش حفاظتی نانوبادی دو ظرفیتی ویروس نسبت به فرم مونومر در شرایط پروتئین بود (۲۸).

انگل سبب افزایش فعالیت تریپانوزولیتیک شده و میزان دوز مهارى 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 جزئی از HDL و مارکر طبیعی سرم انسان است، انجام شد. این بیومارکر علاوه بر تاثیر بر روی عفونت‌های باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت، ایجاد ایمنی ذاتی می‌نماید 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، نو ترکیب مانع انتقال فرم کامل انگل می‌گردد (۲۳، ۲۴).

ج- نقش مهارى نانوبادی علیه ویروس‌ها

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 هدف‌گیری اپی‌توپ‌ها راه حل مناسبی است که نه تنها سبب افزایش میزان خنثی‌سازی ویروس می‌گردد، بلکه از فرار ویروس نیز جلوگیری می‌نماید. نانوبادی‌های پیشگیری کننده مانند لاکتوباسیل تغییر بیان یافته یا لاکتوبادی‌ها، سبب مهار اتصال ویروس می‌گردند (۲۵). در این زمینه به بحث در مورد ویروس‌های آنفلوانزا، نقص ایمنی اکتسابی و هپاتیت B در انسان می‌پردازیم:

1. Influenza virus
2. Hemagglutinin

ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV)^۱

ویروس نقص ایمنی اکتسابی از سال ۱۹۸۱ در بسیاری از نقاط دنیا باعث ایدز (AIDS)^۲ و مرگ بیش از ۲۵ میلیون نفر گردیده است. این بیماری توسط نوعی رتروویروس حاوی RNA ایجاد می گردد. اگرچه درمان کنونی، قادر به مهار همانندسازی ویروس است، اما منجر به ریشه کنی کامل ویروس نمی گردد. علاوه بر عوارض جانبی، هزینه ها و مقاومت دارویی مزید بر علت می باشد. 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 می نماید. پروتئین های ویروس شامل ریورس ترانس کریپتاز، اینتگرز، پروتئاز، gp41 و CCR5 می باشد. ورود ویروس به سلول به وسیله گلیکوپروتئین تراپمر پوششی ویروس gp120 انجام می گردد. پروتئین gp120 به سطح سلول CD4 میزبان متصل شده و با تغییرات کانفورمیشنی سبب اتصال gp41 به غشا پلاسمایی می گردد. روش مهاری موثر برای کنترل اپیدمیک در سراسر دنیا، ایجاد واکسن فرا منطقه ای است که مانع ورود و انتقال ویروس گردد که عملاً تولید چنین واکسنی دشوار است (۲۹، ۳۰). در حال حاضر تعداد آنتی بادی های مونوکلونال با خاصیت خنثی سازی وسیع ویروس محدود است (۳۱). دو آنتی بادی مونوکلونال 2G12، b12 علیه گلیکوپروتئین gp120 و آنتی بادی های 4E10، 2F5 علیه گلیکوپروتئین gp41 از سرم افراد عفونی شده زیر نوع B (فرم غالب در افراد اروپایی و آمریکایی) جدا گردید (۳۲، ۳۳). با این وجود، ایمنی زایی با ویروس نوترکیب gp120 و gp41 منجر به ایجاد آنتی بادی های خنثی کننده با طیف وسیع نگردید. به نظر می رسد نانوبادی ها با اندازه کوچک و بهره گیری از CD3 طویل خود بتوانند به اپی توپ های مخفی ویروس دسترسی داشته باشند. نتایج موید نقش خنثی سازی ویروس توسط نانوبادی بود که با آنتی بادی

مونوکلونال قابل مقایسه بود (۳۴). بنابراین می توان 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 هسته ای آن به نام CRM-1 عمل می نماید (۳۵). در واقع پروتئین Rev، عناصر پاسخ دهنده به ویروس RRE^۳ ساختارهای ثانویه RNA را بر روی ویروس پردازش نشده شناسایی می نماید. بنابراین نانوبادی مهاری که مانع اینتراکشن Rev با CRM و یا Rev با RRE گردد، سبب مهار همانندسازی ویروس می گردد. با توجه به نقش مهم این پروتئین در همانندسازی ویروس، می توان برای هدف گیری درمانی از آن بهره جست. هم چنین اینتراکشن Rev-Rev و مولتی مریزاسیون Rev می گردد و تشکیل کمپلکس خروج هسته ای ویروس و تولید HIV سلولی را مهار می نماید (۳۶).

Nef^۴ پروتئین ساختاری چندعملکردی و به عنوان فاکتور بیماری زای دیگر ویروس می باشد که برای عفونت زایی کامل ویروس ضروری است. این پروتئین بیش تر در اطراف هسته وجود دارد و سبب کاهش بیان CD4 و MHC I، سیگنالینگ سلولی و افزایش عفونت زایی ذرات ویروس می گردد که به طور مستقل از مکانیسم CD4 عمل می نمایند. بنابراین هدف گیری این فاکتور نیز نقش مهمی در مهار ویروس دارد. در مجموع نانوبادی نقش مداخله کننده در عملکرد Nef در شرایط درون تنی و برون تنی نشان داد (۳۷).

ویروس هپاتیت B

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

3. Rev responsive element
4. Negative factor

1. Human Immunodeficiency Virus
2. Acquired immunodeficiency syndrome

پیشگیری کننده، درمان های مبتنی بر اینترفرون و مهار کننده های ریورس ترانسکریپتاز، تنها درمان تایید شده می باشد. 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 کد کننده نانوبادی در وکتور بیانی که دارای توالی هدف شبکه آندوپلاسمی و سیگنال KDEL است، قرار گرفت. نتایج ترانزفکت همزمان سلول های هپاتوما به وسیله پلاسمید بیان کننده ویروس و نانوبادی وجود نانوبادی در شبکه آندوپلاسمی 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).

نوکلئوکسپید ویروس یک هدف آنتی ژنی دیگر برای مهار ویروس است. نوکلئوکسپید در سیتوپلاسم به وسیله ۱۸۰-۲۴۰ پروتئین تشکیل می گردد. نوکلئوکسپید جهت اینتراکشن با لوپ سیتوپلاسمی پروتئین های غشا ویروس به سمت شبکه آندوپلاسمی حرکت می کند و منجر به جوانه زدن ویروس در مسیر ترشحی می گردد 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 می رسد که نوکلئوکسپید نیز هدف مناسب مهار نانوبادی قرار گیرد (۳۹).

۲- نقش مهار نانوبادی به عنوان پادزهر

در حال حاضر درمان موثر برای عقرب گزیدگی و مار گزیدگی، ایمونوتراپی غیر فعال با آنتی بادی های پلی کلونال حاصل از ایمن سازی اسب ها با سم این

موجودات است. این آنتی سرم ها 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 عقرب گزیدگی، درمان با آنتی سرم با محدودیت های فراوانی از قبیل اندازه بزرگ آنتی بادی های پلی کلونال است که مانع از توزیع سریع و انتشار آن برای خنثی کنندگی مولکول های سم در بدن می گردد. علاوه بر این، علیرغم جداسازی قسمت ثابت و کاهش اثرات جانبی مضر، ازدیاد حساسیت نوع ۱، ۳، شوک آنافیلاکسی و بیماری سرم از محدودیت های اجتناب ناپذیر سرم درمانی است (۴۲). نتایج حاصل از ایمن سازی شتر با سم عقرب ایرانی *Hottentotta saulcyi* نشان داد که مولکول های سم، قادر به ایجاد پاسخ ایمنی بودند و آنتی بادی 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 خنثی سازی اثرات سم عقرب را داشت (۴۳). امروزه استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال می تواند به عنوان یک جایگزین مناسب جهت درمان گزش جانوران توکسیک مطرح گردد که با ابداع روش های جدید مولکولی، پیشرفت های بسیاری در علوم پزشکی و ایمونوتراپی فراهم آورده است. علاوه بر استفاده از قطعات مختلف آنتی بادی علیه سم، نتایج به کارگیری نانوبادی علیه سم، نتایج مطلوبی در ایمونوتراپی داشته است: در سال ۲۰۰۸، نانوبادی علیه فراکشن اصلی سم عقرب (*AaH I' 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 نانوبادی های bispecific بود که به منظور خنثی سازی همزمان دو فراکشن *AaH I/AaH II* سم عقرب مزبور و با هدف بهینه سازی پارامترهای بیولوژیک انجام شد (۴۵). یکی از استراتژی های کاهش ایمونوژنسیته

نانوبادی، انسانی کردن^۱ توالی آن می باشد که با ایجاد موتاسیون برخی اسیدهای آمینه انجام شد (۴۶).

در ایران نیز طی دهه گذشته همزمان با به کارگیری نانوبادی ها، گزارش هایی مبنی بر استفاده از نانوبادی ها علیه سم عقرب ایرانی صورت گرفته است که نتایج رضایت بخشی در مقیاس آزمایشگاهی داشته است:

نتایج حاصل از اثر خنثی کنندگی نانوبادی علیه سم عقرب ایرانی *Hottentotta saulcyi* در شرایط برون تنی نشان داد که اولاً نانوبادی ۱۲ در غلظت ۴۵ میکروگرم قادر به خنثی کنندگی یک دوز کشنده سم (2LD₅₀) در موش های C57/BL بود. ثانیاً نه تنها این نانوبادی قادر به خنثی کنندگی یک دوز کشنده بود، بلکه در غلظت ۱۴۰ میکروگرم، اثرات توکسیک سم را در موش های چالش شده با سم عقرب حداکثر تا 5LD₅₀ خنثی نمود. ثالثاً: طراحی یک روش شبیه سازی عقرب گزیدگی طبیعی در مدل موشی نشان داد که نانوبادی حتی در زمان ۲۰ دقیقه پس از تزریق یک دوز کشنده سم و بروز علائم عقرب گزیدگی قادر به خنثی کنندگی اثرات توکسیک سم بود. نتایج حاصل از اثر خنثی کنندگی سم با نانوبادی نقش محافظتی نانوبادی را در مقابل اثرات توکسیک ونوم عقرب تایید نمود (۴۷).

۳- نقش مهارت نانوبادی در درمان سرطان

در حال حاضر نقش بیولوژیکی آنتی بادی های مونوکلونال در درمان سرطان از طریق دومین عملکردی آنها و با فعالیت ADCC^۲ و CDC^۳ می باشد. با این وجود ساینز بزرگ این مولکول ها نفوذ بافتی آنها را برای اتصال به هدف مورد نظر محدود ساخته است. نانوبادی ها می توانند به عنوان یک جایگزین موثرتر برای اهداف درمانی مطرح شوند. آنها قادرند به صورت هوموژن در بافت های توموری به عنوان یک ماده ضد سرطان و آنتاگونیست دارویی عمل نمایند. در حال

حاضر داروهای مبتنی بر نانوبادی به ۳ طریق نقش عملکردی خود را در این زمینه ایفا می نمایند:

- ۱- هدف گیری به عنوان آنتاگونیست دارویی
- ۲- هدف گیری به واسطه اتصال به جزء عملکردی
- ۳- هدف گیری به واسطه قرارگیری در سطح نانوذرات ارائه دهنده دارو

نقش آنتاگونیستی نانوبادی ها

اولین کاربرد نانوبادی ها به عنوان آنتاگونیست های درمانی، برای پروتئین های افزایش بیان یافته سطح سلول های 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 نانوبادی ها علیه آنتی ژن های مختلف انجام شده است:

یکی از این موارد، فاکتور رشد اپیدرمی EGFR^۴ می باشد که عامل بسیاری از سرطان های کارسینومایی است و در ۳۰ درصد از سرطان های سینه و ۱۰-۳۰ درصد از سرطان های مری و معده فعال می شود. نانوبادی های آنتاگونیست قادرند رشد تومور را از طریق توقف مسیر سیگنالینگ و القا آپوپتوز ایجاد نمایند. در حال حاضر، دو آنتی بادی مونوکلونال cetuximab و matuzumab برای مهار این فاکتور توموری به کار 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 نمایند (۴۹-۵۱).

c-MET رسپتور تیروزین کیناز فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF) است. هدف گیری همزمان دو فاکتور رشد کبدی و رسپتور آن به طور موثرتری مسیر

4. Epidermal Growth Factor Receptor

1. Humanization
2. Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
3. Complement Dependent Cytotoxicity

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 هم‌افزایی در مهار مسیر سیگنالینگ و کاهش مقاومت دارویی می‌گردد (۵۲). اتصال موتیف پپتید نفوذ کننده بافت توموری (RDG) به نانوبادی سبب افزایش قدرت نانوبادی مهار کننده EGFR در شرایط درون تنی و برون تنی می‌گردد (۵۳). یکی از ویژگی‌های بافت توموری، عدم چسبندگی سلول‌ها به ماتریکس و متعاقباً متاستاز و تهاجم آن به بافت‌های دیگر است. اینتگرین آلفا-۳ (VLA-3) از خانواده رسپتورهای اینتگرینی است که در چسبندگی سلول‌ها به ماتریکس حائز اهمیت است و در روند سرطان دچار اختلال می‌گردد. بنابراین نانوبادی مهاریه علیه این رسپتور از پیشروی سرطان و متاستاز جلوگیری می‌نماید (۷۲). بنابراین سیتواسکلت سلولی تغییر یافته در سرطان می‌تواند هدف دیگری برای عملکرد نانوبادی‌ها باشد (۵۵، ۵۷).

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 باعث کاهش اثرات توکسیک سیستمیک دارو می‌گردد (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 نو ترکیب نانوبادی و ژن اپوپتوتیک TRAIL علیه EGFR یک استراتژی موفق دیگر جهت رهاسازی نانوبادی اپوپتوتیک از سلول‌های بنیادی عصبی در ناحیه تومور است. بنابراین سازه مزبور هم سبب

مرگ سلول توموری می‌گردد 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 کایمیریک (CARs)^۱ به وسیله یک جز تارگت کننده مانند نانوبادی می‌باشد. این مکانیسم فعال‌سازی، غیر وابسته به MHC می‌باشد که به معنای ایمنوتراپی به‌وسیله انتقال لنفوسیت‌های T (T-body) اختصاصی آنتی ژن توموری به بیمار می‌باشد. رسپتور آنتی ژنی کایمیریک شامل یک دومین شناسایی کننده 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 می‌کند. منطقه اتصال به آنتی ژن، این لنفوسیت‌ها را قادر می‌سازد که علاوه بر اتصال به آنتی ژن‌های توموری به ای‌تی‌وپ‌هایی که به وسیله TCR معمولی شناسایی نمی‌شوند، پاسخ دهند. در این روش، لنفوسیت‌های T، نفوذ بهینه به تومور، رهایی سیتوکین و سیتوتوکسیسیته را فراهم می‌آورند و نانوبادی، هدف‌گیری اختصاصی آنتی ژن را به‌واسطه اندازه کوچک و کاهش ایمنوژنسیته فراهم می‌آورد. اتصال نانوبادی به دومین انتقال پیام لنفوسیت T توسط ناحیه بازو انجام می‌گردد. اتصال ژن خودکشی کننده در ساختار CAR مانع از توکسیسیته به سلول‌های سالم می‌گردد. لنفوسیت‌های مهندسی شده بیان کننده رسپتور آنتی ژنی کایمیریک سبب لیز سلول توموری می‌گردد؛ نمونه بارز لنفوسیت اختصاصی MUC1 و گلیکوپروتئین همراه تومور TAG72 و HER2 می‌باشند که به‌طور پایداری، رسپتور کایمیریک را در شرایط درون تنی بیان می‌کنند (۵۸).

مهار تومور به کمک نانوبادی‌های 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

نانوذرات از طریق شیمیایی متصل نموده و در داخل این مجموعه کپسول مانند داروی مورد نظر را بارگذاری می نمایند. 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 می گردد. همچنین امکان بارگذاری بیش تر داروها را فراهم آورده و سبب کاهش دفعات دارودهی و ایمنونژنسیته می گردد. در این میان سیستم های مبتنی بر لیپوزوم بیش تر استفاده شده اند که شامل دولایه فسفولیپیدی با حفره مرکزی جهت بارگیری مولکول زیستی و بهینه سازی پارامترهای فارماکوکینتیک رهایی دارو می باشند. مزیت دیگر چنین سیستم های بزرگ نانوبادی-نانوذرات، افزایش ماندگاری دارو در بدن می باشد که با توجه به خصوصیت نفوذ افزایش یافته بافت توموری (EPR)^۱ مشکل اندازه چنین سیستم هایی مرتفع می گردد و نانوبادی نیز سبب مهار رشد تومور می گردد (۵۶).

مورد دیگر، اتصال نانوبادی به سیستم حامل دارویی متشکل از نانوبادی و لیپوزوم پگیله شده است که مسیر سیگنالیک EGFR را هدف می گیرد و سبب مهار سرطان های کولون، ریه، پانکراس و سرطان اپی تلیال می گردد. در این زمینه دو رویکرد مهاری وجود دارد. در رویکرد خارجی، آنتی ادی مونوکلونال برای اتصال به لیگاند رقابت می نماید و در رویکرد داخلی، مهارکننده های تیروزین کینازها هستند که با ATP برای اتصال رقابت می نمایند (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 می گردد و تکثیر سلول را مهار می نماید. داروی دوکسوروبیسین نیز سبب افزایش اثربخشی فرمولاسیون دارویی می گردد. به این ترتیب که لیپوزوم داروی مزبور را در بافت هدف بسته

به شرایط فیزیکیوشیمی رها می نماید و نانوبادی آزاد شده سبب مهار بیان EGFR می گردد، 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 مادون قرمز انجام می گیرد. در این محدوده تومورها جذب کم و نانوذرات طلا جذب خوبی دارند. گرمای ایجاد شده سبب تخریب تومور می گردد. از آن جا که نانوبادی قابلیت پایداری در شرایط بالای دمایی را داراست، می توان از آن به عنوان لیگاند مناسبی برای هدف گیری بافت توموری به واسطه نانوذرات طلا بهره جست (۶۱).

روش درمانی اخیر مبتنی بر پروتئین های طبیعی یا پروآپوپتوزیس برای ژن درمانی سرطان و القا آپوپتوز است. مثال بارز در این زمینه، استفاده از پروتئین پروآپوپتوتیک کوتاه شده tBid^۲ 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 ژن های سرطانی قابل بیان است (۶۲). استراتژی مبتنی بر نانوبادی با استفاده از این نوع پروموتور، رویکردی مناسب برای ژن درمانی هدفمند سرطان است. از طرفی استفاده از پلی کاتیون های PEI^۳ امکان بارگذاری مولکول DNA را به میزان زیادی فراهم می آورد که کونژوگاسیون آن با پلی اتیلن گلیکول سبب رهاسازی موثر مولکول های زیستی می گردد (۶۳، ۶۴). بر این اساس صادق زاده 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 سلول های توموری بیان کننده MUC1 القا نمایند. به این ترتیب نانوبادی به کمک روش ژن درمانی برای رهایی ترانزژن آپوپتوتیک به کار رفت (۶۵).

2. Truncated Bid
3. Polyethylenimine polyplex

1. Enhanced permeability and retention

۴- نقش مهاري نانوبادی علیه بیماری های خودایمنی

التهاب به معنای افزایش غیرطبیعی پاسخ سیستم ایمنی بدن علیه آسیب یا عفونت می باشد که به دو دسته حاد و مزمن تقسیم می گردد. التهاب حاد به منظور حفظ هموستازی ایجاد می گردد و در صورت تداوم سبب ایجاد التهاب مزمن می گردد که اساس پیدایش بیماری های خودایمنی و آترواسکلروز^۱ و غیره می گردد (۶۶). داروهای ضد التهاب که در روند مکانیسم آبشاری التهاب تداخل ایجاد می نمایند، در سطح مهار سیتوکین ها عمل می نمایند. به علاوه G پروتئین های متصل به رسپتور نیز به عنوان یکی دیگر از اهداف بیماری های خودایمنی مطرح هستند چرا که در بیش تر سلول ها و بافت های درگیر در التهاب های حاد و مزمن بیان می شوند. با این وجود موفقیت داروهای رایج در هدف گیری این نوع رسپتور کافی نیست. از طرفی امروزه تحقیقات جدید، جزئیات بیش تری از ساختار این نوع رسپتورها را کشف نموده است که امکان طراحی داروهای جدید را فراهم می آورد. از میان این داروها می توان مولکول های کوچک و موثر مانند نانوبادی ها را نام برد که امکان هدف گیری دقیق این پروتئین ها را فراهم می آورد.

یکی از عوامل ایجادکننده التهاب، فاکتور نکروزدهنده تومور TNF^۲ است که نقش مهمی در التهاب و بیماری های خودایمنی دارد و سبب بیماری آرتریت روماتوئید RA^۳ همراه با التهاب مزمن می گردد. درمان رایج آنتی بادی های مونوکلونال infliximab و adalimumab علیه TNF-a و IL-6R است. نتایج به کارگیری نانوبادی ها برای مهار این رسپتورها در فاز بالینی موفقیت آمیز بوده که می تواند گامی موثر برای کاهش هزینه های درمان کنونی گردند.

تحقیقات دیگر نشان داد که نانوبادی هایی که به طور انتخابی TNF1 را هدف قرار دهد، موثرتر می باشند. دلیل این موضوع این است که سیگنال TNF از طریق

دو رسپتور TNFR1 و TNFR2 عمل می نماید که اولی در مکانیسم های پیش التهابی و مورد دوم نقش تنظیم کننده ایمنی دارد. بنابراین مهارکننده هایی که TNFR2 را نیز هدف قرار دهند، منجر به عوارض جانبی می گردند. در این زمینه چندین نانوبادی علیه TNF در فازهای مختلف بالینی در حال انجام است (جدول شماره ۱) (۶۷-۷۱).

رسپتورهای کموکائینی هدف مهم دارویی دیگر برای مهار بیماری های التهابی مانند آسم، آرتریت روماتوئید و اسکلروزیس چندگانه توسط نانوبادی ها می باشند (۷۲). از آنجاکه در برخی از بیماری های خودایمنی، اتو آنتی بادی علیه IgG ایجاد می گردد، حذف اتو آنتی بادی در مهار این نوع بیماری ها موثر است. تکنیک جدید برای حذف این آنتی بادی ها، استفاده از پلاسمافریزیس است که بیماران لوپوس اریتروماتوزیس و Goodpasture syndrome با همودیالیز درمان شدند. در این روش، اتوایمونوگلوبین IgG به کمک ستون های پوشیده شده با نانوبادی علیه IgG به خوبی حذف شدند (۷۳).

تحقیقات نانوبادی ها در فازهای مختلف کارآزمایی بالینی با توجه به قابلیت های ویژه نانوبادی ها در اتصال به آنتی ژن و پارامترهای فیزیکی شیمیایی برجسته دیگر، تحقیقات بسیاری در دهه اخیر در فازهای بالینی علیه آنتی ژن های مختلف آغاز شده و در حال انجام است. اولین مطالعه در سال ۲۰۰۷ علیه فاکتور vWF^۴ توسط شرکت دارویی Ablynx انجام شد. در حال حاضر شرکت های متعددی، تحقیقات به کارگیری نانوبادی ها را در زمینه های درمانی و تشخیصی آغاز نمودند. مطالعات در زمینه درمانی علیه بیماری هایی مانند خودایمنی، سرطان، تحلیل سیستم عصبی و ویروس ها انجام شده و بعضاً در حال انجام است. در جدول شماره ۱، مطالعات بالینی نانوبادی ها علیه بیماری های مختلف خلاصه شده است.

4. Von Willebrand factor

1. Atherosclerosis
2. Tumor necrosis factor
3. Rheumatoid arthritis

جدول شماره ۱: مطالعات کارآزمایی بالینی نانوبادی ها

نوع بیماری	نام محصول	آنتی ژن هدف	نوع نانوبادی	فاز بالینی	نتیجه مطالعه
التهابی (آرتریت روماتوئید)-لوپوس	ALX-0061	رستور ایتروکین ۶	تک ظرفیتی واجد آنتی بادی آلومین	II	تایید اثربخشی و سلامت دارو پس از ۲۴ ساعت-در حال بررسی در فاز IIb تعیین میزان دوز دارو در حال بررسی
خود ایمنی (آرتریت روماتوئید)	ATN-103 (Ozoralizumab), ATN-192	فاکتور نکروز دهنده تومور	دو ظرفیتی انسانی بدون PEG	II	اتمام در فاز II
پسوریازیس	ALX-0761	ایترلوکین ۱۷	دو ظرفیتی انسانی با PEG	I	اتمام در فاز یک
آسم	ALX-0962	ایمونوگلوبولین E	تک ظرفیتی واجد آنتی بادی آلومین	I	اتمام در فاز یک
آکزایمر	BI 1034020	آلفا ۱تا	تک ظرفیتی واجد آنتی بادی آلومین	-	توقف در فاز پیش بالینی
وون ویلراند	(ALX-0081) Caplacizumab	vWF	دو ظرفیتی با PEG	II	توقف در فاز پیش بالینی
روتاویروس	ARP1	روتاویروس	دو ظرفیتی	III	در حال ورود به فاز سه
سرطان	ALX-0651	CXCR4	یک ظرفیتی	II	اتمام در فاز دو
	ARP1	DR5	دو ظرفیتی	I	توقف در فاز یک
			چهار ظرفیتی	I	به علت سمیت کبدی متوقف شد

نانوبادی ها به عنوان کوچک ترین قطعه آنتی بادی با قدرت اتصال مطلوب آنتی ژنی می باشند که به کمک تکنولوژی DNA نوترکیب به روش نمایش فاژی از نفوسیت های شتر ایمن شده با آنتی ژن مورد نظر حاصل می گردند. ویژگی های ساختاری و عملکردی مطلوب این مولکول های کوچک از قبیل تمایل اتصال بالا، ایمونوژنیسته پایین، پایداری بالا و بیان در سیستم های ساده و ارزان پروکاریوتی به منظور تولید انبوه

فراورده های نوترکیب، امکان بهره گیری از آن ها را به عنوان مولکول بیولوژیک و جایگزین مناسب آنتی بادی های مونوکلونال رایج هموار نموده است. با توجه به موفقیت های حاصل شده از مطالعات نانوبادی ها علیه بیماری های مختلف در فازهای تحقیقات بالینی به نظر می رسد در آینده نزدیک، نانوبادی ها به عنوان اهداف دارویی و تشخیصی موثر در علوم پزشکی مطرح گردند.

References

1. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Bajjana 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;

- 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, Romão 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 Bommel 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. Viridi 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, Hermans P, 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, Ebrahimzadeh 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,

- 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, Hessel 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

- 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, Rasaei 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-EGFR 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

- 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, Rasae 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, Rasae 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.

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 Haaf 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.