

NANOTELESA: ALTERNATIVA KLASIČNIM MONOKLONSKIM PROTITELESOM

NANOBODIES: AN ALTERNATIVE TO CONVENTIONAL MONOCLONAL ANTIBODIES

AVTORJI / AUTHORS:

Davor Babič, mag. kem. inž.¹

prof. dr. Vladka Čurin Šerbec, univ. dipl. kem.²

viš. znan. sod., asist. dr. Ivana Jovčevska, inž. kem.¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,
Center za funkcijsko genomiko in biočipe,
Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko
medicino, Center za imunologijo in razvoj,
Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ivana.jovcevska@mf.uni-lj.si



POVZETEK

Težko verižna protitelesa, prvič odkrita pri kamelidih leta 1989, predstavljajo nekonvencionalno obliko protiteles, sestavljeno izključno iz težkih verig in brez lahkih verig, značilnih za klasična protitelesa. Njihova posamezna variabilna domena, imenovana nanotelo ima ključne prednosti pred konvencionalnimi protitelesi: stabilnost, manjša velikost, visoka topnost v vodi, boljše prehajanje v tkiva in enostavna proizvodnja v rekombinantnih sistemih. Nanotelesa raziskujejo predvsem na področju diagnostike, kjer se uporabljajo v tehnikah, kot so pozitronska emisijska tomografija s hkratno računalniško tomografijo, biosenzorji in imunokromatografski testi. V terapevtske namene jih razvijajo za zdravljenje raka ter infekcijskih in avtoimunskih bolezni. Od prve odobritve kaplacizumaba leta 2018 so bila odobrena še tri zdravila na osnovi nanoteles, kar potrjuje njihov vse večji pomen v translacijski in klinični medicini.

KLJUČNE BESEDE:

kaplacizumab, monoklonska protitelesa, nanotelesa, PET/CT, rak

ABSTRACT

Heavy-chain antibodies, first discovered in camelids in 1989, represent an unconventional form of antibodies composed solely of heavy chains and lacking the light chains that are characteristic for classical antibodies. Their single variable domain, known as a nanobody offers key advantages over conventional antibodies, such as stability, smaller size, high solubility in water, improved tissue penetration, and easy production in recombinant systems. Nanobodies are primarily explored in the field of diagnostics, where they are used in techniques such as positron emission tomography/computed tomography, biosensors, and immunochromatographic tests. For therapeutic purposes, they are being developed for the treatment of cancer as well as infectious and autoimmune diseases. Since the first approval of caplacizumab in 2018, three additional nanobody-based drugs have been approved, confirming their growing importance in translational and clinical medicine.

KEY WORDS:

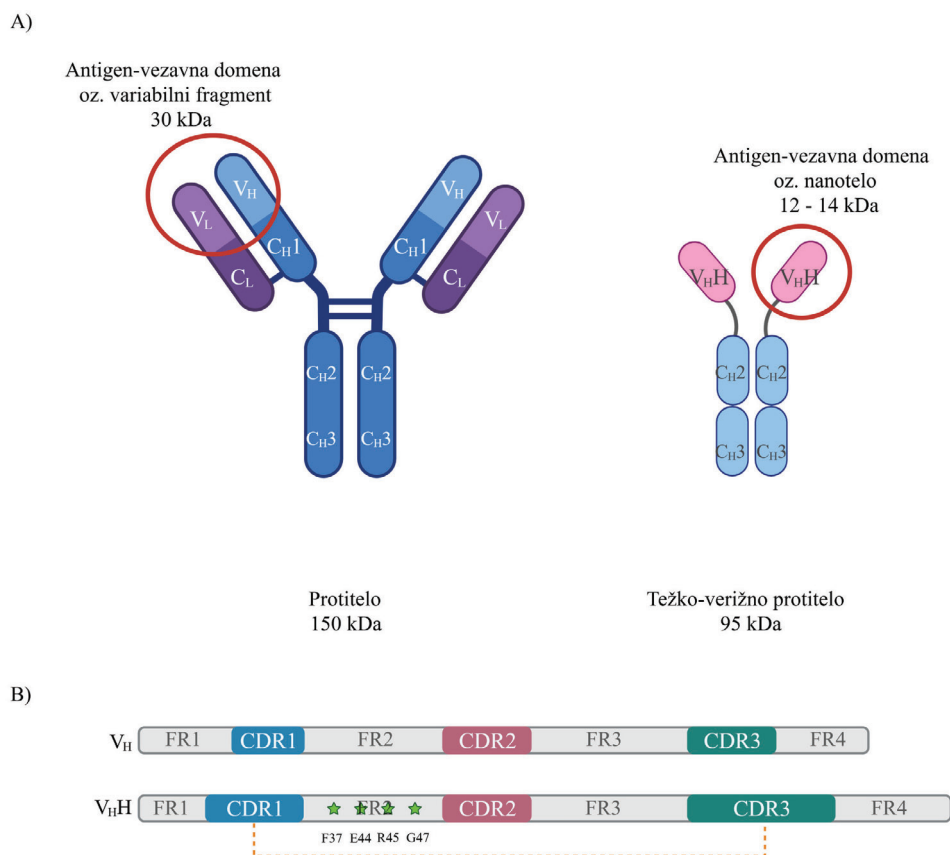
cancer, caplacizumab, monoclonal antibodies, nanobodies, PET/CT



1 UVOD

Protitelesa so ključni del imunskega sistema in eden najpomembnejših dejavnikov v boju proti različnim boleznim. Kot del pridobljenega imunskega sistema zagotavljajo specifično zaščito, kadar prirojeni imunski sistem ni dovolj učinkovit. Protitelesa omogočajo nevtralizacijo patogenov, aktivacijo komplementa in spodbujanje celi-

čnih imunskih odzivov, kar izboljša splošno obrambno vlogo organizma (1). Zaradi zaščitne vloge proti patogenom in toksinom so protitelesa postala pomembno orodje v medicini. Od proizvodnje prvega monoklonskega protitelesa, razvitega s hibridomsko tehnologijo, je minilo 50 let, od prvega odobrenega monoklonskega protitelesa, muromonaba – CD3, ki se je uporabljal za preprečevanje zavrnitve presajenih ledvic, pa malo manj kot 40 let (2). Polovica monoklonskih protiteles v kliničnem razvoju in tretjina odobrenih monoklonskih protiteles je namenjenih zdravljenju raka (3). Klasična protitelesa, imunoglobulini



Slika 1: Shematski prikaz protiteles, prisotnih v serumu kamel. A) Levo: Klasično protitelo ima variabilni domeni lahke (V_L) in težke (V_H) verige. Desno: Težko-verižno protitelo vsebuje samo eno variabilno domeno oziroma nanotelo (V_HH). B) Organizacija zaporedja domen V_H in V_HH . Ohranjene regije (FR)-siva regija CDR1-modra; CDR2-roza; CDR3-zelena. Spremenjene aminokisljine v regiji FR2 so označene z zelenimi zvezdicami. Črtkana črta je disulfidni mostiček. Privzeto po (8, 16). Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 1: Schematic representation of antibodies present in camel serum. A) Left: A conventional antibody contains the variable domains of the light (V_L) and heavy (V_H) chains. Right: A heavy-chain antibody contains only a single variable domain, known as a nanobody (V_HH). B) Organization of the V_H and V_HH domain sequences. Framework regions (FR)-gray; CDR1-blue; CDR2-pink; and CDR3-green. Modified amino acids in the FR2 region are indicated by green asterisks. The dashed line represents a disulfide bond. Adapted from (8, 16) Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

G (IgG), so sestavljena iz dveh težkih in dveh lahkih verig s skupno molsko maso 150 kDa. Težka veriga je sestavljena iz treh konstantnih domen (C_H1 , C_H2 in C_H3) in ene variabilne domene (V_H), lahka veriga pa iz ene konstantne domene (C_L) in ene variabilne domene (V_L), kar je prikazano na sliki 1 (4). Leta 1989 so pri kamelidih odkrili težkoverižna protitelesa, ki nimajo lahke verige (5). Variabilni del takega težkoverižnega protitelesa, imenovan nanotelo oziroma V_HH , se je izkazal kot zanimiva alternativa klasičnim monoklonskim protitelesom, predvsem zaradi približno desetkrat manjše velikosti in boljšega dostopa v tkiva. Kasneje so začeli razvijati nanotelesa za uporabo v diagnostiki in pri zdravljenju različnih bolezni. Nanotelesa danes tako raziskujejo na diagnostičnem področju, kot je pozitronska emisijska tomografija s hkratno računalniško tomografijo (angl. *positron emission tomography/computed tomography*; PET/CT) ter za zdravljenje raka, infekcijskih in avtoimunskih bolezni (4). Trenutno so za zdravljenje odobrena štiri nanotelesa (6). V tem članku bomo podrobneje opisali nanotelesa in njihovo pripravo, uporabo nanoteles za diagnostične in terapevtske namene ter zaključili z opisom nanoteles, ki so odobrena za klinično uporabo.

2 NANOTELESA

Težkoverižna protitelesa, ki se naravno pojavljajo v serumu kamel (dromedarji, kamele, lame, alpake, gvanaki in vikunje), so bila odkrita pred 30 leti (5). Kasneje so bila odkrita v ribah hrustančnicah, med drugim v morskih psih (7). Od takrat se intenzivno uporabljajo v poskusih *in vitro* in *in vivo* ter v predkliničnem in kliničnem preskušanju. Njihove rekombinantno pridobljene antigen-vezavne domene, tako imenovana nanotelesa, so sestavljena iz ene same domene z majhno molekulsko maso (14 kDa). Nanotelesa so ovalne oblike in z dimenzijami v območju nekaj nanometrov (7). Enako kot klasični imunoglobulini so nanotelesa sestavljena iz štirih ohranjenih regij (angl. *framework regions*; FR) in treh zank, ki določajo komplementarnost (angl. *complementarity determining regions*; CDR), kot je prikazano na sliki 1. Težkoverižna protitelesa nimajo lahkih verig in jim tudi manjka ena konstantna težka domena (C_H1). Zanki CDR1 in CDR3 sta pri težkoverižnih nanotelesih povečani (8–10). Večje število aminokislin, 18 aminokislin pri kamelah v primerjavi s 13 aminokislinami pri človeku, omogoča

KLJUČNI POUDARKI

- Nanotelesa so majhni, stabilni vezavni fragmenti težkoverižnih protiteles kamelidov, ki omogočajo boljše prodiranje v tkiva, visoko specifičnost in enostavno rekombinantno proizvodnjo.
- Zaradi boljše stabilnosti in topnosti ter odsotnosti učinkov, vezanih na regijo Fc, so primerna za hitre diganostične metode, kot so imunokromatografija, biosenzorji ter slikanje PET/CT.
- Raziskuje se uporaba nanoteles za zdravljenje raka, avtoimunskih in infekcijskih bolezni ter pri razvoju naprednih terapevtskih strategij, kot so sistemi TriKe, terapije s celicami CAR-T in konjugati nanotelo-zdravilo.
- Njihova specifičnost omogoča razvoj učinkovitih kandidatov bioloških zdravil za nevtralizacijo virusov, bakterijskih toksinov ter strupov kač in škorpionov.
- Od leta 2018 so odobrena štiri zdravila na osnovi nanoteles (npr. kaplacizumab, ozoralizumab, enavafolimab), število kliničnih preskušanj pa po letu 2018 hitro narašča.

večjo površino za interakcijo z antigenom (11, 12). Regije FR lahko pri nanotelesih sodelujejo pri vezavi, česar klasična protitelesa ne omogočajo (13). Izmed regij FR je FR2 običajno ohranjena in pri klasičnih protitelesih vsebuje hidrofobne aminokisline, ki interagirajo s hidrofobnimi regijami V_L . Pri težkoverižnih protitelesih pa regija FR2 vsebuje hidrofilne aminokisline, in sicer $V_H \rightarrow V_HH$: Val37Phe ali Tyr, Gly44Glu, Leu45Arg ali Cys, in Trp47Gly (11). Zaradi teh zamenjav so nanotelesa bolj topna v vodi in manj agregirajo. V nanotelesih se lahko pojavita še dva dodatna Cys, eden v zanki CDR1 ali regiji FR2 in drugi v zanki CDR3, ki tvorita disulfidni most in tako dodatno stabilizirata celotno strukturo (14). Zanka CDR3 je pri klasičnih in težkoverižnih protitelesih v največji meri odgovorna za prepoznavanje in vezavo z antigenom. Zanka CDR3 pri klasičnih protitelesih tvori votlino, žleb ali ravno površino, ki je ustrezna za prepoznavanje haptenov, peptidov ali epitopov na velikih proteinih. Pri težkoverižnih protitelesih pa je zanka CDR3 konveksne oblike, ki prodre v majhne votline na površini antigena oziroma interagira z antigenскими konkavnimi površinami. Tako lahko nanotelesa prepoznajo katalitska mesta encimov in modulirajo njihovo funkcijo (15). Protitelesa in nanotelesa se z antigen vezavno domeno (paratopom) vežejo na različne epitope istega antigena. Nanotelesa so najmanjši naravni antigen-vezavni fragmenti z edinstvenimi lastnostmi (16). V primerjavi s klasičnimi

protitelesi imajo nanotelesa številne prednosti kot tudi določene slabosti (17):

- majhna velikost, ki je prednost pri ciljanju slabo dostopnih tkiv,
- močna afiniteta za vezavo na antigen,
- konveksni paratop, primeren za prepoznavanje katalitičnih mest encimov,
- stabilnost pri nefizioloških vrednostih pH (pH v območju od 3 do 9) in pri daljši izpostavljenosti povišani temperaturi (60–80 °C, nekaj tednov pri 37 °C), kemičnim denaturantom (2–3 M gvanidiniem kloridu, 6–8 M urei) in proteolitičnim encimom,
- dobra topnost v vodi,
- stroškovno učinkovita proizvodnja v mikrobnih sistemih z nespremenljivimi lastnostmi,
- hitro izločanje iz ledvic,
- odsotnost s Fc posredovalnih učinkov.

Z več kot 80% podobnostjo nukleotidnega zaporedja veljajo nanotelesa za strukturno podobna klasičnim imunoglobulinom, zaradi česar niso imunogena in so primerna za uporabo pri ljudeh (14).

3 POSTOPEK PRIDOBIVANJA NANOTELES

Nanotelesa lahko pridobimo iz treh vrst knjižnic: imunske, naivne in sintetične (4). Imunske knjižnice se pridobijo z vsaj 4-kratno imunizacijo živali družine *Camelidae*, ki traja približno 2 meseca. Nato se iz odvzete periferne krvi izolirajo limfociti, iz katerih se ekstrahira informacijska RNA (mRNA), sintetizira komplementarna DNA (cDNA) in izvede dvostopenjska verižna reakcija s polimerazo (PCR) ter gelska elektroforeza. Z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za zaporedje nanoteles, se pomnožijo V_H H. Ti amplikoni se nato vstavijo v vektor, kot je pHEN4, in se vnesejo v kompetentne celice, kot so celice bakterije *Escherichia coli*, s čimer se pridobi imunska knjižnica nanoteles (slika 2A). Knjižnica se nato obogati s fagnim prikazom, ki omogoča selekcijo nanoteles z visoko afiniteto do ciljnega antigena. Fagi, ki prikazujejo želeno V_H H z visoko afiniteto, se izolirajo in pomnožijo, slabše vezani fagi pa se odstranijo. Ta postopek se ponovi večkrat, da se obogatijo kloni z najvišjo afiniteto in specifičnostjo (slika 2B). Izbrana nanotelesa se nato preveri z encimsko imunskim testom (ELISA), določi se njihovo nukleotidno zaporedje in se jih nato proizvede v večjih količinah v bakterijah. Končne produkte se očisti s kovinsko-

kelatno afinitetno imunokromatografijo (IMAC) in kromatografijo z ločevanjem po velikosti (SEC). Končno čistost in velikost proteina se preveri s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE), kar je prikazano na sliki 2C (4, 18).

4 NANOTELESA V DIAGNOSTIKI

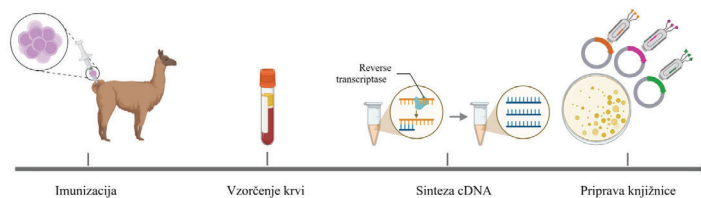
Raziskave o možni uporabi nanoteles potekajo na različnih področjih, vključno z diagnostiko. Na tem področju raziskovalci preučujejo različne metode, kot so imunokromatografija, biosenzorji in diagnostično slikanje (4).

4.1 IMUNOKROMATOGRAFIJA

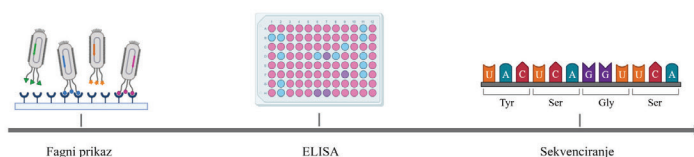
Imunokromatografija ali test s stranskim tokom je hiter diagnostični test, ki specifično zazna prisotnost antigena v vzorcu. Kot je prikazano na sliki 3, vzorec nanese na vzorčno blazinico. Vzorec potuje naprej na konjugirano blazinico, ki vsebuje za antigen specifično protitelo, konjugirano z obarvanim ali fluorescentnim označevalcem. Če je antigen v vzorcu prisoten, se veže na označeno protitelo in nastali kompleks potuje naprej po testnem traku. Nato vzorec preide na testno črto, na kateri so imobilizirana protitelesa, ki so zmožna vezati kompleks Ag-Ab. Nevezana označena protitelesa potujejo naprej na kontrolno črto, kjer se vežejo na druga imobilizirana protitelesa, ki potrjujejo pravilno delovanje testa. Na koncu presežek reagentov pripotuje na absorpcijsko blazinico. Rezultat testa se interpretira na podlagi prisotnosti obarvanih črt. Pri pozitivnem rezultatu sta vidni testna in kontrolna črta, pri negativnem rezultatu je vidna le kontrolna črta. V primeru odsotnosti kontrolne črte je test neveljaven ne glede na pojav testne črte. Spodnji del slike 3 prikazuje pozitivni, negativni in nepravilni rezultat testa (4).

Zaradi lastnosti nanoteles, kot so visoka stabilnost, afiniteta in odpornost na toploto, večji repertoar paratopov, odsotnost regije Fc, enostavna modifikacija v večvalentni konstrukt in enostavna adsorpcija na zlate nanodelce (4), bi lahko nanotelesa pri imunokromatografiji uporabljali namesto klasičnih protiteles. Z uporabo nanoteles so bili razviti različni imunokromatografski testi, na primer za detekcijo aflatoksina B1 (20) ter za potrjevanje okužbe s SARS-CoV-2 in s koronavirusom bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (MERS) (21).

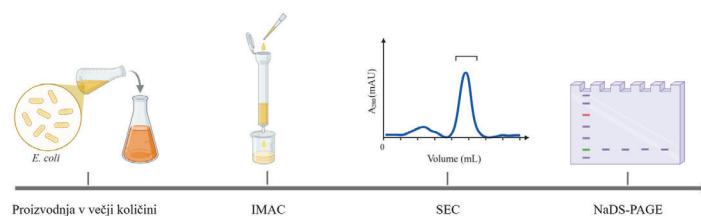
A) Imunizacija in priprava knjižnice



B) Izbor nanotelesa



C) Proizvodnja in čiščenje nanotelesa



Nanotelo

Slika 2: Shematski prikaz pridobivanja nanoteles iz imunske knjižnice. A) Imunizacija in priprava knjižnice. B) Izbor nanoteles s fagnim prikazom. C) Proizvodnja in čiščenje izbranih nanoteles. cDNA – komplementarna DNA, ELISA – encimskoimunski test, IMAC – kovinsko-kelatna afinitetna imunokromatografija, NaDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata, SEC – kromatografija z ločevanjem po velikosti. Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 2: Schematic representation of nanobody generation from an immune library. A) Immunization and library preparation; B) Nanobody selection by phage display; C) Production and purification of selected nanobodies. cDNA – complementary DNA, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, IMAC – immobilized metal affinity chromatography, NaDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, SEC – size exclusion chromatography. Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

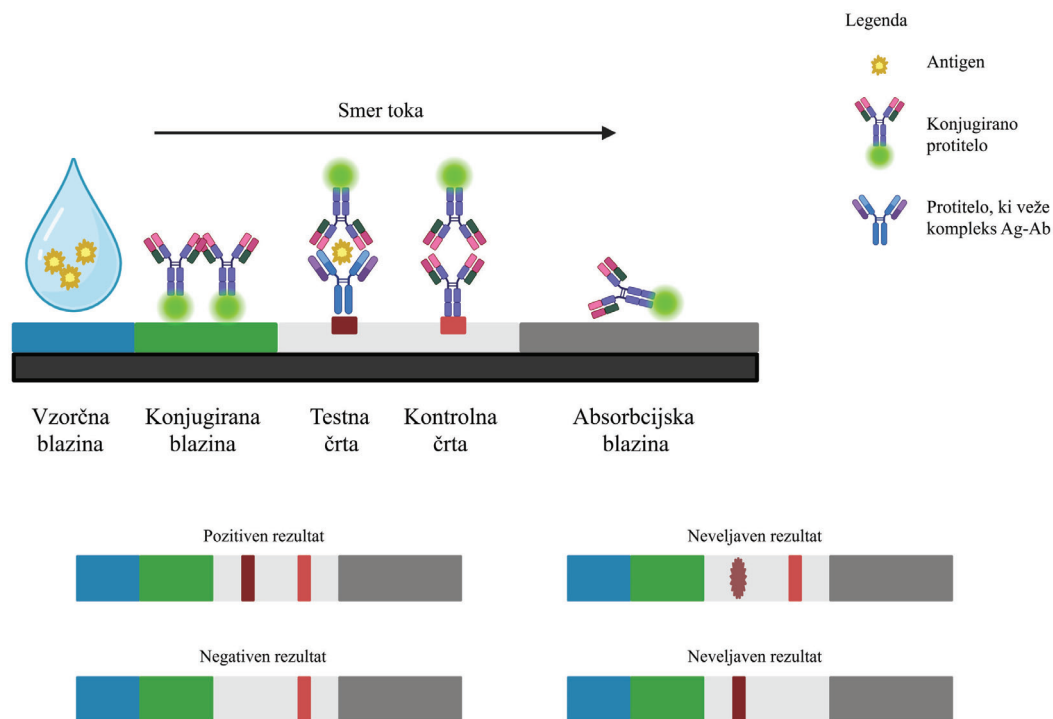
4.2 BIOSENZORJI

Biosenzorji so naprave, ki vsebujejo bioreceptor, specifičen za določen antigen, pritrjen na polprevodnik (slika 4). Po stiku med antigenom in bioreceptorjem pride do spremembe električnega potenciala, katerega signal se pomnoži in izmeri (22). Bioreceptor je na površini imobiliziran kovalentno s pomočjo sistema *SpyTag-SpyCatcher*, pri čemer je celoten proteinski kompleks dodatno sidran na funkcionalizirani heksanditiolni plasti, pritrjeni na elektrodo. Za zmanjšanje nespecifične vezave se površina po imobilizaciji blokira z govejim serumskim albuminom. Prednost

biosenzorjev je v njihovi hitrosti, če jih primerjamo z ELISA ali imunokromatografijo, saj je rezultat viden v nekaj sekundah. Nanotelesa so še posebej primerna kot idealni biosenzorji, saj lahko zdržijo visoke temperature in ekstremne vrednosti pH (23). Biosenzorji bazirani na nanotelesih so bili razviti za detekcijo SARS-CoV-2 in MERS (4).

4.3 DIAGNOSTIČNO SLIKANJE

Za diagnostično slikanje se med drugim uporabljajo optične in nuklearne metode, ki za vizualizacijo uporabljajo fluorescentno ali radioaktivno označene molekule. Za potrebe



Slika 3: Shematski prikaz imunokromatografskega testa. Vzorec potuje od vzorčne blazinice prek konjugirane blazinice do testne in kontrolne črte ter absorpcijske blazinice. Prikazani so pozitivni, negativni in neveljavni rezultati testa. Privzeto po (19). Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 3: Schematic representation of an immunochromatographic test. The sample migrates from the sample pad through the conjugate pad to the test and control lines and finally to the absorption pad. Positive, negative, and invalid test results are shown. Adapted from (19). Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

optičnega molekularnega slikanja so preskušali razliko med nanotelesom in konvencionalnim monoklonskim protitelesom cetuksimab, ki je usmerjeno proti receptorju za epidermalni rastni faktor (angl. *epidermal growth factor receptor*; EGFR). Nanotelo proti EGFR je omogočilo hitrejšo vizualizacijo tumorjev, saj se je signal pojavil že 30 minut po injiciranju, medtem ko pri cetuksimabu v tem času signal ni bil ločljiv od ozadja. Poleg tega je nanotelo učinkoviteje prodrlo v tumor in se po njem razporedilo (24).

Pri radiološkem slikanju, kot sta PET in enofotonska emisijska računalniška tomografija so izvedli več študij z radioaktivno označenim nanotelesom proti receptorju 2 za epidermalni rastni faktor (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*; HER2), ki so kazale na veliko razmerje tumor-kri/mišica, visok kontrast pri PET ter manjše obsevanje ostalih organov v primerjavi s konvencionalnimi monoklonskimi protitelesi (4).

Pomembna nadgradnja diagnostičnega slikanja, ki omogoča natančno spremljanje dinamike proteinov v živih

celicah, je bila objavljena v nedavni študiji. V njej je bil predstavljen inovativen primer sistema endogenega označevanja usmerjenega z nanotelesi, imenovan ALFA (angl. *ALFA Nb-guided endogenous labeling*; ANGEL). Pri tem pristopu se v genom s pomočjo gruč enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev s CRISPR povezanim proteinom 9 (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein 9*; CRISPR-cas9) vstavi majhna peptidna oznaka ALFA (ALFA-tag), ki jo specifično prepozna fluorescentno označeno nanotelo. Fluorescentni signal je prisoten le, kadar je ALFA-tag uspešno vgrajen, saj se nanotelo v odsotnosti tarče razgradi. To omogoča hitro prepoznavanje in izbor pravilno označenih celic ter natančno spremljanje proteinov v njihovem naravnem celičnem okolju. S tem je mogoče z enim samim nanotelesom specifično zaznati in spremljati endogene proteine, kar bistveno poveča uporabnost nanoteles v raziskavah in diagnostiki (25).

5 UPORABA NANOTELES PRI ZDRAVLJENJU

5.1 NANOTELESA PROTI RAKU

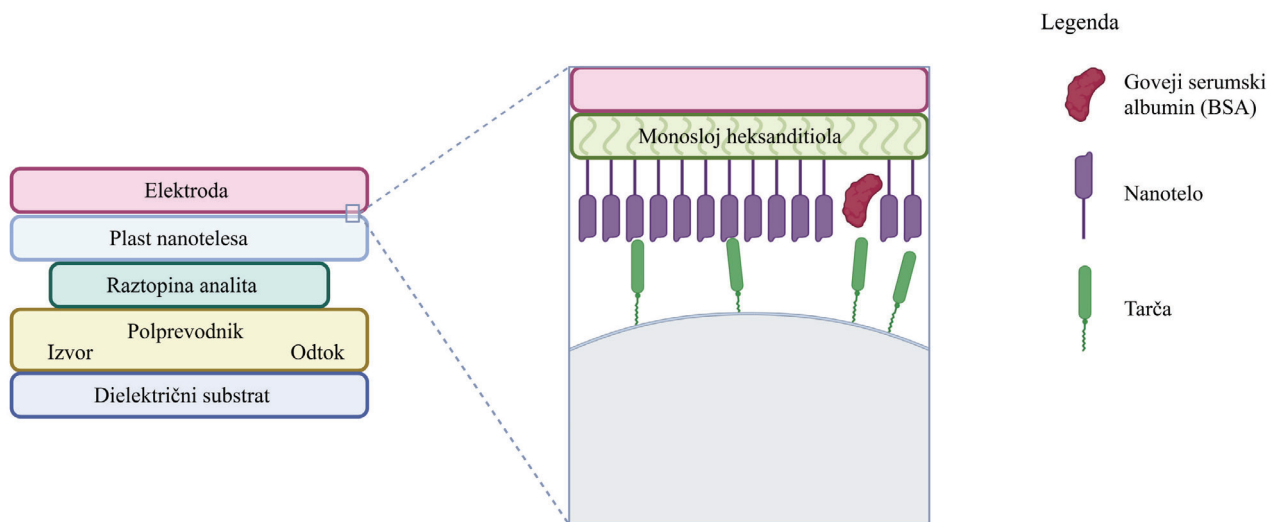
Poleg uporabe nanoteles pri diagnostičnem slikanju, raziskujejo možnost njihove uporabe tudi pri zdravljenju, predvsem v predkliničnih modelih in kliničnih raziskavah. Razvili so trispecifična nanotelesa tipa TriKe, ki aktivirajo naravne celice ubijalke in ciljajo receptor CLEC12a, značilen za akutno mieloično levkemijo. Pokazali so ozdravitev akutne mieloične levkemije *in vivo* z minimalnimi stranskimi imunskimi učinki, vendar se tovrstni terapevtski pristopi trenutno še ne uporabljajo v rutinski klinični praksi (26). Na področju TriKe je prvo klinično preskušanje faze 1/2 zaustavljeno (27), medtem ko drugo preskušanje faze 1/2 še pridobiva bolnike (28). Obstaja še veliko drugih multiparatopskih nanoteles, ki jih raziskujejo in so v kliničnih preskušanjih (18). Veliko se raziskuje tudi terapija na osnovi himernih anti-genjskih receptorjev T-celic (angl. *chimeric antigen receptor T-cells*; CAR-T), pri kateri se v T-celice vnese genski zapis

za himerni receptor, kjer nanotelo nadomešča klasični eno-verižni variabilni fragment (scFv) kot antigen vezavna do-mena. Trenutno so terapije CAR-T, ki uporabljajo nanotelesa kot vezavno domeno, še v fazi kliničnih preskušanj (29–31). Kljub temu predstavljajo nanotelesa obetavno al-ternativo, saj jih je v primerjavi z monoklonskimi protitelesi lažje genetsko spreminjati in proizvajati v različnih celičnih sistemih (18).

Poleg terapije CAR-T razvijajo konjugate protitelo-zdravilo, pri katerih je monoklonsko protitelo povezano s citotoksično učinkovino, delovanje pa je usmerjeno proti tarčnim celicam. V novejših pristopih monoklonska protitelesa nadomeščajo nanotelesa, kar tvori konjugat nanotelo-zdravilo. Zaradi svoje manjše velikosti imajo konjugati nanotelo-zdravilo potencial za lažji prehod skozi krvno-možgansko pregrado ter za učinkovitejše prodiranje v čvrste tumorje, kar je bilo že pokazano pri tarči HER-2 (32).

5.2 NANOTELESA PROTI AVTOIMUNSKIM BOLEZNIM

Luskavica je kronična vnetna avtoimunska bolezen, za ka-tero je značilno nenadzorovano razmnoževanje keratinoci-



Slika 4: Shematski prikaz biosenzorja: Biosenzor je sestavljen iz polimernega polprevodnika, elektrode in plasti imobiliziranih nanoteles, ki delujejo kot bioreceptorji. Analit je prisoten v raztopini nad senzorsko površino. Vezava tarče povzroči spremembo električnega potenciala na elektrodi, ki se zazna v obliki električnega toka preko polprevodnika. Povzeto po (22). Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 4: The biosensor consists of a polymer semiconductor, an electrode, and a layer of immobilized nanobodies that function as bioreceptors. The analyte is present in a solution above the sensor surface. Target binding induces a change in the electrical potential at the electrode, which is detected as a change in electrical current through the semiconductor. Adapted from (22). Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

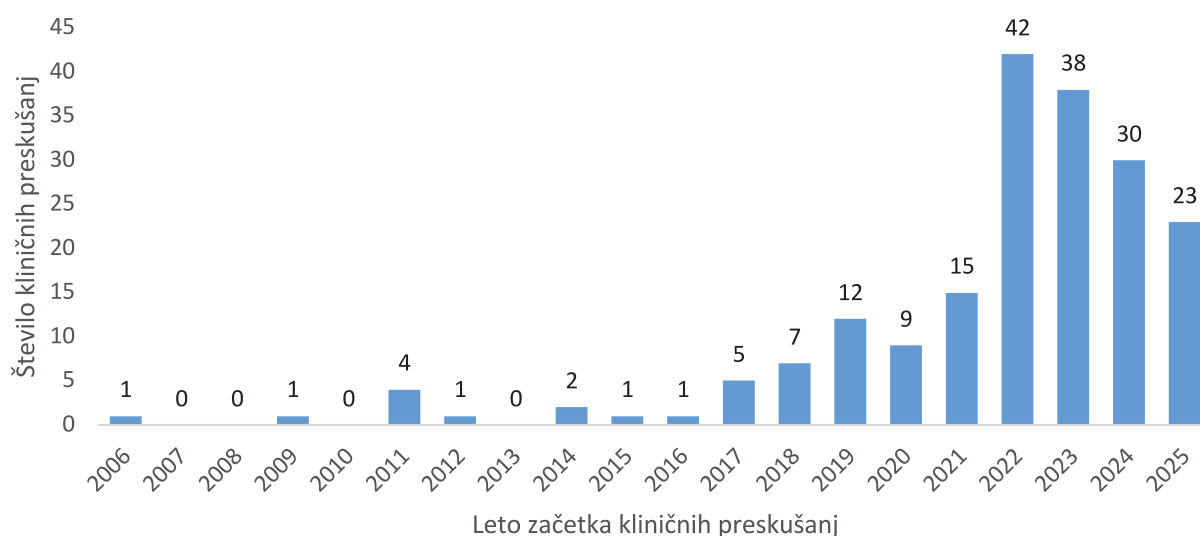
tov ter prekomerna aktivacija osi Th17/interlevkin 17 (IL-17), v kateri imata IL-17A in IL-17F osrednjo vlogo (33). Nanotelesa se lahko uporabijo za ciljanje različnih signalnih poti, med drugim imunskih signalnih poti. Sonelokimab je nanotelo, ki deluje proti IL17A, IL17F in človeškemu serumskim albuminom ter je uspešno prestalo fazo IIb kliničnih preskušanj za zdravljenje luskavice, pri čemer je pokazalo 76% odziv v primerjavi s skupino s placebom (33, 34). Trenutno poteka klinično preskušanje faze tri s sonelokimabom za zdravljenje hude oblike kronične vnetne kožne bolezni *hidradenitis suppurativa*, ki prizadane lasne mešičke (35). Poleg tega razvijajo druga nanotelesa, ki bi lahko zdravila druge avtoimunske bolezni (18). Raziskovalci so uspešno razvili nanotelo, usmerjeno proti IL23 in pokazali njegovo nevtralizacijsko aktivnost (36). To nanotelo bi lahko uporabili pri boleznih, kjer ima pomembno vlogo IL23, kot so revmatoidni artritis, Crohnova bolezen in psoriaza (37). Podobno razvijajo nanotelesa, ki ciljajo označevalce na monocitih in granulocitih (38). Poleg tega raziskujejo uporabo nanoteles na osnovi tehnologije mRNA. V tem pristopu lipidni nanodelci vsebujejo mRNA, ki kodira zapis za nanotelo proti citokinu, timusni stromalni limfopoetin (angl. *thymic stromal lymphopoietin*; TSLP), skupaj s sintetičnim glukokortikoidom budezonidom, kar predstavlja potencialno terapijo za astmo, odporno na klasično zdravljenje.

V mišjih modelih je ta terapija pokazala zmanjšano bronhialno hiperodzivnost in vnetje v dihalnih poteh (39).

5.3 NANOTELESA PROTI INFEKCIJSKIM BOLEZNIM

Trenutno je zdravljenje virusnih obolenj zelo omejeno v primerjavi z zdravljenjem bakterijskih okužb. Zato raziskujejo različne eksperimentalne načine zdravljenja, med drugim uporabo protiteles in nanoteles. Specifična nanotelesa so razvili proti respiratornemu sincicijskemu virusu (RSV), virusu SARS-CoV-2, citomegalovirusu, virusu človeške imunske pomanjkljivosti (HIV), virusu herpes simplex (HSV) ter virusu influence A (40). V drugi fazi kliničnih preskušanj so bila zaključena preskušanja uporabe nanoteles za zdravljenje okužb z RSV, *Campylobacter* in rotavirusu (40). Bakterije postajajo vse bolj odporne na antibiotike, zato potekajo raziskave tudi v tej smeri, saj je neučinkovitost nekaterih antibiotikov postala velik zdravstveni problem (18). Razvili so specifično nanotelo proti toksinu šiga in intiminu *E. coli Shiga*, ki sinergistično inhibira gastroenteritis z inhibicijo tako virulence kot adhezije (41). Razvili so tudi zunajcelične vezikle rdečih krvnih celic, ki izražajo nanotelo proti nevrotoksinu A in kažejo nevtralizacijsko aktivnost *in vivo* ter zagotavljajo zaščito proti 10.000×

Število kliničnih preskušanj o nanotelesih



Slika 5: Graf prikazuje število kliničnih preskušanj z nanotelesi v obdobju od 2006–2025, ki so razvrščene glede na leto začetka preskušanja. V analizo so bila vključena vsa registrirana preskušanja (zaključena, aktivna in načrtovana) (50).

Figure 5: The graph shows the number of clinical studies on nanobodies in the period from 2006 to 2025, classified according to the year when the study began. All registered studies (completed, active, and recruiting) were included in the analysis (50).

smrtni dozi nevrotoksina A iz bakterije *Clostridium botulinum* (42). Raziskovali so tudi uporabo nanotelesa kot diagnostičnega sredstva pri zaznavi stafilokoknega enterotoksina B (SEB), kjer so nanotelo konjugirali s *SpyTag*, tak konstrukt je lahko zaznal SEB z veliko analizo občutljivostjo (43).

5.4 NANOTELESA PROTI TOKSINOM IN STRUPOM

Nanotelesa kažejo potencial pri nevtralizaciji strupov kač in škorpionov. Razvili so več različnih nanoteles, ki nevtralizirajo toksine škorpionja *Androctonus australis hector* (Aah) ter kačje toksine α -kobratoksina kače *Naja kouthia*, kot tudi različna nanotelesa proti strupu kače *Bothrops atrox* (4). Nedavno so Ahmadi in sod. razvili rekombinantni protistrup na osnovi oligoklonalne mešanice nanoteles, ki omogoča širokospektralno nevtralizacijo strupov kober, mamb in rinkhalsov. Protistrup se je izkazal za učinkovitejšega od trenutno uporabljenih protistrupov iz plazme (44). Vsi opisani pristopi so bili do sedaj preučevani predvsem v predkliničnih modelih in še niso del standardnega zdravljenja zastrupitev pri ljudeh.

5.5 NANOTELESA, ODOBRENA ZA ZDRAVLJENJE

Prvo nanotelo, ki ga je leta 2018 odobrila Evropska agencija za zdravila (EMA), je bil kaplacizumab. To je bivalentno nanotelo proti von Willebrandovemu faktorju, ki se uporablja za zdravljenje pridobljene trombotične trombocitopenične purpore (angl. *thrombotic thrombocytopenic purpura*; TTP). Do leta 2024 so bila s strani regulatornih agencij odobrena štiri nanotelesa (6). Po uspehu kaplacizumaba je bil leta 2022 na Japonskem odobren ozoralizumab za zdravljenje revmatoidnega artritis. Ozoralizumab je trivalentno nanotelo, sestavljeno iz dveh humaniziranih nanoteles proti dejavniku tumorske nekroze alfa (TNF- α) in enega nanotelesa proti človeškemu serumskemu albuminu (45). V istem letu je bilo na Kitajskem odobreno nanotelo envafohimab, usmerjeno proti ligandu receptorja programirane celične smrti 1, ki se uporablja za zdravljenje različnih čvrstih tumorjev in kroničnega hepatitisa B, v ZDA tudi za sarkome mehkih tkiv in raka žolčevodov. Envafohimab je sestavljen iz nanotelesa proti receptorju programirane celične smrti 1, ki je z linkerjem povezan z regijo Fc IgG1 (46). Vsa tri omenjena nanotelesa se aplicirajo subkutano, kar omogoča lastnosti nanoteles, kot so majhna velikost in boljše

prehajanje v tkiva (47). Poleg njih je bilo leta 2022 odobren kiltakabtagen avtolevcel, zdravilo za napredno zdravljenje na osnovi celic CAR-T, ki temelji na nanotelesu proti antigenu B-celičnega dozorevanja (angl. *B-cell maturation antigen*; BCMA) in se uporablja za zdravljenje ponovnega ali refraktarnega multiplega mieloma (48).

Za že odobrena nanotelesa trenutno poteka več kliničnih preskušanj v fazah 1–3 (49). Kot prikazuje slika 5, se je število kliničnih preskušanj z nanotelesi začelo bistveno povečevati po letu 2018 z vrhom leta 2022, ko je bilo registriranih več kot 42 novih preskušanj. Po tem vrhu se je število novih preskušanj nekoliko zmanjšalo, kar je verjetno posledica zasičenosti določenih terapevtskih področij in časovnih zamikov pri registracijah. Kljub temu število novih kliničnih preskušanj ostaja bistveno višje kot pred letom 2018, kar potrjuje, da nanotelesa postajajo vse pomembnejše učinkovine (50).

6 SKLEP

Nanotelesa pridobivajo vse večjo vlogo v medicini, saj zaradi majhne velikosti, visoke specifičnosti in učinkovitega prehajanja v tkiva, predstavljajo obetavno alternativo monoklonskim protitelesom. Število kliničnih preskušanj narašča, predvsem za diagnostično slikanje s PET/CT ter za zdravljenje raka, avtoimunskih in infekcijskih bolezni. S strani regulatornih organov odobrena nanotelesa, kot so kaplacizumab, ozoralizumab in envafohimab, se uporabljajo kot subkutane injekcije, saj učinkoviteje prodirajo v tkiva. Zdravilo za napredno zdravljenje na osnovi celic CAR-T, ki temelji na nanotelesu, kiltakabtagen avtolevcel, pa se aplicira intravenozno. Nanotelesa dopolnjujejo obstoječe terapije in omogočajo razvoj bolj personaliziranih pristopov, kar se odraža v naraščajočem številu kliničnih preskušanj, ki kažejo na njihov velik potencial in vse večji interes v akademskem ter industrijskem prostoru.

7 IZJAVA

Delo je rezultat sodelovanja avtorjev v sklopu programa P1-0390, financiran s strani ARIS. Financer ni imel vloge



pri zasnovi preskušanja, zbiranju in analizi podatkov, odločitvi o objavi ali pripravi besedila.

8 LITERATURA

1. Aboul-Ella H, Gohar A, Ali AA, Ismail LM, Mahmoud AEE, Elkhatib WF, et al. Monoclonal antibodies: From magic bullet to precision weapon. *Mol Biomed*. 2024;5(1):47.
2. Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)*. 2014;3(4):113-6.
3. Kinch MS, Kraft Z, Schwartz T. Monoclonal antibodies: Trends in therapeutic success and commercial focus. *Drug Discov Today*. 2023;28(1):103415.
4. Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6).
5. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446-8.
6. Peng JY, Wang SY, Chen MQ, Liu CX, Zhao YT, Xu TS, et al. Efficacy and relative safety of caplacizumab in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review and meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2024;35(5):271-8.
7. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(6):1013-26.
8. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1-3):178-83.
9. Nguyen VK, Muyldermans S, Hamers R. The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J Mol Biol*. 1998;275(3):413-8.
10. Vincke C, Muyldermans S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. *Methods Mol Biol*. 2012;911:15-26.
11. Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit*. 1999;12(2):131-40.
12. Nanobodies - from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discov Today Technol*. 2010;7(2):e95-e146.
13. Zavrtanik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural Basis of Epitope Recognition by Heavy-Chain Camelid Antibodies. *J Mol Biol*. 2018;430(21):4369-86.
14. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(4):230-5.
15. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*. 2020;34(1):11-26.
16. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775-97.
17. De Vos J, Devoogdt N, Lahoutte T, Muyldermans S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(8):1149-60.
18. 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.
19. Hsiao WW, Le TN, Pham DM, Ko HH, Chang HC, Lee CC, et al. Recent Advances in Novel Lateral Flow Technologies for Detection of COVID-19. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(9).
20. Wang X, Sun T, Shen W, Liu M, Liu W, Zuo H, et al. A lateral flow immunochromatographic assay based on nanobody-oriented coupling strategy for aflatoxin B1 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023;394:134419.
21. Peng Y, Huang Y, Kiessling F, Renn D, Rueping M. Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for Rapid Antigen Detection of SARS-CoV-2 and MERS-CoV Proteins. *ACS Synthetic Biology*. 2025;14(2):420-30.
22. Katz HE. Antigen sensing via nanobody-coated transistors. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(7):639-40.
23. Fan R, Du J, Park KW, Chang LH, Strieter ER, Andrew TL. Immobilization of Nanobodies with Vapor-Deposited Polymer Encapsulation for Robust Biosensors. *ACS Appl Polym Mater*. 2021;3(5):2561-7.
24. 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.
25. Wang Z, Hu F, Xue F, He W, Yuan L, Xu P. ALFA nanobody-guided endogenous labeling. *Nat Chem Biol*. 2025.
26. Felices M, Warlick E, Juckett M, Weisdorf D, Valleria D, Miller S, et al. 444 GTB-3550 tri-specific killer engager TriKE™ drives NK cells expansion and cytotoxicity in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2021;9(Suppl 2):A473-A.
27. GTB-3550 (CD16/IL-15/CD33)Tri-Specific Killer Engager (TriKE®) for the Treatment of High Risk Myelodysplastic Syndromes, Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia and Advanced Systemic Mastocytosis [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03214666>.
28. HM2023-05: GTB-3650 (Anti-CD16/IL-15/Anti-CD33) Tri-Specific Killer Engager (TriKE®) for the Treatment of High Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML) [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06594445>.
29. A Multicenter Clinical Study on the Safety and Efficacy of Nanobody-based Biepitope CAR-T Cells Targeting BCMA in the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06503107>.
30. A Phase I Dose-Escalation and Phase II Study of Nanobody-Based CD19/CD22 Tandem Dual Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cell Therapy in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06880913>.
31. A Phase I Dose-Escalation and Phase II Study of Nanobody-Based CD5-Targeted CAR-T Cells for the Treatment of Relapsed or Refractory T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma (T-ALL/LBL) - The CONQUER Trial [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06874946>.
32. Wang Y, Liu L, Yang QY, Yu K. Novel anti-HER2 nanobody-drug conjugates with enhanced penetration of solid tumor and BBB, reduced systemic exposure and superior antitumor efficacy. *Acta Pharmacol Sin*. 2025.

33. Rubel D. Nanobody cytokine blockers in psoriasis. *Lancet*. 2021;397(10284):1523-4.
34. 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.
35. A Phase 3, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Subcutaneous Sonelokimab in Adult Participants With Moderate to Severe Hidradenitis Suppurativa [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06411899>.
36. Desmyter A, Spinelli S, Boutton C, Saunders M, Blachetot C, de Haard H, et al. Neutralization of Human Interleukin 23 by Multivalent Nanobodies Explained by the Structure of Cytokine-Nanobody Complex. *Front Immunol*. 2017;8:884.
37. Gevenois PJY, De Pauw P, Schoonooghe S, Delporte C, Sebt T, Amighi K, et al. Development of Neutralizing Multimeric Nanobody Constructs Directed against IL-13: From Immunization to Lead Optimization. *J Immunol*. 2021;207(10):2608-20.
38. Bachran C, Schröder M, Conrad L, Cragnolini JJ, Tafesse FG, Helming L, et al. The activity of myeloid cell-specific VHH immunotoxins is target-, epitope-, subset- and organ dependent. *Sci Rep*. 2017;7(1):17916.
39. Huang J, Bai X, Stewart W, Xu X, Zhang XQ. Budesonide-incorporated inhalable lipid nanoparticles for antiTSLP nanobody mRNA delivery to treat steroid-resistant asthma. *Nat Commun*. 2025;16(1):6013.
40. Verma V, Sinha N, Raja A. Nanoscale warriors against viral invaders: a comprehensive review of Nanobodies as potential antiviral therapeutics. *MAbs*. 2025;17(1):2486390.
41. Lu Z, Liu Z, Li X, Qin X, Hong H, Zhou Z, et al. Nanobody-Based Bispecific Neutralizer for Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *ACS Infect Dis*. 2022;8(2):321-9.
42. Huang NJ, Pishesha N, Mukherjee J, Zhang S, Deshycka R, Sudaryo V, et al. Genetically engineered red cells expressing single domain camelid antibodies confer long-term protection against botulinum neurotoxin. *Nat Commun*. 2017;8(1):423.
43. Anderson GP, Liu JL, Shriver-Lake LC, Zabetakis D, Sugiharto VA, Chen HW, et al. Oriented Immobilization of Single-Domain Antibodies Using SpyTag/SpyCatcher Yields Improved Limits of Detection. *Anal Chem*. 2019;91(15):9424-9.
44. Ahmadi S, Burlet NJ, Benard-Valle M, Guadarrama-Martínez A, Kerwin S, Cardoso IA, et al. Nanobody-based recombinant antivenom for cobra, mamba and rinkhals bites. *Nature*. 2025;647(8090):716-25.
45. Keam SJ. Ozoralizumab: First Approval. *Drugs*. 2023;83(1):87-92.
46. Markham A. Envafolelimab: First Approval. *Drugs*. 2022;82(2):235-40.
47. Alexander E, Leong KW. Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years. *J Nanobiotechnology*. 2024;22(1):661.
48. Guo S, Xi X. Nanobody-enhanced chimeric antigen receptor T-cell therapy: overcoming barriers in solid tumors with VHH and VNAR-based constructs. *Biomark Res*. 2025;13(1):41.
49. Clinical trials [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=envalfolimab&aggFilters=status:act%20rec%20not>.
50. Clinical trials. [internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/expert-search?term=%22nanobody%22%20OR%20%22single%20domain%20antibody%22%20OR%20%22VHH%22%20OR%20%22single-domain%20antibodies%22%20OR%20%22heavy-chain%20antibodies%22%20OR%20%22camelid%20antibodies%22%20OR%20%22recombinant%20single-domain%20antibodies%22%20OR%20%22domain%20antibodies%22%20OR%20%22nanomed%22%20OR%20%22envafolimab%22%20OR%20%22caplacizumab%22%20OR%20%22XJ101%22%20OR%20%22LMN-101%22%20OR%20%22KN046%22%20NOT%20%22KN026%22%20NOT%20%22pulse%20nanoMED%22&page=1&viewType=Table>.

