

Nanoantikorların Genel Özellikleri/ Tanı ve Tedavide Kullanımları: Geleneksel Derleme

General Properties of Nanobodies/Uses in Diagnosis and Treatment: Traditional Review

^{1b} Türker SALMAN^{a,b}, ^{1b} Sibel İLBASMIŞ TAMER^a

^aGazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Teknoloji AD, Ankara, Türkiye

^bFırat Üniversitesi Kovancılar Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, Eczane Hizmetleri Programı, Elazığ, Türkiye

ÖZET Hedefleme amacıyla tedavilerde kullanılan geleneksel antikorlar, kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda önemli başarılar sağlamıştır. Ancak büyük boyutları ve buna bağlı olarak kısıtlı tümör penetrasyonları, düşük stabiliteleri ve immünojenisiteyi kullanımlarını sınırlamıştır. Bu durum zamanla daha küçük antikor fragmanlarına olan ilgiyi artırmıştır. Hamers-Casterman ve ark. şans eseri *Camelidae* (deveğiller) türlerinde ve bazı kıkırdaklı balıklarda (köpek balığı) yeni bir antikor türü keşfetmiştir. Nanoantikor (nanobody) adı verilen bu tam antijen bağlama kapasitesine sahip küçük antikor parçaları, hafif zincirlerden yoksundur. Monoklonal antikorlara nazaran daha küçük boyuta (12-14 kDa) sahip olmaları, yüksek kimyasal ve termal stabiliteleri, suda çözünürlüklerinin yüksek olması, düşük immünojeniklik, kısa kan dolaşım süresine bağlı kandan hızla temizlenme ve yüksek doku penetrasyonu gibi çeşitli avantajları mevcuttur. Ayrıca nanoantikorlar immün, saf ve sentetik kütüphanelerden çeşitli mikroorganizmalar vasıtasıyla, etkin bir şekilde düşük maliyetle ekonomik olarak üretilebilmektedir. Bunun yanında modifikasyona yatkın olmalarından dolayı istenen özelliklere sahip nanoantikorlar araştırmacılar tarafından kolaylıkla tasarlanmaktadır. Nanoantikorlar ilaçlara, toksinlere, radyonüklidlere ve ilaç taşıyıcı sistemlere basitçe konjuge edilebildiğinden bu moleküllerin uygun hedeflere spesifik olarak gönderilmesi için önemli terapötik potansiyel taşımaktadır. Ayrıca kararlı yapıları ve uygulamadan kısa bir süre sonra yüksek tümör-arka planı oluşturmaları nedeniyle tanı ve görüntüleme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu derleme makalesinde nanoantikorların bazı üstün özelliklerinin yanı sıra kanser ve diğer hastalıkların biyomedikal araştırmaları, tanı ve tedavisindeki güncel uygulamalar incelenmiştir.

ABSTRACT Conventional antibodies used in targeting therapies have achieved significant success in various diseases, especially cancer. However, their large size and therefore limited tumor penetration, low stability and immunogenicity limit their use. This has increased interest in smaller antibody fragments over time. By chance, Hamers-Casterman and his team discovered a new type of antibody in *Camelidae* species and some cartilaginous fish (sharks). These small antibody fragments with full antigen-binding capacity, called nanobodies (nanobody), lack light chains. They have various advantages compared to monoclonal antibodies, such as their smaller size (12-14 kDa), high chemical and thermal stability, high water solubility, low immunogenicity, rapid clearance from blood due to short blood circulation time, and high tissue penetration. In addition, nanobodies can be produced effectively and economically at low cost from immune, pure and synthetic libraries through various microorganisms. In addition, nanobodies with desired properties can be easily designed by researchers because they are prone to modification. Since nanobodies can be simply conjugated to drugs, toxins, radionuclides, and drug delivery systems, they have significant therapeutic potential for the specific delivery of these molecules to appropriate targets. In addition, they are frequently used in diagnostic and imaging studies due to their stable structure and high tumor-background formation shortly after application. In this review article, some of the superior properties of nanobodies as well as current applications in biomedical research, diagnosis and treatment of cancer and other diseases are examined.

Anahtar Kelimeler: Nanoantikor; antikor;
antineoplastik ajan;
moleküler hedefe yönelik tedavi; tanı

Keywords: Nanobody; antibody;
antineoplastic agents;
molecular targeted therapy; diagnosis

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:

Salman T, İlbasmış Tamer S. Nanoantikorların genel özellikleri/tanı ve tedavide kullanımları: Geleneksel derleme. J Lit Pharm Sci. 2024;13(2):85-98.

Correspondence: Sibel İLBASMIŞ TAMER

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Teknoloji AD, Ankara, Türkiye

E-mail: ilbasmis@gazi.edu.tr



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 06 Nov 2023

Received in revised form: 02 Apr 2024

Accepted: 03 Apr 2024

Available online: 01 Jul 2024

2630-5569 / Copyright © 2024 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Hedefe yönelik tedavi, etkinliği ve spesifiteyi artırırken sağlıklı doku ve hücrelere zarar vermeyen bir tedavi stratejisidir.^{1,2} İmmünoglobulinler (Ig) veya antikorlar [antibody (Ab)], çok çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan hedefleme ajanlarıdır.^{3,4} B lenfositleri tarafından üretilen bu Ab'ler, zincirler arası disülfid bağlarıyla bağlanmış iki özdeş ağır [heavy (H)] ve iki özdeş hafif [light (L)] polipeptit zincirinden oluşan Y şeklinde, heterodimerik yapıda proteinlerdir. Yaklaşık 150 kDa molekül ağırlığına sahip olan Ab'ler, 50 kDa molekül ağırlığında iki özdeş ağır zincir ve yaklaşık 25 kDa molekül ağırlığında iki özdeş hafif zincirden oluşmaktadır. Hafif ve ağır zincirler sabit ve değişken alanlardan oluşur. Değişken alanlar [variable heavy "VH": ağır Ig zincirin değişken alanı] ve [variable light "VL": hafif Ig zincirin değişken alanı] yapının N-terminal ucunda bulunur ve "antijen bağlama bölgesi" olarak adlandırılır. C-terminal ucunda bulunan sabit alanlar hafif zincirlerde bir tanedir ve "constant light" olarak gösterilir. Ağır zincirlerde ise üç veya dört sabit alan [constant heavy (CH1, CH2, CH3 ve CH4)] bulunur. Ağır zincirlerin sabit alanları olan -CH₂ ve -CH₃, fragman kristalleşebilir [crystallizable fragment (Fc)] bölgesini oluşturur. Fc bölgesi, Ab'ye bağlı hücrel sitotoksiste [antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)] veya komplemana bağlı sitotoksiste gibi Ab'lerin aracılık ettiği fonksiyonlar için önemlidir. Ab'lerin bu hedefe karşı yüksek afiniteleri onları ideal terapötik moleküller yapmaktadır.^{1,5,6}

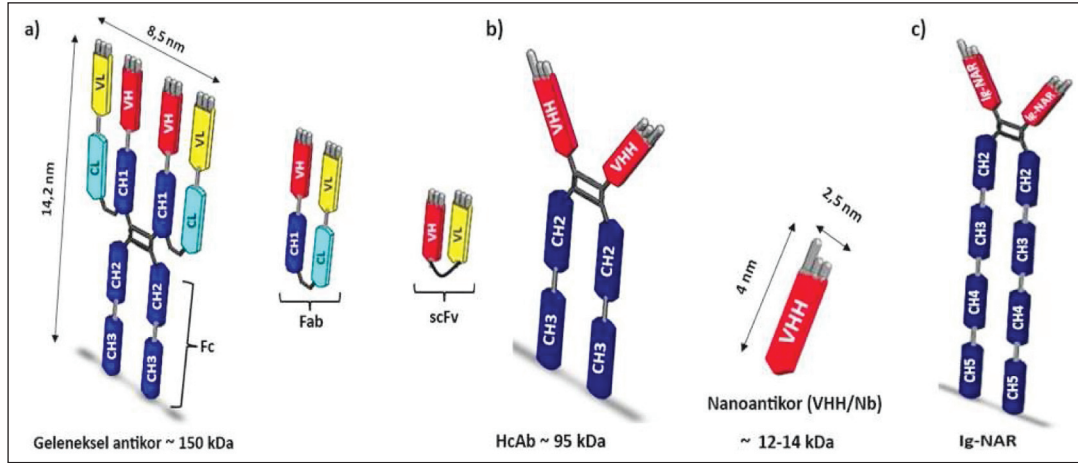
Bununla birlikte moleküler ağırlıklarının (~150 kDa) ve boyutlarının (14,2 nm×8,5 nm×3,8 nm) büyük oluşu, düşük stabilite göstermeleri, zayıf penetrasyon özellikleri, immünojenik olmaları, üretimlerinin yüksek maliyette olması ve üretim prosedürlerinin zorluğu, katı tümörler üzerinde minimum etki oluşturmaları klinik etkilerini sınırlandıran unsurlardandır. Ek olarak yarı ömürlerinin uzun olması, moleküler görüntüleme çok yoğun arka plan sinyali oluşturmalarına neden olmaktadır. Bu kısıtlamaların üstesinden gelebilmek için yeni Ab fragmanları geliştirilmiştir.^{1-3,7-9} Hedeflenen ilaç taşınmasındaki bu yönelim, bütün bir Ab yapısı yerine daha avantajlı sayılabilecek, değişken fragmanlar [variable fragment (Fv)], tek zincirli Fv [single-chain

variable fragment (scFv)], antijen bağlayıcı fragmanlar [antigen-binding fragment (Fab)], nanoantikor [nanobody (Nb)] gibi daha küçük boyutta farklı fragmanların geliştirilmesini sağlayarak hem tedavi hem de teşhis boyutunda üstünlükler getirmiştir.^{1,4,10,11}

1993 yılında Hamers-Casterman ve ark. çalışmalarında, Camelidae (devegiller) familyasına mensup hayvanlarda (develer, lamalar ve alpakalar) özel bir Ab türünü tesadüfen keşfetmişlerdir. Geleneksel Ab'ler, iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşurken bu yeni keşfedilen tür sadece ağır zincirli Ab'lerden [heavy chain only antibodies (HcAb~95 kDa)] oluşmaktadır. Bu Ab'ler, kendilerine özgü antijenlerini VHH veya Nb olarak bilinen tek bir alan vasıtasıyla tanımaktadır.^{4,6,7,9,12,13} Deve HcAb'lerinin keşfinden iki yıl sonra köpekbalıkları gibi kıkırdaklı balıklarda da (vatozlar ve patenler) benzer türde sadece ağır zincire sahip Ab'ler keşfedilmiştir. Ig yeni antijen reseptörü [immunoglobulin new antigen receptor (Ig-NAR)] Ab'leri olarak bilinen bu yalnızca ağır zincirli Ab'leri beş sabit alana (CH) sahiptir. Ancak köpekbalıklarının bağışıklıklaştırmadaki güçlük nedeniyle mühendisliği ve geliştirilmesi oldukça zordur.^{1,12} Şekil 1'de farklı tipte Ab'lerin ve bunların Fab'lerinin şematik gösterimi yer almaktadır.

NB'LERİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

HcAb'lerin değişken kısımlarını oluşturan Nb'ler, 4 nm×2,5 nm×3 nm boyutlarında prolat (rugby topu) bir yapıya benzemektedir ve genellikle 12-14 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Nanometre boyutunda olduklarından ilk olarak Ablynx firması tarafından "Nanobody" ismi ile literatüre girmiştir. Nb'ler, geleneksel Ab'lerin VH alanına benzer bir yapısal mimariye sahiptir. Her ikisinde de dört adet korunmuş çerçeve bölgesi [frame region (FR1, FR2, FR3, FR4)] ve üç adet tamamlayıcılık belirleme bölgesi [(complementarity determining region (CDR1, CD2, CDR3))] vardır. Fark olarak, Nb'lerin paratopunu (bir Ab'nin bir antijeni tanıyıp, ona bağlandığı bölge) oluşturan CDR1 ve CDR3 klasik Ab'lere göre daha uzundur. Bu yapısal farklılık hafif zincirleri olmayan Nb'lerin antijene bağlanma kabiliyetlerini kısmen telafi etmektedir. Özellikle CDR3, parmak benzeri çıkıntı oluşturarak erişilemeyen gizli ve krip-



ŞEKİL 1: Farklı antikor yapıları ve bunların antijen bağlayıcı fragmanlarının şematik gösterimi. a. Geleneksel Ab ve çeşitli Fab'ları (Fab, scFv); b. HcAb: Yalnızca ağır zincirli devedil Ab'leri (heavy chain only antibodies) ve antijen bağlayıcı fragmanı [Nb (VHH/Nb)]; c. Yalnızca ağır zincire sahip köpek balığı Ab'leri (Ig-NAR). Fc: Fragman kristalleşebilir bölge; VH: Ağır zincirin değişken alanı; CH: Sabit alan; Fab: Antijen bağlayıcı fragmanlar; HcAb: Sadece ağır zincirli antikorlar; scFv: Tek zincirli değişken fragmanlar; Nb: Nanoantikor; Ig-NAR: İmmünooglobulin yeni antijen reseptörü; VHH: HcAb'lerin ağır zincirinin değişken alanı.

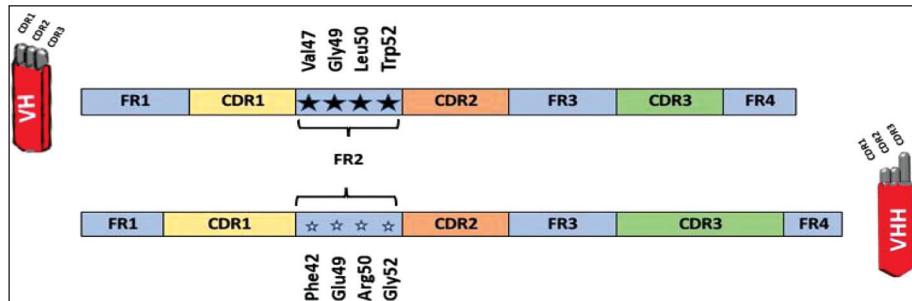
tik epitoplara (antijenin Ab ile birleşme bölgesi) ulaşıp böylece antijen bağlanmasında büyük rol oynar. Yapılan çalışmalarda antijen ile temasın en az %60 ile %80'i bu bölgede olduğu anlaşılmıştır. Bu farklı yapı Nb'lere yapısal esneklik ve daha yüksek bağlanma afinitesi sağlamaktadır.^{2,3,11,14-16}

Nb'lerin geleneksel Ab'lerden yapısal olarak farklı olan diğer önemli bir özelliği de Ab'lerin FR2 bölgesinde yüksek oranda korunmuş dört adet hidrofobik aminoasitin (Val47, Gly49, Leu50 ve Trp52) Nb'lerin FR2 bölgesinde daha küçük ve daha hidrofilik amino asitlere (Phe42, Glu49, Arg50 ve Gly52) mutasyonudur. Bu değişiklik Nb'lere sulu çözeltilerde yüksek çözünürlük özelliği sağlamaktadır.^{2,17} Şekil 2'de geleneksel Ab ve Nb'lerin değişken alanlarının yapısal farklılıkları görülmektedir.

NANOANTİKORLARIN ÜSTÜN ÖZELLİKLERİ

DÜŞÜK İMMÜNOJENİK PROFİL

Prensipde, deve türlerinden elde edilen Nb'lerin devedil türünden olmayan konakçılara enjekte edildiğinde bir bağışıklık tepkisine yol açması beklenir. Şimdiye kadar, Nb'ler üzerinde yapılan çalışmalarda beklenmedik humoral ve hücrel bağışıklık tepkileri rapor edilmemiştir. Bu avantajlarından dolayı Nb'ler hedeflenmiş ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Teorik olarak, Nb'lerin üç nedenden dolayı düşük immünojenite göstermesi beklenir: Birincisi, Nb dizilerinin insan Tip 3 VH alanı (VH3) ile arasındaki yüksek dizi benzerliği (%80'den fazla), ikincisi kısa yarı ömürleri nedeniyle kandan hızla temizlenmeleri, üçüncü olarak



ŞEKİL 2: Geleneksel antikor ve nanoantikorların değişken alanlarının yapısal farklılıkları. VH: Ağır zincirin değişken alanı; VHH: HcAb'lerin ağır zincirinin değişken alanı; FR: Çerçeve bölgesi; CDR: Tamamlayıcılık belirleme bölgesi.

ise immünojenite ile ilişkili tamamlayıcı yanıtı tetikleyebilecek Fc alanından yoksun olmalarıdır. Bununla birlikte uzun süreli tedavilerden ve klinik denemelerden önce Nb'lerin "insanlaştırılması" immünojenik potansiyellerini en aza indirmek için güvenli bir seçenektir. Bu konuda bazı özel şirketler büyük çaba sarf etmektedir.^{2,7,14,17-20}

YÜKSEK STABİLİTE VE ÇÖZÜNÜRLÜK

Nb'ler aşırı pH ve sıcaklık gibi çevresel koşullara maruz kaldıktan sonra bile kararlı yapılarını korumaktadır. Nb'lerin bu dayanıklılığı, kimyasal veya termal denatürasyondan sonra agregre olmamalarına, yüksek yeniden katlanma kapasitelerine ve genellikle yalnızca bir adet disülfür köprüsüne sahip olmalarına dayandırılmaktadır. Şaşırtıcı bir şekilde, Nb'lerin 37°C'de 1-2 haftaya kadar, 60-80°C'deki yüksek sıcaklıklarda bile antijen bağlama yeteneklerini koruyabilmektedir. Ek olarak kimyasal denatürantlara (2-3 M guanidinyum klorür, 6-8 M üre), yüksek basınca (500-750 MPa) ve fizyolojik olmayan pH'lara (pH aralığı 3,0-9,0) maruz bırakıldığında yine antijen bağlama kapasitelerinin çoğunu korumaktadır. +4°C'de ve -20°C'de uzun raf ömrüne sahiptirler. Nb'lerin aşırı stres koşullarındaki stabilitesi ve proteolitik dirençleri, onları alternatif uygulama yollarında (özellikle oral uygulamalar) kullanıma uygun hâle getirmektedir. Ayrıca biyosensör problemleri olarak tasarlanmaları da mümkündür.^{2,3,7,17,18,21}

Geleneksel Ab'lerin FR2 bölgesindeki hidrofobik aminoasitlerin, Nb'lerin FR2 bölgesindeki hidrofilik aminoasitlerle ikamesi, Nb'lerin yüzeylerini daha hidrofilik hâle getirerek sudaki çözünürlüklerini artırmaktadır. Böylelikle agregat oluşma eğilimi minimum düzeye inmektedir.^{15,17,22}

KÜÇÜK BOYUTU VE BENZERSİZ EPİTOPLARA YÜKSEK AFİNİTESİ

Nb'lerin küçük olan boyutları, antijenlere bağlanma afinitelerini beklenenin aksine etkilememektedir. Geleneksel Ab'lerde görülen altı tamamlayıcılığı belirleyen bölge [complementarity-determining region (CDR)] yerine üç CDR sunarak yüksek özgüllük ve afinite gösterecek şekilde evrimleşmişlerdir. Ab'lerin doğal olarak oluşan en küçük fragmanları olan Nb'lerin tamamlayıcılık belirleme bölgeleri epitop-

lara ulaşmada önemli rol oynamaktadır. Fare ve insan Ab'lerinin CDR3 bölgelerinin ortalama uzunlukları sırasıyla 12 ve 14 amino asit uzunluğundadır. Nb'lerde ise bu CDR3 yapısı (ortalama 18 aminoasit) daha uzundur. Bu yapısal avantaj, hedeflenen antijenlerle etkileşme yüzeylerini artırmaktadır. Kristalografik çalışmalar geleneksel Ab'lerin antijen bağlayıcı yüzeylerinin içbükey olduğunu göstermektedir. Nb'lerde ise parmak benzeri çıkıntılı uçlara sahip olan uzun CDR3 yapısı hem daha fazla esnek hem de dışbükey bir paratop oluşturmaktadır. Böylece içbükey yapıya sahip antijen yüzeyleriyle derinlemesine etkileşime girmektedir. Bu nedenle Nb'lerin, geleneksel Ab'lerin tanınması zor olan gizli epitoplara afiniteleri oldukça yüksektir.^{2,3,17,18,23,24}

DERİN DOKU PENETRASYONU VE KANDAN HIZLI TEMİZLENME

Nb'ler küçük boyutları ve yüksek oranda çözünür olmalarından dolayı güçlü ve hızlı doku penetrasyon kabiliyetlerine sahiptir. Özellikle katı tümörler gibi yoğun dokulara kolaylıkla girebilmektedir. Boyutlarından ötürü kan-beyin bariyerini geçebilmeleri nörodegeneratif hastalıkların tedavisinde Nb'lere önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, Nb'ler glomerüller filtrasyon ile kolayca süzülerek kandan hızlıca uzaklaştırılmaktadır. Böylesine hızlı bir klirensin Nb tabanlı görüntüleme çeşitli faydaları mevcuttur. Enjeksiyondan hemen sonra arka plan sinyallerinin yoğunluğu hızlı bir şekilde düşer, bu da böbrek dışındaki diğer organların erken görüntülenmesini sağlayarak hedef dışı toksisiteyi minimuma indirmektedir.^{15,18,25,26}

KOLAY MODİFİKASYON İMKÂNI

Nb'ler özellikle farklı hedeflere bağlanabilmeyi sağlayacak yeni yapılar oluşturmak üzere genetik olarak tasarlanabilmektedir. Genetik mühendisliği yoluyla Nb'ler, üç özelliğe göre çeşitli şekillerde modifiye edilebilirler; multivalent (aynı antijene bağlı iki veya daha fazla Nb), multispesifik (farklı antijenlerde bağlanma bölgeleri oluşturabilen Nb) ve multiparatopik (aynı antijende farklı antijen bağlama bölgelerine bağlanabilen Nb). Bu benzersiz seçenek, terapötik uygulamalarda Nb'lerin yarı ömrünü uzatmak için özellikle ilgi çekicidir. Ancak küçük boyut avantajlarını tehlikeye atabileceği gerçeğini de göz önünde

bulundurmak gerekmektedir. Sonuç olarak, Nb'ler kanser ilaçlarını, radyonüklidleri veya toksinleri hastalıklı bölgeye doğru spesifik olarak yönlendirmek için hedefleme ligandları olarak kullanılabilir. Böylece daha yüksek bağlanma afinitesi ve spesifiklikle beraber tek değerlikli emsallerine göre daha iyi terapötik aktivite göstermektedir.^{2,15,18,19,25}

ÜRETİM KOLAYLIĞI

Geleneksel Ab'lerin üretim maliyetlerinin fazla olması, daha teknolojik proseslere ihtiyaç duyulması ve sadece ökaryotik sistemlerde üretilmesi araştırmacılar için güçlükler oluşturmaktadır. Nb'ler ise, mikrobiyal sistemler (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* vb.) vasıtasıyla büyük miktarlarda düşük maliyetlerde ekonomik olarak üretilmektedir.^{3,4}

NB'LERİN DEZAVANTAJLARI

Nb'lerin küçük moleküler boyutu çoğu durumda çeşitli avantajlar sağlasa da moleküler ağırlıklarının glomerüler filtrasyon eşiğinin (50-60 kDa) altında olması hızlı renal klirens yol açmaktadır. Kısa serum yarı ömrüne sahip olmaları terapötik uygulamalarda sık dozlamayı gerektirdiğinden böbrek toksisite riski de artmaktadır. Bu dezavantajın üstesinden gelebilmek için Nb'lerin polietilen glikol ile kovalent bağlanması (PEG ilasyon), multimerik Nb yapıları veya serum albuminle füzyon yapabilen Nb'ler geliştirilerek kandaki yarı ömürleri uzatılabilir. Bir diğer dezavantaj ise geleneksel Ab'lerde bulunan ve ADCC'den sorumlu Fc alanının Nb'lerde bulunmamasıdır. Nb'lerdeki bu Fc yapısının olmayışı kanser tedavisindeki etkinliklerini azaltmaktadır. Son olarak Nb'ler üretilirken devegillerden yararlanıldığı için hayvanların barınma koşullarının getirdiği ekonomik yükün de bir dezavantaj oluşturduğu bilinmektedir.^{1,3,5,7,14,17,20,23}

NB'LERİN ÜRETİMİ

Nb'lerin özgüllük ve afinite özellikleri kütüphanelerinin çeşitliğine ve kapasitelerine bağlıdır. Bu yüzden, hedefe yönelik genetik bilgiyi içeren kütüphanelerin elde edilmesi kritik öneme sahiptir. Antijene özgü Nb'ler immün, saf veya sentetik kütüphaneler aracılığıyla üretilmektedir. İmmün kütüphanesi, Nb'lerin taranmasında en sık kullanılan ve

yüksek afiniteli Nb'lerin elde edildiği bir yöntemdir. Öncelikle bir lama veya bir tek hörgüçlü deve aşlanı (lamalar hem küçük boyutlarından hem de bakımlarının daha kolay olmasından dolayı daha çok tercih edilmektedir). Hedeflenen antijenin kısıtlı olduğu bazı durumlarda genetiği değiştirilmiş fareler de bu amaçla kullanılmaktadır. Aşılama, yedi günde bir 0,5 mg antijen içeren ortalama beş enjeksiyonla gerçekleştirilir. Daha sonra lenfositlerin saflaştırılması için hayvandan kan örnekleri alınır. Lenfositlerinden toplanan RNA, ekstrakte edilerek birinci sarmal cDNA sentezlenir. Bu cDNA kullanılarak, VHH kodlama dizileri polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile büyütülür ve faj görüntüleme vektörüne eklenir, bu da yaklaşık 10^8 Nb kütüphanesi oluşturmaktadır. İdeal bir Nb immün kütüphanesinin minimum 10^7 olması beklenmektedir. Faj gösterimi ve panlama (bir faj kütüphanesinin çeşitliliğinin ve spesifikliğinin zenginleştirilme tekniği) işlemlerinden sonra antijene özgü bağlanmanın özgünlüğü ELISA ile değerlendirilir. Net bir zenginleşme genellikle ikinci ve üçüncü panlama turlarından sonra görülür. Daha sonra, yüksek afiniteli Nb elde edilir. En iyi aday seçildikten sonra Nb üretimi bakteri, maya veya memeli hücrelerinde gerçekleştirilir. Bu işlemler ortalama 2-3 ay sürmektedir. Saf kütüphanelerin oluşturulması ise aşılama uygulaması yerine kütüphanenin çeşitliliğini artırmak amacıyla birden fazla hayvanın kanının toplanması ile olmaktadır. Diğer prosedürler, benzer şekilde yürütülerek ortalama üç hafta sonra istenilen Nb'ler oluşturulmaktadır. Hem immün hem de saf kütüphanelerin elde edilmesinde hayvanların kullanılması, sürecin uzun olması ve buna bağlı olarak maliyetlerin fazla olması nedeniyle sentetik Nb kütüphaneleri oluşturmak iyi bir alternatiftir. Sentetik Nb kütüphaneleri DNA oligonükleotitleri kullanılarak genetik mühendisliği teknolojisiyle elde edilmektedir.^{8,13,17,21,27}

NB İLE MOLEKÜLER HEDEFE YÖNELİK TANI VE TEDAVİ

KANSER VE DİĞER HASTALIKLARIN TEDAVİSİNDE NB'LERİN KULLANIMI

Kanser tedavisine yönelik, başarılı tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Konvansiyon-

nel radyoterapi ve kemoterapi, tümörlü hücrelere hedefli olmadığı için bu tarz tedavi uygulamalarında yan etki görülme olasılığı çok fazla olmaktadır. Ab tabanlı onaylanan ilk monoklonal Ab (mAb) olan rituksimab ve ardından gelen diğer mAb'lar hedefe yönelik tedavide büyük bir yankı uyandırsa da artık net olarak bilinen çeşitli dezavantajlarından dolayı kullanımları sınırlanmaktadır. Nb'ler küçük boyutları, tümör hücrelerine olan güçlü penetrasyon kabiliyetleri, düşük immünojeniteleri, antijenlere yüksek bağlanma afiniteleri ve kararlı yapılarından dolayı araştırmacıların dikkatini yoğun bir şekilde çekmektedir. En küçük Ab fragmanlarına olan bu talep, çeşitli kanserleri tedavi etmede başarılı sonuçlar elde etmiştir. Nb'lerin büyük bir kısmı tek başlarına tedavi edici özellikte değildir. İlaç, toksin veya bir efektör grup ile modifiye edilmeleri gerekmektedir. Modifikasyon yöntemleri kimyasal konjugasyon ya da gen füzyonu şeklinde olmaktadır. Bu durumda bir miktar büyüyen molekül boyutlarından dolayı sistemik dolaşımdaki kalış süreleri de artmaktadır. Dolaşımdaki bu artmış süre ile beraber terapötik etkinlikleri artmaktadır.^{10,14,17,23} Bu kapsamda Roovers ve ark.nın yapmış olduğu bir çalışmada, albumin bağlı üç değerlikli bir bi-paratopik Nb olan CONAN-1 (7D12-9G8-Alb)'in A431 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görülmüştür.²⁸

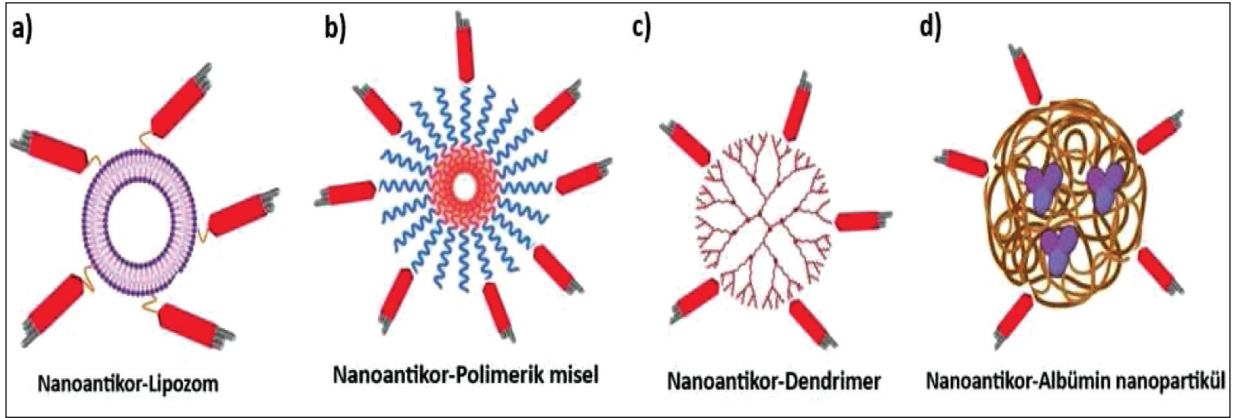
Genel olarak Nb'ler tümör antijenlerini hedefleyerek, anjiyogenezi engelleyerek ya da bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri olarak kanseri tedavi etmektedir.²⁰ Nb'lere dayalı terapötiklere son yıllarda artan bir ilgi vardır. Şu ana dek onaylanmış üç Nb tabanlı ürün bulunmaktadır.¹⁷ Kazanılmış trombotik trombositopenik purpura tedavisinde kullanılmak üzere von Willebrand faktörünü inhibe eden Nanobody® caplacizumab (Cablivi™) adlı ürün ilk olarak 3 Eylül 2018'de onay almıştır.²⁹ Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi [U.S. Food and Drug Administration (FDA)], nükseden veya dirençli multipl miyelom tedavisinde Ciltacabtagene autoleucel (LCAR-B38M) isimli B hücresi olgunlaşma antijenini "B-cell maturation antigen" hedefleyen Nb-ilaç konjugatını 2022 yılında onaylamıştır.³⁰ Bir diğer Nb bazlı ürün olan Taisho firması tarafından geliştirilen Ozoralizumab (Nanozora®) (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Japonya), romatoid artrit hastalığında kullanılmak için 26 Eylül 2022 tarihinde Japonya'da onaylanmıştır.³¹

NANOANTİKOR İLE HEDEFLENDİRİLMİŞ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Nano yapıları ilaç taşıyıcı sistemlerin hedeflenmesi bölgeye özgü ilaç taşınmasında tercih edilen bir yöntemdir. Böylelikle hem tümörlü dokularda ilaç etkinliği artar hem de istenmeyen yan etkilerin görülme sıklığı azalmaktadır. Düşük çözünürlüğe sahip, stabilite sorunu olan ve dolaşımdan hızlıca elimine edilen etken maddelerin terapötik aktivitesini iyileştirmek için nanopartikül formları oluşturulmaktadır. Bu amaçla polimerik miseller, lipozomlar, dendrimerler ve albumin nanopartikülleri gibi ilaç taşıyıcı sistemler yaygın kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda ilaç taşıyıcı sistemleri Nb'ler ile hedeflemek oldukça iyi sonuçların elde edilmesini sağlamıştır.^{24,26} Şekil 3'te bazı Nb-ilaç taşıyıcı sistem konjugatları gösterilmiştir.

LİPOZOMLAR

Lipozomlar sulu bir çekirdeğe sahip en az bir lipit çift tabakadan oluşan küresel veziküllerdir. Yapılarında yer alan fosfolipidler, hücre membranı ile benzerlik gösterdiğinden dolayı biyoparçalanabilirlik ve biyouyumluluk yönünden ilaç taşıyıcı sistemler olarak avantajlıdır. Ayrıca hem hidrofilik hem de lipofilik özellikteki ilaçları kapsülleyerek onları çeşitli çevresel bozunma ortamlarından korumaktadır. Yine lipozomlar hedeflendirmeye yönelik modifikasyonlara da uygun olduklarından ilaç taşıyıcı sistemler olarak sıklıkla tercih edilmektedir.³² Nb ile konjuge edilen lipozomlar, hem bölgeye özgü ilaç taşınmasını sağlaması hem de lipozomların avantajlarını kullanması açısından tedavi planlaması için oldukça elverişli görünmektedir.²³ Sayed-Tabatabaei ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, bir kinolon sınıfı antibiyotik olan nitroksolin ve antikanser ajanı Cisplatinin, ikili olarak anti HER2 Nb ile hedeflendirilmiş lipozomlar kullanılarak sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Hazırlanan sistemin MDA-MB-231 ve TUBO meme kanseri hücre hatlarındaki *in vitro* hücresel alım değerlendirmesinde, TUBO hücre hatlarında daha seçici ve daha sitotoksik ve buna bağlı olarak tedavi edici kapasitesinin olduğu değerlendirilmiştir.³³ Oliveira ve ark., epidermal büyüme faktörü reseptörü-antagonisti [epidermal growth factor receptor (EGFR)] olan bir EGa1 Nb pegilasyon işlemi



ŞEKİL 3: Nanoantikor-ilaç taşıyıcı sistem konjugatları. a) Nanoantikor-lipozom konjugatı; b) Nanoantikor-polimerik misel konjugatı; c) Nanoantikor-dendrimer konjugatı; d) Nanoantikor-albumin nanopartikül konjugatı.

yapılmış bir lipozomun yüzeyine konjuge etmiştir (EGa1-L). EGa1-L EGFR'yi aşırı ifade eden 14C kanser hücrelerine yüksek bağlanma afinitesi göstererek, 14C kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir.³⁴

POLİMERİK MİSELLER

Polimerik miseller, sulu çözelti içerisinde kendiliğinden oluşan amfifilik polimerlerdir.³⁵ Polimerik misellerin biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olmaları, stabilitelerinin iyi olması ve ilaç yükleme kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı ilaç taşıyıcı sistem olarak sıklıkla kullanılmaktadır.³⁶ Ayrıca hidrofobik özellikteki ilaçların kandan ilgili bölgelere taşınmasında da tercih edilmektedir. Bir hedefleme molekülünün (Nb, Ab ve scFv vs.), misellerin yüzeyine konjuge edilmesi ile bölgeye özgü ilaç verilmesi de sağlanmış olmaktadır.²³ Wang ve ark.nın yapmış olduğu bu çalışmada, EGFR ile 7D12 olarak adlandırılan bir Nb konjuge edilmiş ve bu yapıya bir kuantum nokta tabanlı misel dâhil edilmiştir. Ayrıca misel içerisine aminoflavon adı verilen bir antitümör ilaç yüklenmiştir. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü taşıyıcı sistem ile Nb bağlanmadan hazırlanan taşıyıcı sistemin meme kanseri hücrelerinde *in vitro* hücre alımı ve sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Nb bazlı taşıyıcı sistemin, hücre alımının daha fazla olması ve buna bağlı olarak da sitotoksitesinin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.³⁷ Talelli ve ark., doksorubisin yüklenmiş polimerik misellerin Nb ile konjugasyonu sonucu bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmiştir. Bu taşı-

yıcı sistemin hedefli ve hedeflendirme yapmadan kanser hücrelerindeki *in vivo* ve *in vitro* etkinliklerine bakılmıştır. Nb ile modifiye edilen hedeflendirilmiş grubun tümörü daha fazla öldürdüğü ve hayvanların daha fazla hayatta kalmalarını (Nb'siz sistem: 32 gün, Nb'li sistem: 53 gün) sağladığı sonucuna varılmıştır.³⁸

DENDRİMER

Dendrimerler, üç boyutlu bir simetriye sahip dalanmış, 1-20 nm çap aralığında olan ilaç taşıyıcı sistemler olarak bilinmektedir. Yüzeylerinde çeşitli fonksiyonel gruplarla (mAb'lar, Nb'ler, çeşitli ligandlar vs.) modifikasyonuna imkân verecek çok sayıda bağlanma kısmı vardır. Ayrıca düşük immünojeniklik, iyi çözünürlük, yüksek stabilite ve biyoyumlu olmalarından dolayı da araştırmacılar tarafından çoğu kez tercih edilmektedir.^{21,39} Wu ve ark. çalışmalarında, dendrimer kullanarak platin ön ilacını tümörlere doğru hedeflemek için bir anti-EGFR Nb tasarlamıştır. Kümelenmiş Nb ilaç konjugatının pegilasyonu sonucu oluşan ilaç taşıyıcı sistemin önemli bir antitümör aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.⁴⁰

ALBUMİN NANOPARTİKÜLLERİ

Albumin, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu olan ve immünojenikliği olmayan büyük molekül bir protein nanotaşıyıcısı olarak bilinmektedir. Bu özelliklerinden dolayı özellikle antitümör ajanlar albumin ile bağlanarak taşıyıcı sistemin yan etki po-

tansiyeli minimuma indirilmektedir.⁴¹ Altıntaş ve ark.nın yaptığı araştırmada Nb-albumin nanopartikülü olan ve kısa adı NANAP olarak bilinen molekül çalışılmıştır. Albumine sunitinib ile benzer bir multi-kinaz inhibitörü olan 17864 adlı yeni bir molekül konjuge edilmiştir. Daha sonra sisteme bir anti-EGFR Nb olan EGa1 ve PEG dâhil edilmiştir. Nb ile hedeflendirilmiş ve Nb'siz grup karşılaştırıldığında EGa1'li hedefli grubun 40 kat daha fazla kanserli hücrelere bağlandığı görülmüştür.⁴²

NB'LE HEDEFLENMİŞ RADYONÜKLİTLER VE FOTODİNAMİK TEDAVİDE KULLANIMLARI

Nb'ler florokromlar ve radyonüklidlere çeşitli yöntemlerle konjuge edilmektedir. Böylece hem tümör hücrelerinin görüntülenmesi ve hem de bu tümörlerde sitotoksik etki gösterme potansiyeline sahiptir. Bölgeye özgü Nb tabanlı radyonüklid tedavisi ile tümör hücrelerine sitotoksik radyasyon uygulanmaktadır. Ayrıca hedefe yönelik bu tedavi yaklaşımı ile sağlıklı hücreler minimum düzeyde etkilenmektedir.²⁴

Hu ve ark., bu çalışmada MIRC213-709 olarak isimlendirilen hem HER2 reseptörüne hem de IgG'ye bağlanabilen bir Nb üretmiştir. Daha sonra 99m Teknesyum (^{99m}Tc) ve 177 Lutesyum (¹⁷⁷Lu) ile işaretlenerek NCI-N87 mide kanseri modeli oluşturulmuş farelerde terapötik etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak farklı dozlar içeren tüm tedavi gruplarında tedavi edici özellikler göstermiştir.⁴³ Lemaire ve ark. tarafından bu çalışmada, Nb'lerin multipl miyelom tedavisindeki etkinliği araştırılmıştır. R3B23 adı verilen Nb'nin ¹⁷⁷Lu ile işaretlenmesiyle (¹⁷⁷Lu-R3B23) oluşturulan Nb-radyonüklid yapısı 5T2MM modeli farelerde hastalığın ilerlemesini yavaşlatmıştır.⁴⁴

Fotodinamik tedavi [photodynamic therapy (PDT)], bir ışığa duyarlaştırıcının [photosensitizer (PS)] belirlenen dalga boyundaki aktivasyonu ile sitotoksik özellik kazanmasıdır. Ek olarak, tümöre özgü damarlarda hasar ve bağışıklık cevabını da uyarma yeteneğine sahiptir. mAb'ler bu amaçla kullanılmalarına rağmen çeşitli sınırlamalarından dolayı amaçlanan PDT tam olarak gerçekleşmemektedir. Nb ile hedeflendirilmiş PDT son yıllarda kanserli hastaların tedavisinde yeni alternatifler sunmaktadır.^{16,20,24} Deken ve ark., trastuzumaba dirençli HER2 eksprese eden tümörlere, Nb hedefli PDT çalışması yapmıştır.

Bu amaçla 1D5 ve 1D5-18A12 isimli iki Nb, bir ışığa duyarlaştırıcı ajan olan IRDye700DX ile konjuge edilerek *in vitro* PDT uygulaması yapılmıştır. İki hücre hattında yapılan çalışmalarda (HCC1954: Trastuzumab dirençli yüksek HER2 eksprese eden; MCF-7: Düşük HER2 eksprese eden) HCC1954 hücrelerinde anlamlı bir tümör azalması görülürken MCF-7 hücrelerinde daha az tümör gerilemesi gözlemlenmiştir.⁴⁵ van Driel ve ark. Nb ve PS kullanarak PDT'nin etkinliğini araştırmıştır. Hedeflendirme amacıyla EGFR hedefli 7D12 ve EGFR hedefli 7D12-9G8 Nb'leri kullanılarak IRDye700DX'e konjuge edilmiştir. Her iki Nb-PS konjugatının da tümör nekrozuna (~%90) sebep olduğu görülmüştür. Ek olarak sağlıklı hücrelerde sitotoksikite oluşturmadığı sonucu elde edilmiştir.⁴⁶

NB TABANLI İMMÜNOKSİNLER

İmmünotoksine dayalı tedavi, toksinlerin hedeflenmesi ile daha da anlam kazanmaktadır. Bir immünotoksin ile bir hedefleme ürünün konjugasyonu sonucu oluşan bileşik, spesifik olarak tümör hücrelerinde eksprese edilen antijenlere bağlanma eğilimindedir. Böylece sağlıklı hücrelere değil de hastalıklı hücrelere doğru toksinin hedeflenmesi sağlanmaktadır. Nb'ler ile çeşitli toksinlerin füzyonu sonucu bazı tedavi çalışmaları denenmiştir. Nb'lerin hem N-terminal hem de C-terminal kısmı füzyon amaçlı kullanılmaktadır. Araştırmalar ışığında C-terminal kısmının daha sık kullanıldığı görülmektedir.²⁴ Behdani ve ark., vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2'yi [vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2)] spesifik tanıyan bir Nb'nin Pseudomonas ekzotoksin A ile konjugasyonu sonucu kanser hücrelerine bağlanabilme potansiyelini değerlendirmiştir. Üretilen bu immünotoksinin, VEGFR2 eksprese eden hücrelerin çoğalmasını engellediği sonucuna varılmıştır.⁴⁷ Deng ve ark., ribozomu etkisizleştiren bir protein olan cucurmosin ile oluşturulmuş bir immünotoksinin, Nb 7D12 ile füzyonunu gerçekleştirmiştir. EGFR'yi aşırı eksprese eden hücre dizilerine karşı yapılan çalışmada *in vitro* hücre canlılığının büyük ölçüde azaldığı görülmüştür.⁴⁸

OTOİMMÜN HASTALIKLARDA NB'LERİN KULLANIMI

Otoimmün hastalıklar, bağışıklık sisteminin vücudun normal dokularını yabancı gibi algılayıp saldırıya

geçtiği, genellikle orijini bilinmeyen ve sonunda organların işlemez hâle geldiği bir hastalık türüdür. Özellikle teşhisi ancak semptomlar sonrası konulduğundan bu hastalıklar için daha etkili tanı ve tedavi seçenekleri kaçınılmaz hâle gelmiştir. Nanoteknoloji, getirdiği yeniliklerle beraber bu hastalıklara karşı daha etkili tedavi seçenekleri sunmaktadır. Nb'lerin tedavideki ilk başarılı alanları da otoimmün hastalıklar olmuştur.^{17,49} Papp ve ark. tarafından üç değerlikli bir Nb olan Sonelokimab (M1095) ile uluslararası, plasebo kontrol grubu ile karşılaştırmalı Faz 2b çalışması yapılmıştır. Plak tipi psoriasis hastalarındaki denemelerde klinik anlamda olumlu sonuçlar gözlenmiştir.⁵⁰ Ma ve ark.nın yaptığı bu çalışmada eozinofilik astım tedavisinde kullanılmak üzere Sitokin IL-5'i hedefleyen bir Nb tasarlanmıştır. Bu Nb üç değerliklidir. IL-5'in farklı yerlerdeki iki paratopunu hedeflemektedir. Ayrıca insan serum albumini [human serum albumin (HSA)] ile konjuge edilmiştir. IL-5-HSA-Nb olarak adlandırılan bu yapı daha önce FDA tarafından onaylanan Mepolizumab (Nucala) ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. TF-1-hücre çoğalmasını yavaşlatmada mepolizumab'tan 58 kat daha etkin olduğu görülmüştür. Ayrıca bu tasarlanan Nb yapısı ile sık dozlamaların da azalabileceği vurgusu yapılmıştır.⁵¹

ZEHİRLENMEDE NB'LERİN KULLANIMI

Nb'ler, akrepler veya yılanların neden olduğu zehirlenme tedavilerinde de kullanılmıştır. Mevcut antivenomlar, zehirle aşılınmış atların ve koyunların kanından saflaştırılmış poliklonal immünooglobülin fragmanlarıdır. Bununla birlikte, bu antivenomlar genellikle düşük potens, değişken etkinlik ve ciddi yan etkiler (örneğin serum hastalığı) göstermektedir. Küçük boyutları ve bir Fc bölgesinin olmaması nedeniyle, Nb'ler vücutta hızla yayılır ve küçük toksinlere çok yakın bir biyodağılım gösterir. Ayrıca toksini yakalayıp nötralize ettikten sonra toksin-Nb kompleksi glomerüler filtrasyonla hızla elimine edilmektedir.^{52,53} Hmila ve ark., "*Androctonus australis Hector*" akrep türünün toksinlerini kullanarak bispesifik Nb (NbF12-10) üretmiştir. Farelerle yapılan deney gruplarında NbF12-10'un zehirlenmenin üstünden uzun zaman geçse dahi letal dozundan tamamen koruduğunu göstermiştir.⁵⁴ Bailon Calderon ve

ark. bu çalışmalarında, bir lamayı *Bothrops atrox* yılan türünün toksinleri ile bağışıklaştırarak Nb kütüphanesi oluşturmuştur. Elde edilen Nb'lerin zehirlenme vakalarındaki kanamayı ve kas hasarını nötralize etme yeteneklerinin oldukça tatmin edici olduğu sonucuna varılmıştır.⁵⁵

KAN BEYİN BARIYERİNİ GEÇEN NB'LER

İlaçların geliştirilmesiyle beraber çoğu hastalığın tedavisine çare bulunmaktadır. Ancak nörolojik hastalıkların ilaçlı tedavisi kan-beyin bariyerinin [blood-brain barrier (BBB)] bu ilaçların beyne iletilmesini engellediğinden dolayı çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Geleneksel Ab'lerin, BBB'yi geçemediği bilinmektedir. Araştırmacıların son yıllarda daha küçük Ab fragmanlarına olan ilgisi bu alanda da kendine yer bulmuştur. BBB'yi geçebilen Nb'lerin aynı zamanda nörodejeneratif bozukluklarda hem teşhis hem de tedavi için büyük bir potansiyel olduğu düşünülmektedir.^{3,56,57} Nb'ler stabil olmaları, düşük izoelektrik noktalarına sahip olmaları ve Ab'lere göre daha küçük ebatları nedeniyle BBB'den geçiş kabiliyetleri yüksektir.¹⁶ Wouters ve ark. fare transferrin reseptörlerine bağlanabilen Nb tasarlamıştır ve nörotensin ile konjuge etmişlerdir. Nörotensin, özellikle beyinde tespit edildiğinde hipotermiye neden olan ancak kolaylıkla BBB'yi geçemeyen bir polipeptittir. Nörotensin-Nb yapısının farelere intravenöz enjeksiyonu sonucu vücut sıcaklığında doza bağımlı düşüşler meydana geldiği görülmüştür. Bu görülen hipotermik olayın beyne ulaşan Nb'ler sayesinde olduğu sonucuna varılmıştır.⁵⁸ Li ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada özellikle izoelektrik noktası yüksek olan Nb'lerin BBB'yi direkt olarak geçebildiğini ve hücre içi proteinlere de bağlanabildiklerini göstermişlerdir.⁵⁶

GÖRÜNTÜLEME VE TANIDA NB'LER

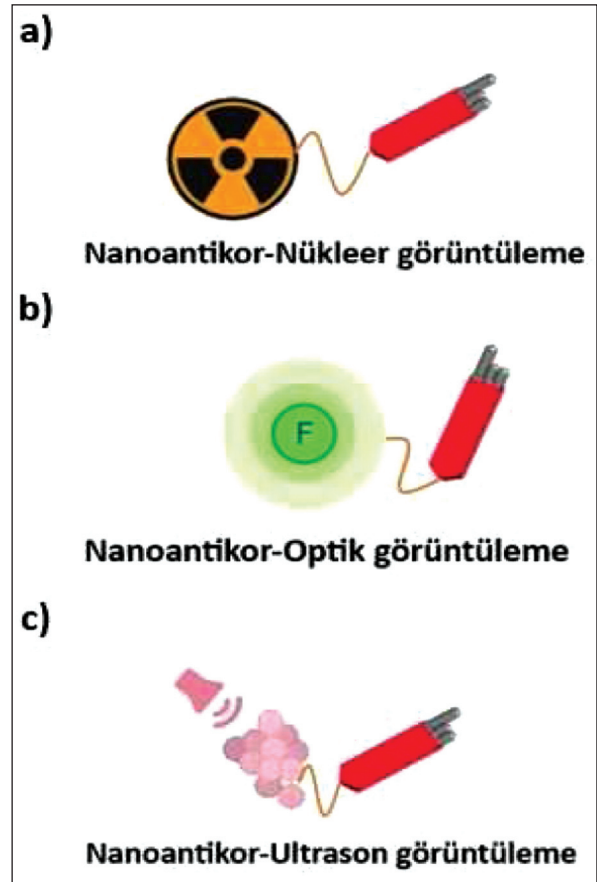
Kanserin görüntüleme çalışmalarındaki temel amaç, hastalığın altında yatan mekanizmaları öğrenmek ve erken teşhistir. Böylece kanserin daha iyi tanımlanmasına bağlı olarak vefat oranları da oldukça düşmektedir. Bu amaçla genellikle nükleer, optik ve ultrason görüntüleme metotları Ab veya peptitlere radyonüklidlerin konjuge edilmesiyle elde edilmektedir. mAb'lar bu amaçla yoğun bir şekilde kullanılır.

maktadır. Ancak büyük boyutlarından dolayı kandan yavaş temizlenmeleri ve doku penetrasyonlarının düşük olması sebebiyle istenilen düzeyde ve sürede görüntü elde edilememektedir. Bu yüzden özellikle aynı gün sonuç elde edilecek görüntüleme izleyicileri tasarlamak için yeni hedefleme fragmanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kararlı yapıları, hedefe yüksek afiniteleri, homojen doku penetrasyonu, uygulamadan kısa bir süre sonra yüksek bir tümör-arka plan imkânı, küçük boyutları ve buna bağlı olarak dolaşımdan hızlıca temizlenmeleri nedeniyle Nb'ler kanserin daha detaylı görüntülenmesinde umut vadetmektedir. Bundan dolayı Nb'ler hem *in vivo* hem de *in vitro* görüntüleme yöntemleri ile son yıllarda oldukça popüler hâle gelmiştir.^{14,15,22,23,26,59,60} Kanser belirlemek ve evrelerini tanımlamak için genellikle tek fotonlu emisyon tomografisi [single photon emission computed tomography (SPECT)], pozitron emisyon tomografisi [positron emission tomography (PET)], bilgisayarlı tomografi [computed tomography (CT)], optik görüntüleme ve ultrason tabanlı görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.⁶¹ Şekil 4'te Nb tabanlı görüntüleme yöntemleri şematize edilmiştir.

NÜKLEER GÖRÜNTÜLEME

PET, CT ve SPECT nükleer görüntüleme yöntemlerinin başlıcalarıdır. SPECT'de gama yayan izotoplar (iyot-123, teknesyum-99m vb.) kullanılırken, PET için pozitron yayan izotoplar (galyum-68, flor-18 vb.) kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin cerrahi girişim olmadan uygulanması, yüksek hassasiyetle görüntü elde edilmesi, pratik oluşu ve uygun maliyetli olması gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. mAb'lar ve Nb'lere konjuge edilen radyoizotoplar hedefe yönelik görüntüleme tercih edilmektedir.^{59,62}

Vosjan ve ark.nın yaptığı bu çalışma Nb'lerin teşhis amaçlı görüntülemedeki ilk kullanımlarından biridir. EGFR'yi hedefleyen bir Nb olan 7D12, yarılanma süresi oldukça kısa bir radyonüklit olan 68Ga ile işaretlenmiştir. A431 tümörüne sahip farelerde yapılan biyodağılım çalışmaları sonucunda yüksek tümör alımı görülmüştür. Ayrıca PET görüntüleme çalışmalarında iyi arka plan kontrastı gözlemlenmiştir.⁶³ Huang ve ark., bu çalışmada EGFR'ye özgü bir Nb (8B6) ile nükleer görüntüleme kullanılan bir



ŞEKİL 4: Nanoantikor tabanlı görüntüleme. a) Nükleer görüntüleme b) Optik görüntüleme c) Ultrason görüntüleme.

radyonüklid olan ^{99m}Tc'yi etiketlemiştir. ^{99m}Tc-8B6 Nb'si hem sağlıklı hem de tümörlü fareler üzerinde denenmiştir ve görüntüleme çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.⁶⁴ Xavier ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada PET görüntüleme sıklıkla kullanılan bir radyonüklid olan 18F ile anti-HER2 Nb'si (2Rs15d) ve kontrol grubu olarak hedefleme özelliği olmayan BcII10 Nb'si konjuge edilmiştir. Tümörlü sıçanlarda yapılan PET/CT görüntülemelerinde 2Rs15d'in kontrol grubuna kıyasla hem çok daha yoğun tümör alımı hem de çözünürlüğü yüksek görüntüler elde edilmiştir. 18F-2Rs15d için tümör-kas ve tümör-böbrek oranları sırasıyla 22, 0,8 ve 18F-BcII10 için 1,2 ve 0,1 olarak bulunmuştur.⁶⁵ Keyaerts ve ark. meme kanserli 20 kadında HER2 ekspresyonunun tayini için PET/CT görüntüleme metodu kullanmıştır. Bu çalışma radyoaktif etiketli, Nb bazlı ilk insan Faz I çalışmasıdır. Anti-HER2-Nb (2Rs15d) 68Ga ile işaretlenmiştir. Hastalarda herhangi istenmeyen bir durumun gözlemlenmediği bu

uygulamada kandan hızlı bir şekilde temizlenmesinden dolayı yanlış pozitif sonuçlar görülmemiştir ve uygulamadan yaklaşık 1 saat sonra görüntüleme gerçekleşmiştir.⁶⁶

Nb'nin görüntüleme çalışmalarında kullanımı böbreklerde yüksek oranda birikmelerinden dolayı dezavantaj oluşturmaktadır. Bunun başlıca nedeninin megalin reseptörü olduğu düşünülmektedir. Megalin, özellikle proteinlerin proksimal tübülde geri emiliminden sorumludur. Reseptörleri hedefleyen Ab bazlı radyofarmasötiklerin, renal reabsorbisyonunu minimuma indirmek için bazı uygulamalar geliştirilmiştir. Katyonik özellikteki bazı aminoasitlerin (arginin, lizin veya çeşitli kombinasyonları) infüzyonu esnasında bir sakkarit molekülünün ilave edilmesi ya da peptitlerin anyonik özelliklerinin artırılması gibi stratejiler uygulanmaktadır. Tchouate Gankam ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada megalin reseptörünün Nb'lerin böbreklerdeki birikimi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucundaki görüntülerde megalinin ^{99m}Tc etiketli 7C12 Nb'nin böbreklerde birikmesinde önemli rol oynadığı görülmüştür. Ayrıca megalin yönünden eksikliği olan farelerle yapılan çalışmanın SPECT/microCT görüntüleri sonucu renal birikimin daha az olduğu tespit edilmiştir [megalın nakavt fareler: 105,84±6,54 %IA g-1, megalin eksprese eden fareler: 216,56±6,52 %IA g-1 (IA: injected activity); p<0,05].⁶⁷

OPTİK GÖRÜNTÜLEME

Optik görüntüleme, araştırma çalışmalarında ve klinikte kanserlerin görselleştirilmesini ve karakterizasyonunu sağlayan bir çeşit moleküler görüntüleme yöntemidir. Bu amaçla en çok floresan görüntüleme kullanılmaktadır. Diğer görüntüleme yöntemlerine göre bazı avantajları mevcuttur. Öncelikle kişinin radyasyona maruz kalmamasından dolayı güvenilir bir metottur. Ayrıca pratik oluşu, ekonomik olması ve yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmesi de tercih sebepleri arasındadır. Bu yöntemin kısa sürede görüntü oluşturabilmesi, araştırmacılara gerçek zamanlı bilgiye ulaşma imkânı sunmaktadır. Nb'ler optik görüntüleme izleyicilerinin hedeflendirilmesinde uygun adaylardır.^{14,59,68,69}

Oliveira ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada optik görüntüleme amaçlı bir anti-EGFR Nb'si olan

7D12 ile bir monoklonal Ab olan Setuksimab'ın karşılaştırılması yapılmıştır. Nb7D12 ve Setuksimab yakın kızılötesi florofor IRDye800CW ile modifiye edilmiştir. 7D12-IR yarım saat sonunda A431 ksenogreftleri taşıyan farelerin tümörlü hücrelerini görüntülemeyi başarırken, Setuksimab-IR bu süre zarfında herhangi bir sinyal oluşturmamıştır. 7D12-IR enjeksiyonundan iki saat sonra ve setuksimab-IR enjeksiyonundan 24 saat sonra en ideal görüntüler tespit edilmiştir. Aynı gün olarak adlandırılan bu görüntüleme yönteminde, yeniden hastaneye yatış ve ekstra radyasyona maruz kalma önlenebileceğinden, klinik öncesi veya klinik görüntüleme özellikle tercih edilmektedir.⁷⁰ CEACAM5, kolorektal kanser vakalarında fazla eksprese edilen bir reseptördür. Bu yüzden kolorektal kanserinin görüntülenmesinde önemli bir hedef olarak görülmektedir. Konvansiyonel floresan görüntüleme metodu olan NIR-I, sınırlı doku (1-6 mm) penetrasyonuna sahiptir. Yeni nesil ikinci yakın kızılötesi uygulaması olan NIR-II ise çok daha derin doku (≤20 mm) penetrasyonuna sahiptir. Guo ve ark.nın çalışmasında bir anti-CEACAM5 Nb (2D5) tasarlanmıştır ve IRDye800CW ile etiketlenmiştir. 2D5-IRDye800CW yapısının çok iyi çözünürlüğe sahip görüntüler oluşturduğu ayrıca doku saçılmasının da minimum düzeyde olduğu tespit edilmiştir.⁷¹ Kijanka ve ark.nın yaptığı bu çalışmada, meme kanserinde yüksek ekspresyonu olan CAIX'i hedefleyen VHH B9 ve HER2'yi hedefleyen VHH 11A4 Nb'lerin kullanılmıştır. Tümör-arka plan (T/B) oranının yüksek olması görüntüleme oldukça önemli olduğundan, çalışmada T/B oranının kontrol grubuna (hedefli olmayan bir Nb; VHH R2) göre yüksek olup olmadığı değerlendirilmiştir. VHH B9 ve VHH 11A4 florofor IRDye800CW ile etiketlenmiştir. Sonuçlar, hedefli Nb'lerin hedeflenmeyen Nb'ye göre daha yüksek bir T/B oranı olduğunu göstermektedir.⁶¹

ULTRASON GÖRÜNTÜLEME

Ultrason görüntüleme, organ ve dokulardan gelen ses dalgalarının toplanıp ölçülmesi ile belirlenen bir yöntemdir. Radyasyonsuz olması, gerçek zamanlı görüntü elde edilebilmesi ve ekonomik olmasından dolayı klinikte en yaygın kullanılan görüntüleme yöntemlerinden biridir. Mikro ve nano kabarcıklar, ultrasonda sıklıkla kullanılan kontrast maddeler olarak

tasarlanmıştır ve bunların hedeflendirilmesi ile bölgeye özgü görüntüleme yapılabilir. ^{23,26,72,73} Hernot ve ark. çalışmada biotin-streptavidin köprüleme yöntemi ile vasküler hücre adezyon proteini 1'i [Vascular cell adhesion protein (VCAM1)] hedefleyen bir Nb'si (cAbVCAM1-5) mikro kabarcıkların yüzeyine konjuge etmiştir. VCAM-1' fazlaca ifade eden MC38 tümör fare modelinde yapılan ultrason görüntülemesinde enjeksiyondan 10 dk sonra başarılı sonuçlar elde edilmiştir. ⁷⁴ Fan ve ark.nın bu çalışmasında prostat kanseri biyobelirteci olan, prostata özgü zar antijeni ile Nb'ler konjuge edilerek ultrasonik görüntüleme için nanokabarcıklar tasarlanmıştır. Kontrol grubu olarak da hedefli olmayan nanokabarcıklar kullanılmıştır. Ultrasonografik görüntülemelerde, Nb-nanokabarcıklar konjugatları boş nanokabarcıklardan çok daha yüksek pik yoğunluğu ve daha uzun süre görüntü oluşturmuştur. ⁷⁵

SONUÇLAR VE GELECEĞE BAKIŞ

Nb'ler küçük boyutları, sağlamlıkları, büyük ölçekli üretimlerinin kolay olması ve antijen hedefleme kapasitelerinin yüksek oluşu gibi avantajları nedeniyle uzun zamandır araştırmacıların dikkatini bu yöne çekmiştir. Geleneksel monoklonal Ab'lere alternatif olarak düşünülen bu küçük Ab fragmanları ile ilgili keşif çalışmaları her geçen gün artmaya devam etmektedir. Yeni nesil hedefli ilaç taşıyıcı sistemler olan nanoantikorlar, sağlıklı dokularda daha az biriktiğinden ilaca bağlı yan etkiler büyük oranda azalır ve bu yönüyle de gelecekteki araştırmalara ışık tutması beklenmektedir. Nb-ilacı/toksin ve nanoantikor-görüntüleme ajanı konjugatları teşhis ve tedavideki başarıları nedeniyle klinik denemelerde kendilerine yer bulmaktadır. Ancak tam olarak fayda sağlayabil-

mesi için yine de bazı sorunları barındırmaktadır. Böbrekten hızlı temizlenmesi görüntüleme için istenen bir özellik olsa da tedavi amaçlı kullanımları için bir dezavantajdır ayrıca renal toksisiteyi de artıran bir unsurdur. İmmünojeniklikleri düşük olmasına rağmen "insanlaştırma" çalışmalarıyla bu oran en asgari düzeye indirilmektedir. Nb'lerin çeşitli hastalıkların klinik öncesi denemelerinde ayrıca SPECT, PET, optik ve ultrason görüntüleme yöntemlerinde tanı amaçlı kullanımı yaygınlaşmakta olup ilerleyen zamanlarda daha da artması beklenmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Sibel İlbasmış Tamer; **Tasarım:** Sibel İlbasmış Tamer, Türker Salman; **Denetleme/Danışmanlık:** Sibel İlbasmış Tamer; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Türker Salman; **Analiz ve/veya Yorum:** Sibel İlbasmış Tamer, Türker Salman; **Kaynak Taraması:** Türker Salman, Sibel İlbasmış Tamer; **Makalenin Yazımı:** Türker Salman, Sibel İlbasmış Tamer; **Eleştirel İnceleme:** Sibel İlbasmış Tamer, Türker Salman; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Sibel İlbasmış Tamer, Türker Salman; **Malzemeler:** Türker Salman, Sibel İlbasmış Tamer.

KAYNAKLAR

- Bathula NV, Bommadevara H, Hayes JM. Nanobodies: The future of antibody-based immune therapeutics. *Cancer Biother Radiopharm*. 2021;36(2):109-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Liu M, Li L, Jin D, Liu Y. Nanobody-A versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2021;13(4):e1697. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Jovčevska I, Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020;34(1):11-26. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Sun S, Ding Z, Yang X, Zhao X, Zhao M, Gao L, et al. Nanobody: a small antibody with big implications for tumor therapeutic strategy. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:2337-56. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Vincke C, Muyldermans S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. *Methods Mol Biol*. 2012;911:15-26. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775-97. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- 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):607-17. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J*. 2021;288(7):2084-102. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Karakaş N, Öztürk İ, Tosluyal S, Bay S. Nanokorlar: tanı ve tedaviye yönelik antikor fragmanları [Nanobodies: diagnostic and therapeutic antibody fragments]. *Acta Oncol Turc*. 2018;51(2):240-50. [[Crossref](#)]
- De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol*. 2014;32(5):263-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Steele S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016;21(7):1076-113. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Rossotti MA, Bélanger K, Henry KA, Tanha J. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *FEBS J*. 2022;289(14):4304-27. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Liu B, Yang D. Easily established and multifunctional synthetic nanobody libraries as research tools. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1482. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Kang W, Ding C, Zheng D, Ma X, Yi L, Tong X, et al. Nanobody conjugates for targeted cancer therapy and imaging. *Technol Cancer Res Treat*. 2021;20:15330338211010117. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Yu S, Xiong G, Zhao S, Tang Y, Tang H, Wang K, et al. Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging (Review). *Int J Mol Med*. 2021;47(2):444-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Yong Joon Kim J, Sang Z, Xiang Y, Shen Z, Shi Y. Nanobodies: robust miniprotein binders in biomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2023;195:114726. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. NANOBODIES®: a Review of diagnostic and therapeutic applications. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5994. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Mir MA, Mehraj U, Sheikh BA, Hamdani SS. Nanobodies: The "Magic Bullets" in therapeutics, drug delivery and diagnostics. *Hum Antibodies*. 2020;28(1):29-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Unciti-Broceta JD, Del Castillo T, Soriano M, Magez S, Garcia-Salcedo JA. Novel therapy based on camelid nanobodies. *Ther Deliv*. 2013;4(10):1321-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Yang EY, Shah K. Nanobodies: next generation of cancer diagnostics and therapeutics. *front oncol*. 2020;10:1182. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Panikar SS, Banu N, Haramati J, Del Toro-Arreola S, Riera Leal A, Salas P. Nanobodies as efficient drug-carriers: progress and trends in chemotherapy. *J Control Release*. 2021;334:389-412. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Debie P, Devoogdt N, Heriot S. Targeted nanobody-based molecular tracers for nuclear imaging and image-guided surgery. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(1):12. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol*. 2017;8:1442. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol*. 2017;8:1603. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Bao G, Tang M, Zhao J, Zhu X. Nanobody: a promising toolkit for molecular imaging and disease therapy. *EJNMMI Res*. 2021;11(1):6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Verhaar ER, Woodham AW, Ploegh HL. Nanobodies in cancer. *semin immunol*. 2021;52:101425. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Zimmermann I, Egloff P, Hutter CAJ, Kuhn BT, Bräuer P, Newstead S, et al. Generation of synthetic nanobodies against delicate proteins. *Nat Protoc*. 2020;15(5):1707-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- 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):2013-24. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Duggan S. Caplacizumab: first global approval. *drugs*. 2018;78(15):1639-42. Erratum in: *Drugs*. 2018;78(18):1955. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Mullard A. FDA approves second BCMA-targeted CAR-T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(4):249. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Keam SJ. Ozoralizumab: First Approval. *Drugs*. 2023;83(1):87-92. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Nel J, Elkhoury K, Velot É, Bianchi A, Acherar S, Francius G, et al. Functionalized liposomes for targeted breast cancer drug delivery. *Bioact Mater*. 2023;24:401-37. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Sayed-Tabatabaei L, Varshosaz J, Haghighi Javanmard S, Soghrati S. Camouflaged liposomes by 11A4-nanobody for co-delivery of cisplatin and nitroxoline in breast cancer tumors: An in vitro/in vivo study. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022;71:103273. [[Crossref](#)]
- Oliveira S, Schifflers 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):165-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ghosh B, Biswas S. Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art. *J Control Release*. 2021;332:127-47. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Chaudhuri A, Ramesh K, Kumar DN, Dehari D, Singh S, Kumar D, et al. Polymeric micelles: a novel drug delivery system for the treatment of breast cancer. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022;77:103886. [[Crossref](#)]
- Wang Y, Wang Y, Chen G, Li Y, Xu W, Gong S. Quantum-dot-based theranostic micelles conjugated with an anti-egfr nanobody for triple-negative breast cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(36):30297-305. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Talelli M, Oliveira S, Rijcken CJ, Pieters EH, Etrych T, Ulbrich K, et al. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy. *Biomaterials*. 2013;34(4):1255-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Asadullah Khan M, Peng R, Liu CL, Chen Z. Synthesis, dynamics and applications (cytotoxicity and biocompatibility) of dendrimers: a mini-review. *Eur Polym J*. 2022;181(6):111708. [[Crossref](#)]
- Wu T, Liu M, Huang H, Sheng Y, Xiao H, Liu Y. Clustered nanobody-drug conjugates for targeted cancer therapy. *Chem Commun*. 2020;56(65):9344-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Kunde SS, Wairkar S. Targeted delivery of albumin nanoparticles for breast cancer: a review. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;213:112422. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

42. Altıntaş I, Heukers R, van der Meel R, Lacombe M, Amidi M, van Bergen En Henegouwen PM, et al. Nanobody-albumin nanoparticles (NANAPs) for the delivery of a multikinase inhibitor 17864 to EGFR overexpressing tumor cells. *J Control Release*. 2013;165(2):110-8. [Crossref] [PubMed]
43. Hu B, Liu T, Li L, Shi L, Yao M, Li C, et al. IgG-Binding Nanobody Capable of Prolonging Nanobody-Based Radiotracer Plasma Half-Life and Enhancing the Efficacy of Tumor-Targeted Radionuclide Therapy. *Bioconjug Chem*. 2022;33(7):1328-39. [Crossref] [PubMed]
44. Lemaire M, D'Huyvetter M, Lahoutte T, Van Valckenborgh E, Menu E, De Bruyne E, et al. Imaging and radioimmunotherapy of multiple myeloma with anti-idiotypic Nanobodies. *Leukemia*. 2014;28(2):444-7. [Crossref] [PubMed]
45. Deken MM, Kijanka MM, Beltrán Hernández I, Slooter MD, de Bruijn HS, van Diest PJ, et al. Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session. *J Control Release*. 2020;323:269-81. [Crossref] [PubMed] [PMC]
46. van Driel PBAA, Boonstra MC, Slooter MD, Heukers R, Stammes MA, Snoeks TJA, et al. EGFR targeted nanobody-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy in a pre-clinical model of head and neck cancer. *J Control Release*. 2016;229:93-105. [Crossref] [PubMed] [PMC]
47. Behdani M, Zeinali S, Karimpour M, Khanahmad H, Schoonooghe S, Aslemar A, et al. Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *N Biotechnol*. 2013;30(2):205-9. [Crossref] [PubMed]
48. Deng C, Xiong J, Gu X, Chen X, Wu S, Wang Z, et al. Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency in vitro. *Oncotarget*. 2017;8(24):38568-80. [Crossref] [PubMed] [PMC]
49. He R, Li L, Zhang T, Ding X, Xing Y, Zhu S, et al. Recent advances of nanotechnology application in autoimmune diseases-a bibliometric analysis. *Nano Today*. 2023;48:101694. [Crossref]
50. Papp KA, Weinberg MA, Morris A, Reich K. IL17A/F nanobody sonelokimab in patients with plaque psoriasis: a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2b study. *Lancet*. 2021;397(10284):1564-75. Erratum in: *Lancet*. 2021;397(10290):2150. [Crossref] [PubMed]
51. Ma L, Zhu M, Li G, Gai J, Li Y, Gu H, et al. Preclinical development of a long-acting trivalent bispecific nanobody targeting IL-5 for the treatment of eosinophilic asthma. *Respir Res*. 2022;23(1):316. [Crossref] [PubMed] [PMC]
52. Alirahimi E, Kazemi-Lomedasht F, Shahbazzadeh D, Habibi-Anboui M, Hosseininejad Chafi M, Sotoudeh N, et al. Nanobodies as novel therapeutic agents in envenomation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018;1862(12):2955-65. [Crossref] [PubMed]
53. Ben Abderrazek R, Vincke C, Hmila I, Saerens D, Abidi N, El Ayeb M, et al. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahl110 nanobody with improved neutralization of AahlII scorpion toxin. *Protein Eng Des Sel*. 2011;24(9):727-35. [Crossref] [PubMed]
54. Hmila I, Saerens D, Abderrazek RB, Vincke C, Abidi N, Benlasfar Z, et al. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J*. 2010;24(9):3479-89. [Crossref] [PubMed]
55. Bailon Calderon H, Yaniro Coronel VO, Cáceres Rey OA, Colque Alave EG, Leiva Duran WJ, Padilla Rojas C, et al. Development of Nanobodies Against Hemorrhagic and Myotoxic Components of Bothrops atrox Snake Venom. *Front Immunol*. 2020;11:655. [Crossref] [PubMed] [PMC]
56. Li T, Bourgeois JP, Celli S, Glacial F, Le Sourd AM, Mecheri S, et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J*. 2012;26(10):3969-79. [Crossref] [PubMed]
57. Custers ML, Wouters Y, Jaspers T, De Bundel D, Dewilde M, Van Eeckhaut A, et al. Applicability of cerebral open flow microperfusion and microdialysis to quantify a brain-penetrating nanobody in mice. *Anal Chim Acta*. 2021;1178:338803. [Crossref] [PubMed]
58. Wouters Y, Jaspers T, De Strooper B, Dewilde M. Identification and in vivo characterization of a brain-penetrating nanobody. *Fluids Barriers CNS*. 2020;17(1):62. [Crossref] [PubMed] [PMC]
59. Barakat S, Berksöz M, Zahedimaram P, Piepoli S, Erman B. Nanobodies as molecular imaging probes. *Free Radic Biol Med*. 2022;182:260-75. [Crossref] [PubMed]
60. Yang E, Liu Q, Huang G, Liu J, Wei W. Engineering nanobodies for next-generation molecular imaging. *Drug Discov Today*. 2022;27(6):1622-38. [Crossref] [PubMed]
61. Kijanka MM, van Brussel AS, van der Wall E, Mali WP, van Diest PJ, van Bergen En Henegouwen PM, et al. Optical imaging of pre-invasive breast cancer with a combination of VHHs targeting CAIX and HER2 increases contrast and facilitates tumour characterization. *EJNMMI Res*. 2016;6(1):14. [Crossref] [PubMed] [PMC]
62. Altunay B, Morgenroth A, Mottaghy FM. Use of radionuclide-based imaging methods in breast cancer. *Semin Nucl Med*. 2022;52(5):561-73. [Crossref] [PubMed]
63. Vosjan MJ, Perk LR, Roovers RC, Visser GW, Stigter-van Walsum M, van Bergen En Henegouwen PM, et al. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with ⁶⁸Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38(4):753-63. [Crossref] [PubMed] [PMC]
64. Huang L, Gainkam LO, Caveliers V, Vanhove C, Keyaerts M, De Baetselier P, et al. SPECT imaging with ^{99m}Tc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol Imaging Biol*. 2008;10(3):167-75. [Crossref] [PubMed]
65. Xavier C, Blyckers A, Vaneycken I, D'Huyvetter M, Heemskerck J, Lahoutte T, et al. (18)F-nanobody for PET imaging of HER2 overexpressing tumors. *Nucl Med Biol*. 2016;43(4):247-52. [Crossref] [PubMed]
66. Keyaerts M, Xavier C, Heemskerck J, Devoogdt N, Everaert H, Ackaert C, et al. Phase I Study of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J Nucl Med*. 2016;57(1):27-33. [Crossref] [PubMed]
67. Gainkam LO, Caveliers V, Devoogdt N, Vanhove C, Xavier C, Boerman O, et al. Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. *Contrast Media Mol Imaging*. 2011;6(2):85-92. [Crossref] [PubMed]
68. Meng X, Yang F, Dong H, Dou L, Zhang X. Recent advances in optical imaging of biomarkers in vivo. *Nano Today*. 2021;38:101156. [Crossref]
69. Xu M, Chen Z, Zheng J, Zhao Q, Yuan Z. Artificial intelligence-aided optical imaging for cancer theranostics. *Semin Cancer Biol*. 2023;94:62-80. [Crossref] [PubMed]
70. Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging*. 2012;11(1):33-46. [Crossref] [PubMed]
71. Guo X, Li C, Jia X, Qu Y, Li M, Cao C, et al. NIR-II fluorescence imaging-guided colorectal cancer surgery targeting CEACAM5 by a nanobody. *EBioMedicine*. 2023;89:104476. [Crossref] [PubMed] [PMC]
72. Heiles B, Terwiel D, Maresca D. The advent of biomolecular ultrasound imaging. *Neuroscience*. 2021;474:122-33. [Crossref] [PubMed]
73. Jiang Y, Hou X, Zhao X, Jing J, Sun L. Tracking adoptive natural killer cells via ultrasound imaging assisted with nanobubbles. *Acta Biomater*. 2023;169:542-55. [Crossref] [PubMed]
74. Hernot S, Unnikrishnan S, Du Z, Shevchenko T, Cosyns B, Broisat A, et al. Nanobody-coupled microbubbles as novel molecular tracer. *J Control Release*. 2012;158(2):346-53. [Crossref] [PubMed] [PMC]
75. Fan X, Wang L, Guo Y, Tu Z, Li L, Tong H, et al. Ultrasonic nanobubbles carrying anti-psma nanobody: construction and application in prostate cancer-targeted imaging. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127419. [Crossref] [PubMed] [PMC]