

Received: 2005.03.02

Accepted: 2005.04.13

Published: 2005.05.16

Ciężkołańcuchowe przeciwciała zwierząt z rodziny wielbłądowatych (*Camelidae*) i ich możliwe zastosowania*

Heavy-chain antibodies of the *Camelidae* and their possible applications

Marcin Czerwiński, Anna Krop-Wątopek

Zakład Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Przeciwciała podklas IgG2 i IgG3 zwierząt z rodziny wielbłądowatych składają się wyłącznie z ciężkich łańcuchów. Przyczyną takiej budowy przeciwciał jest punktowa mutacja miejsca na styku intronu i eksonu CH1 w genie kodującym łańcuch ciężki, w wyniku czego ciężkie łańcuchy nie mogą asocjować z lekkimi. Ciężkołańcuchowe przeciwciała zawierają wydłużony region zawiasowy i charakterystyczne mutacje w regionach zębowych. Mimo braku lekkich łańcuchów, przeciwciała wielbłądowatych wykazują prawidłową zdolność wiązania antygeny oraz aktywność efektorową. Ze względu na łatwość klonowania, dobrą stabilność, wysoką swoistość, małą masę cząsteczkową i zdolność do rozpoznawania unikalnych epitopów, przeciwciała te mogą znaleźć zastosowanie jako odczynniki diagnostyczne i terapeutyczne.

Słowa kluczowe:

przeciwciała ciężkołańcuchowe • wielbłądowate • fagowa biblioteka ekspresyjna

Summary

The immunoglobulins of the *Camelidae* family belonging to subclasses IgG2 and IgG3 consist of heavy chains only. The lack of light chains is caused by a point mutation in the heavy-chain gene, resulting in the loss of the splice consensus signal and the removal of the entire CH1 domain together with introns. The heavy-chains antibodies also contain longer hinge regions and conservative amino-acid substitutions in the framework regions. Despite the lack of light chains, the heavy-chain antibodies reveal normal antigen binding ability and effector functions. The heavy-chain antibodies are relatively easy to clone and possess good stability, high specificity, low molecular weight, and the ability to recognize unique epitopes. Possible areas of application of heavy-chain antibodies include their use as *in vivo* imaging reagents and sources of peptide-based drugs.

Key words:

heavy chain antibodies • camelidae • phage display library

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7440.pdf

Word count:

3356

Tables:

3

Figures:

5

References:

69

* Praca została przygotowana w ramach projektu grantowego nr 6 P04A 05621 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji.

Adres autora: doc. dr hab. Marcin Czerwiński, Zakład Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: czerwinski@immuno.iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **aa** – reszta aminokwasowa; **CDR** – region hiperzmienny (complementarity determining region); **VH** – region zmienny łańcucha ciężkiego klasycznego przeciwciała; **VHH** – region zmienny łańcucha ciężkiego przeciwciała ciężkołańcuchowego; **scFv** – jednołańcuchowy fragment Fv (single chain Fv); **BiP** – białko opiekuńcze siateczki śródplazmatycznej (heavy-chain binding protein); **VSG** – glikoproteina powierzchniowa świdrowca (variant surface glycoprotein); **RSS** – sekwencja sygnałowa rekombinacji (recombination signal sequence); **CEA** – antygen karcynomaembrionalny (carcinoembrionic antigen); **PSA** – antygen swoisty dla prostaty (prostate specific antigen); **EGFR** – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor)

1. WSTĘP

Immunoglobuliny stanowią grupę glikoprotein obecnych w surowicy i płynach tkankowych kręgowców; ich główną rolą jest wiązanie obcych antygenów. Immunoglobuliny występujące na powierzchni komórek B odgrywają rolę receptorów dla swoistych antygenów. Immunoglobuliny występujące w krwi i limfie są nazywane przeciwciałami. Immunoglobuliny i przeciwciała są zbudowane z łańcuchów ciężkich (wyróżnia się pięć typów: α , γ , δ , ϵ , μ) oraz łańcuchów lekkich (dwa typy: κ , λ). Podstawową jednostką budulcową przeciwciała (formy monomerycznej) są cztery łańcuchy polipeptydowe: dwa identyczne łańcuchy lekkie (każdy zbudowany z około 220 reszt aminokwasowych) i dwa identyczne łańcuchy ciężkie (każdy zbudowany z około 450–575 reszt aminokwasowych). W cząsteczce przeciwciała IgG można wyróżnić trzy fragmenty: fragment Fc, zbudowany z dwóch domen łańcucha ciężkiego (CH2 i CH3) oraz dwa identyczne fragmenty Fab, które zawierają fragment Fd złożony z domeny zmiennej (VH) i stałej (CH1). W skład fragmentu Fab wchodzi też łańcuch lekki, złożony z domeny zmiennej (VL) i stałej (CL).

Swoistość przeciwciał jest determinowana przez sekwencję i rozmiar regionów hiperzmiennych (complementarity determining regions – CDR) w domenach V. Regiony te tworzą powierzchnię komplementarną do antygeny. Miejsce wiążące antygen składa się z sześciu regionów CDR, określanych jako pętle wiążące. Pętle łańcucha lekkiego są określane jako CDR1-L1, CDR2-L2 i CDR3-L3, natomiast pętle łańcucha ciężkiego odpowiednio jako CDR1-H1, CDR2-H2 i CDR3-H3. Wyczerpujące omówienie budowy i funkcji immunoglobulin znaleźć można w książce Lefranc i Lefranc [36] oraz na stronie internetowej [32].

2. CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁ CIĘŻKOŁAŃCUCHOWYCH

2.1. Rodzina wielbłądowatych

W skład rodziny wielbłądowatych, ssaków rzędu parzystokopytnych, wchodzi sześć gatunków: afrykański dromader (wielbłąd jednogarbny *Camelus dromedarius*) i azjatycki baktrian (wielbłąd dwugarbny *Camelus bactrianus*), występująca na kontynencie amerykańskim lama (*Lama glama*) i jej dziki przodek gwanako (*Lama guanicoe*) oraz alpaka (*Lama pacos*) i jej dziki przodek wigoń (*Lama vicugna*). Wielbłądowate są dobrze przystosowane do bytowania w niesprzyjających, pustynnych i wysokogórskich warunkach. Ich zdolność utraty wody może wynosić do 30% masy ciała, podczas gdy dla innych ssaków już 12% jest wielkością śmiertelną. Duża odporność na odwodnienie wynika

m.in. z ich zdolności do zmiany temperatury ciała w ciągu dnia, umożliwiającej obniżenie parowania, a także z obecności odpornych na zmiany siły jonowej erytrocytów.

2.2. Budowa przeciwciał ciężkołańcuchowych

Niezwykłą cechą wielbłądowatych są homodimeryczne przeciwciała, złożone wyłącznie z łańcuchów ciężkich [28]. Przeciwciała klasy IgG rodziny wielbłądowatych dzielą się na trzy podklasy: IgG1, IgG2 i IgG3. Przeciwciała IgG1 mają klasyczną budowę (składają się z ciężkich i lekkich łańcuchów) i stanowią prawie 50% wszystkich przeciwciał klasy IgG. Przeciwciała IgG2 i IgG3 składają się wyłącznie z ciężkich łańcuchów, a ich zmienne fragmenty noszą nazwę VHH. Przeciwciała podklasy IgG2 dzielą się na trzy dodatkowe podklasy, IgG2a, IgG2b i IgG2c, przy czym podklasa IgG2b występuje wyłącznie u lam. Wielbłądy mają pięć, a lamy sześć funkcjonalnych genów γ [10]. Ciężkie łańcuchy IgG2a, IgG2b, IgG2c i IgG3a nie zawierają regionu CH1, a ich region zawiasowy jest często wydłużony (tabela 1).

Schemat budowy przeciwciał klasycznych i ciężkołańcuchowych przedstawiono na ryc. 1.

Charakterystyczną cechą wydłużonego regionu zawiasowego są powtórzone sekwencje proliny i glutaminy oraz proliny i lizyny (PQ i PK), co wskazuje, że taki region zawiasowy może przyjmować strukturę sztywnego pręta [41]. Funkcja takiej struktury może polegać na zwiększaniu odległości między miejscami wiążącymi antygen (Fab), które w przypadku przeciwciał VHH znajdują się bliżej siebie ze względu na brak segmentu CH1. Interesujące jest również to, że region zawiasowy w wielbłądzim ciężkim łańcuchu IgG2 jest kodowany przez pojedynczy ekson, w odróżnieniu od regionu zawiasowego w ludzkim ciężkim łańcuchu IgG3, który ma podobną długość i jest kodowany przez cztery eksyony [42].

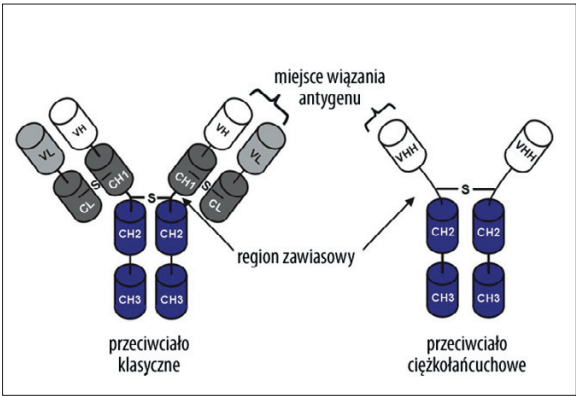
Przeciwciała składające się wyłącznie z ciężkich łańcuchów znaleziono u wielu gatunków ssaków, ale przeciwciała te niezdolne są do wiązania antygeny, a ich powstanie wynikało z patologii układu odpornościowego [56]. W przeciwieństwie do takich przeciwciał, ciężkołańcuchowe przeciwciała rodziny wielbłądowatych są funkcjonalne.

Przyczyną, dla której wielbłądzie komórki plazmatyczne wydzielają przeciwciała pozbawione lekkich łańcuchów, jest brak regionu CH1. Z regionem tym wiąże się białko opiekuńcze BiP (heavy-chain binding protein) siateczki śródplazmatycznej. Białko to, należące do rodziny białek szoku ciepła

Tabela 1. Podklasy immunoglobulin u wielbłądowatych oraz sekwencje regionów zawiasowych (według [41,10])

Podklasa	Stężenie w osoczu (mg/ml)	M.cz. (kDa)	Region zawiasowy	
			Sekwencja aminokwasowa	Długość (aa)
IgG1a wielbłąd	3	55	ELEIS-----EPQSQP-----GCTCPKCP	19
IgG1a lama		55	ELKTP-----QPQSQP-----ECRCPKCP	19
IgG1b wielbłąd		55	EPHG-----GCPCPKCP	12
IgG1b lama		55	EPHG-----GCPCPKCP	12
IgG2a wielbłąd	1	45	EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP	35
IgG2a lama		42	EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP	35
IgG2b lama		42	EPKTP----KPQPQPKPQPQP--NPTAESKCPKCP	29
IgG2c wielbłąd		45	AHHPE-----DPSS-----QCPKCP	15
IgG2c lama	2	42	AHHSE-----DPSS-----KCPKCP	15
IgG3 wielbłąd		43	GTNE-----VCKCPKCP	12
IgG3 lama		43	GTNE-----VCKCPKCP	12

aa – reszty aminokwasowe. Kreska oznacza brak reszty aminokwasowej.



Ryc. 1. Schemat budowy klasycznego i ciężkołańcuchowego przeciwciała

nego Hsp 70, pełni główną rolę w tworzeniu heterodimerów łańcuchów ciężkich i lekkich: BiP wiąże ciężkie łańcuchy i zatrzymuje je w siateczce śródplazmatycznej aż do przyłączenia łańcuchów lekkich. Jeżeli związany z białkiem BiP ciężki łańcuch nie połączy się z łańcuchem lekkim, zostanie zdegradowany przez wewnątrzkomórkowy system proteolityczny [30]. Ciężkie łańcuchy pozbawione fragmentu CH1 nie są rozpoznawane przez białko BiP i zostają wydzielone, mimo że nie utworzyły par z łańcuchami lekkimi.

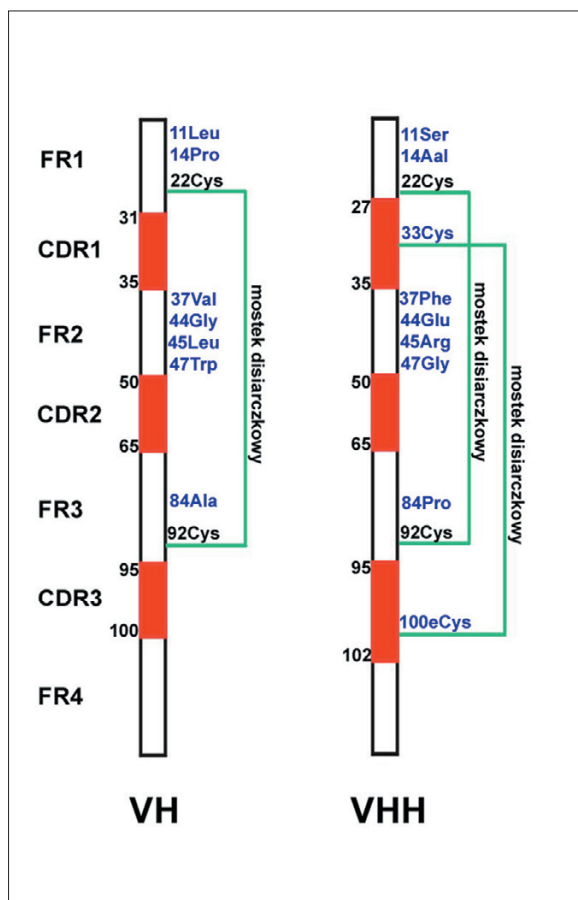
Brak fragmentu CH1 w przeciwciałach podklas IgG2 i IgG3 jest z kolei spowodowany punktową mutacją w 5'-miejscu zespalańia składowych eksonów Ig2 i Ig3 (5'-splice site): konsensowa guanina w miejscu G/GTAAG (ekson/intron) została zastąpiona przez adeninę. W wyniku tej mutacji, miejsce zespalańia składowych AG/ATAAGT nie jest rozpoznawane przez splajsosom i cały ekson CH1 ulega wycięciu wraz z przylegającymi intronami [42,67]. Sekwencje miejsc zespalańia składowych na granicy eksonu CH1 i intronu u różnych gatunków przedstawiono na ryc. 2.

		Ekson CH1	Intron
Mysz	IgG1	ACAAGAAAATG	GTGAGAGG
Mysz	IgG2b	...A...C...	A
Szczur	IgG1	G...	C
Szczur	IgG2b	G...	A
Królik	IgG	CCG...	A
Krowa	IgG1	GCTG...	A
Człowiek	IgG1	G...	C
Człowiek	IgG2	C.G...	A
Wielbłąd	IgG1	GTG.G.	...A...TA.
Wielbłąd	IgG2a	GTG.G.	A...TA.
Lama	IgG1	CGTG.G.	...A...TA.
Lama	IgG2a	CGTG.G.	A...TA.
Konsens		AG	GTAAGT

Miejsce zespalańia składowych (5'- splice site)

Ryc. 2. Nukleotydowe sekwencje miejsca zespalańia składowych na styku eksonu CH1 i intronu (według [42,67]). Mutację G→A zaznaczono kolorem czerwonym. Kropki oznaczają identyczność z sekwencją IgG1 myszy

W konsekwencji, ciężkie łańcuchy przeciwciał rodziny wielbłądowatych wykazują kilka charakterystycznych cech. Ich regiony CDR1 i CDR3 są dłuższe niż w przeciwciałach klasycznych, a między cysteinami obecnymi w tych regionach powstaje mostek disiarczkowy. Mostek ten prawdopodobnie podwyższa sztywność cząsteczki, obniżoną wskutek braku lekkiego łańcucha. Stwierdzono, że stabilność fragmentów VHH jest podobna lub nieco niższa od stabilności ludzkich fragmentów VH kodowanych przez geny należące do rodziny VH3 (geny kodujące fragmenty VHH należą do tej samej rodziny) [25]. Stwierdzono również, że reszty aminokwasowe w regionach hiperzmiennych wykazują większe zróżnicowanie w porównaniu z regionami hiperzmiennymi przeciwciał innych gatunków [43,66,67]. Ponadto, w ciężkołańcuchowych przeciwciałach występują charakterystyczne mutacje, w wyniku których hydrofobo-



Ryc. 3. Schemat budowy regionu zmiennego klasycznego przeciwciała (VH) i przeciwciała ciężkołańcuchowego (VHH). Czerwonym kolorem zaznaczono regiony hiperzmiennne (CDR) oraz numery reszt aminokwasowych, które je ograniczają (numeracja według: [34]). Niebieskim kolorem zaznaczono reszty aminokwasowe, którymi ciężki łańcuch VHH różni się od klasycznego łańcucha VH

we reszty aminokwasowe zostały zastąpione przez reszty hydrofilowe [40]. Najważniejsze z tych podstawień to:

44: Gly→Glu

45: Leu→Arg

47: Trp→Gly (numeracja reszt według: [34]).

Takie podstawienia aminokwasowe znaleziono we wszystkich poznanych sekwencjach aminokwasowych przeciwciał ciężkołańcuchowych. [41]; powodują one obniżenie hydrofobowości domen VHH i zwiększenie ich rozpuszczalności, ponieważ reszty 44, 45 i 47 w klasycznych ciężkich łańcuchach tworzą hydrofobową powierzchnię, która wiąże lekki łańcuch [31]. W wyniku tych podstawień lekki łańcuch nie może asocjować z łańcuchem ciężkim.

W przeciwciałach ciężkołańcuchowych spotykane są również inne podstawienia aminokwasowe:

11: Leu→Ser

14: Pro→Ala

33: różne aminokwasy→Cys

37: Val→Phe

84: Ala→Pro

100e: różne aminokwasy→Cys

Cysteiny w pozycjach 33 i 100e tworzą dodatkowy mostek disiarczkowy i są obecne w wielu przeciwciałach VHH [41]. Interesujące jest to, że cysteiny te nie są kodowane przez geny zarodkowe, a ich obecność jest wynikiem somatycznej hipermutacji [39]. Schemat budowy zmiennych regionów ciężkich łańcuchów VH i VHH przedstawiono na ryc. 3.

Funkcjonalne przeciwciała składające się wyłącznie z ciężkich łańcuchów znaleziono również u niektórych gatunków ryb (*Ginglymostoma cirratum*, *Orectobulus maculatus* i *Hydrolagus colliei*). Podobnie jak u wielbłądowatych, przeciwciała te również nie zawierają segmentu odpowiadającego domenie CH1, a hydrofobowe reszty aminokwasowe, które oddziałują z lekkim łańcuchem, są podstawione przez reszty hydrofilowe [26,51]. Określono też krystaliczne struktury takich ciężkołańcuchowych przeciwciał [58,60].

2.3. Zróżnicowanie przeciwciał ciężkołańcuchowych

Teoretycznie, brak lekkiego łańcucha w przeciwciałach ciężkołańcuchowych powinien powodować zmniejszenie repertuaru przeciwciał, ponieważ nie ma możliwości kombinatorycznego zróżnicowania miejsca wiążącego antygen poprzez tworzenie par różnych lekkich i ciężkich łańcuchów. Stwierdzono jednak, że geny zarodkowe kodujące ciężkie łańcuchy VHH wykazują wyższy stopień zróżnicowania w porównaniu z genami kodującymi ciężkie łańcuchy klasycznych przeciwciał, a dodatkowym czynnikiem zwiększającym zróżnicowanie tych przeciwciał jest bardzo wydajny system somatycznej hipermutacji [43]. Stopień somatycznego zmutowania w ciężkich łańcuchach VHH jest wyraźnie wyższy niż w klasycznych ciężkich łańcuchach, przy czym mutacje te występują nie tylko w regionach hiperzmiennych, ale również w regionach zrzębowych (najczęściej mutacje takie znajdowane są w obrębie reszt aminokwasowych 28-31 w FR1 i 79-85 w FR3). Sekwencje te mogą być więc zaliczone do regionów hiperzmiennych [45]. Podwyższona liczba mutacji somatycznych w tych regionach jest związana z obecnością w genach, które je kodują, licznych sekwencji Rogozina [53,54]. Sekwencje te są rozpoznawane przez nukleazę wprowadzającą asymetryczne nacięcia w eksonie VH [47]. Nacięcia te są miejscami, w które polimeraza DNA wprowadza punktowe mutacje, czego następstwem jest somatyczna hipermutacja regionów zmiennych immunoglobulin [18].

Tak wysokie zróżnicowanie regionów zmiennych ciężkich łańcuchów VHH ma również dodatkową konsekwencję. Zgodnie z teorią struktur kanonicznych, przedstawioną przez Chothię [1,4,5,6,7], łańcuch polipeptydowy regionu zmiennego może przyjmować ograniczoną liczbę struktur, zwanych strukturami kanonicznymi. Za kształtowanie struktur kanonicznych odpowiedzialnych jest kilka reszt aminokwasowych, zwanych resztami kluczowymi. Obecnie znane są trzy struktury kanoniczne dla regionu CDR1 (H1) i cztery dla regionu CDR2 (H2) w klasycznym łańcuchu ciężkim. W pętach H1 przeciwciał ciężkołańcuchowych znaleziono jedną, a w pętach H2 dwie nowe struktury kanoniczne, charakterystyczne tylko dla przeciwciał ciężkołańcuchowych, które są wynikiem obecności dodatkowych reszt aminokwasowych w regionach hiperzmiennych [15,16].

Stwierdzono również, że liczba segmentów VHH, których długość różni się od długości kodujących je genów zarodkowych, jest u wielbłądowych znacząco wyższa niż u innych ssaków [43]. Różnice te, powodowane przez mechanizm somatycznej hipermutacji, są wynikiem insercji lub delecji nukleotydów [44]. Domeny zmienne przeciwciał ciężkołańcuchowych (VHH) są kodowane przez inne geny V niż te, które kodują domeny zmienne klasycznych przeciwciał. Stwierdzono, że genom wielbłąda zawiera około 40 genów VHH i 50 genów VH. Oba typy genów zawierają takie same sekwencje regulatorowe, promotor, ekson kodujący peptyd wiodący (leader peptide) i sekwencję sygnałową rekombinacji (RSS) [43]. Wszystkie geny kodujące łańcuchy VHH należą do tej samej rodziny VH3, przy czym u wielbłąda można wyróżnić 7 podrodzin [41], a u lamy 4 podrodziny [29]. Oba rodzaje przeciwciał są kodowane przez te same geny D_H i J_H [41].

Ze względu na brak łańcucha lekkiego, przeciwciała ciężkołańcuchowe oddziałują z antygenem za pośrednictwem dwukrotnie mniejszej liczby regionów hiperzmiennych, niż w przypadku klasycznych przeciwciał; brak łańcucha lekkiego powoduje ponadto wyekspozowanie regionów hiperzmiennych. Wiąże się z tym kolejna cecha przeciwciał ciężkołańcuchowych: ich regiony hiperzmiennicze często zachowują się jak inhibitory enzymów. Przykładem może być ciężkołańcuchowe przeciwciała AMD09, które rozpoznaje α -amylazę i jest jednocześnie jej inhibitorem [19]. Wiązanie cząsteczki α -amylazy następuje wyłącznie za pośrednictwem regionu CDR2: dwie reszty aminokwasowe tego regionu, Tyr52 i Arg52a, blokują miejsce aktywne enzymu, uniemożliwiając wiązanie substratu [20]. Innym przykładem zahamowania aktywności enzymatycznej przez region hiperzmienny jest wielbłądzie przeciwciała cAb-Lys3, które rozpoznaje lizozym. Stwierdzono, że bardzo długi (24 reszty aminokwasowe) region CDR3 tego przeciwciała wnika w centrum aktywne enzymu, upodabniając się do polimeru kwasu N-acetylmuraminowego i N-acetyloglukozaminy. Polimer ten jest substratem dla lizozymu [62]. Również ciężkołańcuchowe przeciwciała cA05, rozpoznające anhidrazę węglanową, wiąże się z enzymem za pośrednictwem tylko jednego regionu hiperzmiennego, CDR3 [19].

Ciężkołańcuchowe przeciwciała mają zdolność wiązania fragmentu C1q dopełniacza i receptorów Fc, czyli nie różnią się pod tym względem od przeciwciał klasycznych. Ich glikozylacja jest również podobna: charakterystyczne dla większości przeciwciał miejsce N-glikozylacji: Asn(297)-Ser-Thr, występuje również w ciężkich łańcuchach VHH. Można więc stwierdzić, że ciężkołańcuchowe przeciwciała wielbłądowych wykazują prawidłową aktywność efektorową i stanowią integralną część systemu odpornościowego tych zwierząt [42].

Lekkie łańcuchy κ i λ są zdolne do tworzenia funkcjonalnej pary z klasycznym łańcuchem ciężkim (np. klasy IgG1 lub IgM). Stwierdzono, że lekki łańcuch λ ma potencjalnie miejsce N-glikozylacji w regionie CL (Asn-143) [37].

Interesującym i w dalszym ciągu niezbadanym zagadnieniem jest przełączanie izotypu w przeciwciałach ciężkołańcuchowych. U większości ssaków w komórkach pro-B (CD43⁺) następuje ekspresja ciężkiego łańcucha klasy IgM

(kodowanego przez zrearranżowane geny V-D-J), przy czym zamiast lekkiego łańcucha występuje kompleks białek λ -5/12.1 i VpreB [22]. Komórki, które wytworzyły taki produktywny kompleks, ulegają dalszemu zróżnicowaniu do komórek pre-B (CD43⁺), a rearanżacji ulegają wtedy geny kodujące łańcuchy lekkie. W przypadku rodziny wielbłądowych, w limfocytach krwi obwodowej nie udało się znaleźć mRNA kodującego region VHH z ciężkim łańcuchem μ . W limfocytach ze śledziony znaleziono natomiast niewielkie ilości zrearranżowanych genów VHH połączonych z genem kodującym ciężki łańcuch μ . Można się więc pokusić o hipotezę, że u wielbłądowych istnieje dwie ścieżki dojrzewania limfocytów B: komórki pro-B prezentujące na powierzchni ciężkie łańcuchy kodowane przez zrearranżowane geny VH różnicują się rearanżując lekkie łańcuchy, natomiast komórki pro-B, w których ciężkie łańcuchy są kodowane przez geny VHH, przełączają łańcuch μ na łańcuch IgG2 lub IgG3, bez rearanżacji *loci* łańcucha lekkiego [41].

3. ZASTOSOWANIE PRZECIWCIAŁ CIĘŻKOŁAŃCUCHOWYCH

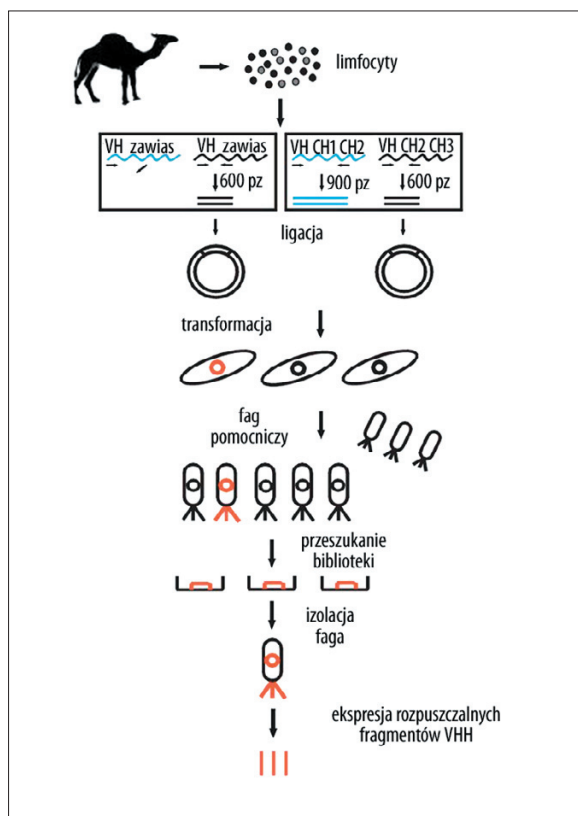
3.1. Immunizacja wielbłądów i lam

Wielbłądy i lamy immunizowano przeciw ospie wielbłądziej i tężcowi. Ilość antygeny potrzebna do immunizacji jest podobna, jak w przypadku innych ssaków [48]. Ogólnie, antygeny białkowe dają wyższe miano przeciwciał niż hapteny [41]. W wyniku trawienia przeciwciał ciężkołańcuchowych endoproteazą V8 otrzymuje się fragmenty VHH, które następnie można oczyścić za pomocą białka A (przeciwciała wielbłąda) lub białka G (przeciwciała lamy) [35,64]. Homodimeryczne fragmenty VHH można otrzymać w wyniku trawienia pepsyną [27].

3.2. Monoklonalne fragmenty VHH

Jeżeli stwierdzi się, że immunizowany wielbłąd lub lama wytwarza przeciwciała reagujące z danym antygenem, to możliwe jest sklonowanie monoklonalnych fragmentów Fab metodą ekspresji fagowej (omówione w [3]). Technika ta polega na izolacji mRNA z limfocytów krwi obwodowej, amplifikacji cDNA kodującego regiony VHH i ekspresji tych regionów na powierzchni faga M13. Schemat metody przedstawiono na ryc. 4. Wirion faga, na powierzchni którego znajduje się wyselekcjonowana cząsteczka VHH, zawiera jednocześnie DNA kodującą tę cząsteczkę. Jeżeli zatem prezentowany na powierzchni faga fragment VHH jest swoistym ligandem dla antygeny to cząsteczka ta może być użyta do selekcji tego liganda, przy czym wirion faga zostanie również wyselekcjonowany. Propagacja, czyli namnożenie faga pozwala więc na uzyskanie DNA kodującego cząsteczkę, której biologiczne właściwości są określone przez oddziaływanie z ligandem (omówione w [49])

Klonowanie klasycznych przeciwciał polega na amplifikacji cDNA kodującego zmienne regiony ciężkich i lekkich łańcuchów i niezależnym sklonowaniu tych fragmentów DNA w odpowiednim wektorze ekspresyjnym [3]. Rekombinowane przeciwciała mogą być otrzymane w dwóch postaciach: jako fragmenty Fab lub jako jednołańcuchowe fragmenty Fv. Jeżeli amplifikuje się cDNA kodujące zmienny region ciężkiego łańcucha i fragment CH1 oraz cały łańcuch lekki, to w wyniku ekspresji w przestrze-

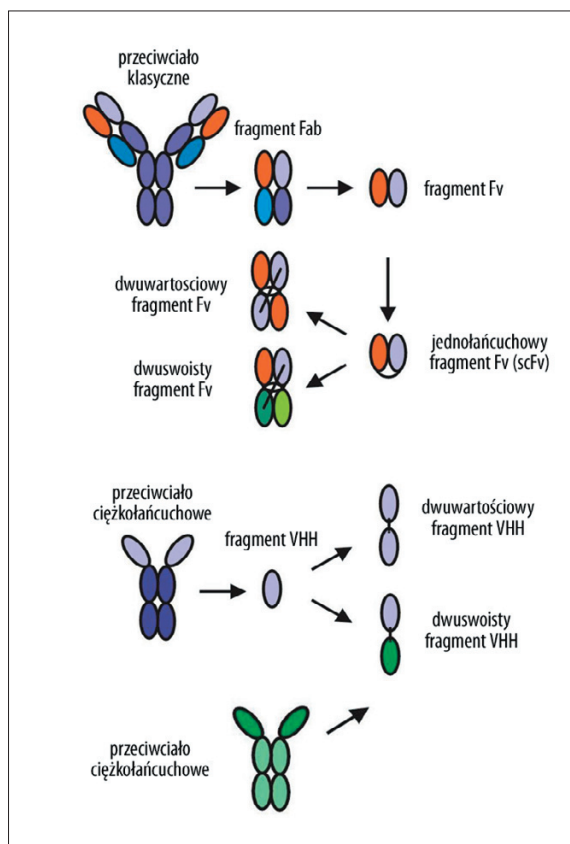


Ryc. 4. Schemat klonowania fragmentów VHH z limfocytów krwi obwodowej immunizowanego wielbłąda z zastosowaniem fagowej biblioteki ekspresyjnej

ni peryplazmatycznej bakterii *E. coli* otrzymuje się rekombinowane fragmenty Fab. Amplifikacja wyłącznie zmiennych regionów ciężkich i lekkich łańcuchów, po połączeniu za pomocą krótkiego peptydu, umożliwia otrzymanie jednołańcuchowych fragmentów Fv (single chain Fv, scFv); fragmenty takie można wytwarzać w cytoplazmie bakterii. Schemat tego procesu przedstawiono na ryc. 5.

W przypadku przeciwciał ciężkołańcuchowych fragment wiążący antygen może być otrzymany po amplifikacji cDNA kodującego zmienny region łańcucha ciężkiego, co stanowi znaczne uproszczenie procedury [63]. Ponieważ geny kodujące wszystkie zmienne regiony łańcuchów VHH należą do tej samej rodziny VH3 [43], stosować można jeden zestaw starterów [2]. W celu amplifikacji cDNA kodującego przeciwciała ciężkołańcuchowe, należy zastosować 3'-startery swoiste dla regionów zawiasowych IgG2 i IgG3. Alternatywnie, stosować można 3'-startery swoiste dla regionu CH2, z tym, że w tym wypadku konieczne jest oczyszczenie na żelu cDNA kodującego łańcuchy VHH, ponieważ klasyczne łańcuchy VH również ulegną amplifikacji. Schemat klonowania zmiennych regionów VHH przedstawiono na ryc. 4.

Zastosowanie techniki ekspresji fagowej umożliwiło sklonowanie i otrzymanie ponad 100 fragmentów VHH, z czego kilkanaście otrzymano w postaci krystalicznej (tabela 2). Fragmenty VHH charakteryzują się na ogół wysoką swoistością, brakiem reaktywności krzyżowej i stałymi dysocjacji wiązania antygeny w zakresie 3–300 nM [2]. Ponadto,



Ryc. 5. Schemat otrzymywania dwuwartościowych i dwuswoistych fragmentów scFv i VHH

fragmenty VHH otrzymane w procesie immunizacji enzymami, oddziałują często z miejscami aktywnymi tych enzymów i działają jak ich inhibitory [35].

Alternatywą wobec fagowych bibliotek ekspresyjnych są biblioteki rybosomalne [49]. Metoda ta polega na zastosowaniu translacji *in vitro* do mRNA, które zostało otrzymane z biblioteki sekwencji DNA. Obniżenie temperatury w czasie reakcji translacji umożliwia otrzymanie białek wiążących dany ligand wraz z rybosomami i fragmentami DNA kodującego dane białko (omówione w [8]). Metoda ta została zastosowana do otrzymania ciężkołańcuchowych przeciwciał, rozpoznających pikloran, który jest analogiem roślinnego czynnika wzrostu, kwasu 3-indoliloctowego [68].

3.3. Ciężkołańcuchowe przeciwciała jako odczynniki diagnostyczne i leki

Zalety rekombinowanych przeciwciał ciężkołańcuchowych w porównaniu z przeciwciałami klasycznymi są następujące:

- łatwość klonowania wynikająca z obecności tylko jednego genu,
- duża wydajność ekspresji i proste oczyszczanie,
- stabilność i dobra rozpuszczalność,
- duża swoistość i brak krzyżowej reaktywności,
- mała masa cząsteczkowa,
- duża homologia sekwencji z ludzkim łańcuchem VH,
- zdolność do rozpoznawania unikalnych epitopów, często z dominującym udziałem regionu CDR3.

Tabela 2. Łańcuchy VHH o poznanej strukturze

VHH	Antygen	Inhibicja	Kd (nM)	CDR3 (aa)	Piśmiennictwo
cAb-Lys2	lizozym	+	2	19	[62]
cAb-Lys3	lizozym	+	65	24	[62]
cAb-HuL6	lizozym	–	0,7	15	[23]
cAb-CA04	anhydraza węglanowa	–	29	18	[35]
cAb-CA05	anhydraza węglanowa	–	72	19	[35]
cAb-RN05	RNAza A	80%	35	12	[15]
cAb-AMD7	α -amylaza	–	15	16	[35]
cAb-AMD9	α -amylaza	+	3	14	[35]
cAb-LA01	β -laktamaza	n.b.	<0,7	21	[35]
cAb-LA02	β -laktamaza	n.b.	0,6	8	[35]
cAb-LA03	β -laktamaza	n.b.	2	17	[35]
cAb-nMCA2	β -laktamaza	n.b.	0,3	16	[23]
cAb-BclI10	β -laktamaza	n.b.	3	15	[23]
cAb-TEM	β -laktamaza	n.b.	0,45	7	[23]
RR6 azo-dye	barwnik R2		22	16	[57]

n.b. – nie badano; aa – reszty aminokwasowe.

Wymienione cechy powodują, że ciężkołańcuchowe przeciwciała można potencjalnie stosować jako:

- odczynnik diagnostyczny, zwłaszcza *in vivo*;
- odczynnik terapeutyczny;
- źródło leków peptydowych.

Schemat otrzymywania fragmentów VHH, oraz fragmentów Fab i scFv przedstawiono na ryc. 5.

Najważniejszą zaletą przeciwciał ciężkołańcuchowych, w porównaniu z przeciwciałami klasycznymi, jest ich dwukrotnie mniejsza masa cząsteczkowa. Ciężkołańcuchowe przeciwciała wnikają w związek z tym lepiej do tkanek, a ponadto mogą rozpoznawać takie epitopy, które ze względów sterycznych nie są dostępne dla klasycznych przeciwciał [12]. Przykładem takiego epitopu może być unikalny łańcuch oligosacharydowy glikoproteiny VSG (variant surface glycoprotein) pasożytniczych pierwotniaków, świdrowców (*Trypanosoma*). Ciężkołańcuchowe przeciwciała cAb-An33, otrzymane z biblioteki fagowej VHH wielbłąda immunizowanego białkiem VSG, swoiście rozpoznaje łańcuch oligosacharydowy tego białka, niedostępny dla klasycznych przeciwciał. Wykazano również, że koniugat tego przeciwciała z β -laktamazą w obecności 7-(4-karboksybutamido)-cyklosporyny jest efektywnym lekiem przeciw świdrowcom (*Trypanosoma brucei*) wywołujących śpiączkę afrykańską [59].

Stwierdzono, że skoniugowane z β -laktamazą ciężkołańcuchowe przeciwciała swoiste dla antygenu karcynoembrionalnego (CEA) powodowało regresję ksenoprzeszczepów raka wątroby u myszy [11]. Przeciwciała AFAI, otrzymane z biblioteki VHH nieimmunizowanej lamy, rozpoznaje CEA-podobną cząsteczkę adhezyjną (CEACAM 6) i jest efektywnym czynnikiem diagnostycznym [69].

Wykazano także, że wielbłądzie przeciwciała HuL6 rozpoznające lizozym może zmieniać konformację zmutowanego lizozymu. Mutacja 67: Glu→His powoduje zmianę konformacji lizozymu, w wyniku której cząsteczki lizozymu agregują, tworząc włókna amyloidowe. Włókna te mogą być przyczyną chorób neurodegeneracyjnych. Związanie wielbłądziego przeciwciała HuL6 powoduje powrót zmutowanej cząsteczki lizozymu do natywnej konformacji, chociaż epitop znajduje się w miejscu innym niż mutacja [24].

Otrzymano również ciężkołańcuchowe przeciwciała rozpoznające powtarzające się peptydowe motywy mucyny 1 [50], receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) [46] oraz antygen swoisty dla prostaty (PSA) [55].

Przeciwciała ulegające ekspresji w cytoplazmie (intracjalia) mogą mieć zastosowanie w regulacji procesów komórkowych. Klasyczne przeciwciała poddane ekspresji w cytoplazmie są przeważnie nieaktywne, ze względu na to, że w redukujących warunkach cytoplazmy niemożliwe jest prawidłowe połączenie ciężkiego i lekkiego łańcucha. Ciężkołańcuchowe przeciwciała zachowują aktywność w cytoplazmie; wykazano, że wielbłądzie przeciwciała rozpoznające enzym rozgałęziający skrobię w ziemniaku może działać jako inhibitor tego enzymu *in vivo* [33]. Ciężkołańcuchowe przeciwciała rozpoznające białko P15 z retrowirusa PERV, poddane ekspresji w cytoplazmie, blokuje namnażanie retrowirusa [17].

3.4. Dwuswoiste przeciwciała

Przeciwciała ciężkołańcuchowe mogą stanowić punkt wyjścia do konstrukcji dwuswoistych przeciwciał. Podobnie jak w przypadku klasycznych przeciwciał, jedno z „ra-

Tabela 3. Kamelizowane, ludzkie łańcuchy VH (według [52])

Przeciwciało	Ligand	Kd (nM)	CDR3 (aa)
VH-Ox21	OxGly	146	15
VH-Os1	OxGly	25	15
VH-Ox21.2.4	OxGly	47	15
VH-Ox62	OxGly	267	15
VH-N3c1	NIP-CAP	292	15
VH-N3c1.2.2	NIP-CAP	31	15
VH-REVg1	rev	220	11
VH-REVrs1	rev	401	11
VH-LS2	lizozym	3100	10
VH-LS2.5.1	lizozym	1600	10

OxGly – 4-glicylo-2-fenyllookasazol-5-on; NIP-CAP – 3-jodo-4-hydroksy-5-nitrofenyl-acetylo kwas kapronowy; rev – czynnik transkrypcyjny HIV; aa – reszty aminokwasowe.

mion” takiego przeciwciała rozpoznaje patogen lub komórkę nowotworową, a drugie limfocyt T, granulocyt lub komórkę NK. Pewną wadą dwuswoistych przeciwciał typu klasycznego jest ich duża masa cząsteczkowa, a w przypadku dwuswoistych fragmentów scFv także brak stabilności. Wad tych pozbawione są dwuswoiste przeciwciała ciężkołańcuchowe [9]. Schemat otrzymywania dwuswoistych i dwuwartościowych fragmentów scFv i VHH przedstawiono na ryc. 5.

3.5. Kamelizacja ciężkich łańcuchów ludzkich przeciwciał

Kamelizacja (camelization) jest to upodobnienie ludzkich ciężkich łańcuchów do wielbłądzych domen VHH (omówione w [52]). Ludzkie ciężkie łańcuchy lub fragmenty VH niezwiązane z lekkimi łańcuchami są zazwyczaj nierozpuszczalne w wodzie ze względu na obecność hydrofobowych reszt aminokwasowych w obrębie regionu FR2. Stwierdzono, że zastąpienie reszt: Gly(44), Leu(45) i Trp(47) przez odpowiednio Glu, Arg i Gly (tak jak w wielbłądzych przeciwciałach) powoduje zwiększe-

nie rozpuszczalności ludzkich fragmentów VH i umożliwia ich samodzielną ekspresję [13]. Zastąpienie Trp(47) przez izoleucynę, a nie przez glicynę, podwyższa stabilność kamelizowanych ludzkich fragmentów VH [14].

Podstawową zaletą kamelizowanych, ludzkich fragmentów VH w porównaniu z wielbłądzimi przeciwciałami jest wysoka homologia z ludzkimi ciężkimi łańcuchami, w związku z czym mogą być one stosowane *in vivo* bez obawy wywołania odpowiedzi odpornościowej [61]. Ponadto, kamelizowane ludzkie fragmenty VH charakteryzują się małą masą cząsteczkową (15 kDa), co może mieć znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne, w związku z lepszym przenikaniem tkanek przez małe cząsteczki.

Podczas, gdy źródłem łańcuchów VHH może być tylko wielbłąd lub lama, kamelizowane ludzkie fragmenty VHH wytwarza się *in vitro*. W tym celu, ludzkie domeny VH z wprowadzonymi uprzednio mutacjami w pozycjach 44, 45 i 47 służą jako „rusztowanie” do konstrukcji bibliotek, w procesie randomizacji polegającym na wprowadzeniu zróżnicowania sekwencji w określonych regionach hiperzmiennych. Takie biblioteki poddaje się następnie ekspresji w fagach i przeszukuje za pomocą odpowiednich ligandów. Otrzymane w ten sposób kamelizowane, ludzkie fragmenty VH charakteryzują się małą masą cząsteczkową oraz wysokim powinowactwem (omówienie w [65]). Dottorini i wsp. [21] wyznaczyli drugorzędową strukturę ludzkiego, kamelizowanego fragmentu VH, który rozpoznaje proteazę serynową NS3 z wirusa zapalenia wątroby typu C [38], a ponadto określili rolę poszczególnych reszt aminokwasowych w wiązaniu antygenu i we wzajemnych oddziaływaniach pomiędzy łańcuchami fragmentu VHH.

Parametry niektórych kamelizowanych ludzkich łańcuchów VH przedstawiono w tabeli 3.

4. PODSUMOWANIE

Ciężkołańcuchowe przeciwciała wielbłądowatych, odkryte stosunkowo niedawno, stanowią przedmiot intensywnych badań. Charakterystyczne cechy tych przeciwciał: wyekspozowanie regionów hiperzmiennych, brak lekkiego łańcucha i związana z tym mała masa cząsteczkowa sprawiają, że przeciwciała te mogą być inhibitorami enzymów i stanowią potencjalne źródło leków.

PIŚMIENICTWO

- [1] Al-Lazikani B., Lesk A.M., Chothia C.: Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.*, 1997; 273: 927–948
- [2] Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S.: Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.*, 1997; 414: 521–526
- [3] Barbas C.F., Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J.: *Phage Display: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001
- [4] Chothia C., Gelfand I., Kister A.: Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J. Mol. Biol.*, 1998; 278: 457–479
- [5] Chothia C., Lesk A.M.: Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.*, 1987; 196: 901–917
- [6] Chothia C., Lesk A.M., Gherardi E., Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewellyn M.B., Winter G.: Structural repertoire of the human VH segments. *J. Mol. Biol.*, 1992; 227: 799–817
- [7] Chothia C., Lesk A.M., Tramontano A., Levitt M., Smith-Gill S.J., Air G., Sheriff S., Padlan E.A., Davies D., Tulip W.R., Colman P.M., Spinelli S., Alzari P.M., Poljak R.J.: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 1989; 342: 877–883
- [8] Coia G., Pontes-Braz L., Nuttall S.D., Hudson P.J., Irving R.A.: Panning and selection of proteins using ribosome display. *J. Immunol. Methods*, 2001; 254: 191–197
- [9] Conrath K.E., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S.: Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 7346–7350
- [10] Conrath K.E., Wernery U., Muyldermans S., Nguyen V.K.: Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003; 27: 87–103
- [11] Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P.D., Wernery U., De Baetselier P., Muyldermans S., Revets H.: Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2853–2857

- [12] Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh Gh.G., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., De Baetselier P., Revets H.: Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer*, 2002; 98: 456–462
- [13] Davies J., Riechmann L.: 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies of VH domains. *FEBS Lett.*, 1994; 339: 285–290
- [14] Davies J., Riechmann L.: Single antibody domains as small recognition units: design and *in vitro* antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Eng.*, 1996; 9: 531–537
- [15] Decanniere K., Desmyter A., Lauwereys M., Ghahroudi M.A., Muyldermans S., Wyns L.: A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure Fold Des.*, 1999; 7: 361–370
- [16] Decanniere K., Muyldermans S., Wyns L.: Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *J. Mol. Biol.*, 2000; 300: 83–91
- [17] Dekker S., Toussaint W., Panayotou G., de Wit T., Visser P., Grosveld F., Drabek D.: Intracellularly expressed single-domain antibody against p15 matrix protein prevents the production of porcine retroviruses. *J. Virol.*, 2003; 77: 12132–12139
- [18] Desiderio S.: Somatic evolution of antibody specificity: setting the clock forward. *Nature Immunol.*, 2000; 1: 463–464
- [19] Desmyter A., Decanniere K., Muyldermans S., Wyns L.: Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 26285–26290
- [20] Desmyter A., Spinelli S., Payan F., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S., Cambillau C.: Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition and versatility of binding topology. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 23645–23650
- [21] Dottorini T., Vaughan C.K., Walsh M.A., LoSurdo P., Sollazzo M.: Crystal structure of a human VH: requirements for maintaining a monomeric fragment. *Biochemistry*, 2004; 43: 622–628
- [22] Dul J.L., Argon Y., Winkler T., ten Boekel E., Melchers F., Martensson I.L.: The murine VpreB1 and VpreB2 genes both encode a protein of the surrogate light chain and are co-expressed during B cell development. *Eur. J. Immunol.*, 1996; 26: 906–913
- [23] Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L.G., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A.: Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.*, 2002; 11: 500–515
- [24] Dumoulin M., Last A.M., Desmyter A., Decanniere K., Canet D., Larsson G., Spencer A., Archer D.B., Sasse J., Muyldermans S., Wyns L., Redfield C., Matagne A., Robinson C.V., Dobson C.M.: A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature*, 2003; 424: 783–788
- [25] Ewert S., Cambillau C., Conrath K., Pluckthun A.: Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. *Biochemistry*, 2002; 41: 3628–3636
- [26] Greenber A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F.: A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995; 374: 168–173
- [27] Hamers R., Muyldermans S.: Immunology of the camels and llamas. *Handbook of Vertebrate Immunology*, Academic Press, San Diego, CA, 1998: 446–448
- [28] Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R.: Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993; 363: 446–448
- [29] Harmsen M.M., Ruuls R.C., Nijman I.J., Niewold T.A., Frenken L.G., de Geus B.: Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol.*, 2000; 37: 579–590
- [30] Hendershot L., Bole D., Kearney J.F.: The role of immunoglobulin heavy chain binding protein in immunoglobulin transport. *Immunol. Today*, 1987; 8: 111–114
- [31] Horne C., Klein M., Polidoulis I., Dorrington K.J.: Noncovalent association of heavy and light chains of human immunoglobulins. III. Specific interactions between VH and VL. *J. Immunol.*, 1982; 129: 660–664
- [32] International Immunogenetics Information System, <http://imgt.cines.fr/> 20.02.2005
- [33] Jobling S.A., Jarman C., Teh M.M., Holmberg N., Blake C., Verhoeven M.E.: Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nature Biotechnol.*, 2003; 21: 77–80
- [34] Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C.: Sequences of proteins of immunological interest, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Service, 1991
- [35] Lauwereys M., Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Kinne J., Holzer W., De Genst E., Wyns L., Muyldermans S.: Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.*, 1998; 17: 3512–3520
- [36] Lefranc M.P., Lefranc G.: The Immunoglobulin facts book. Academic Press, San Diego, 2001
- [37] Legssyer J., Goethals M.P.M., van de Kerkhoven J., Hamers-Casterman C., Hamers R.: Characterization of light chains in camel immunoglobulins. *Arch. Physiol. Biochem.*, 1995; 103: B47
- [38] Martin F., Volpari C., Steinkuhler C., Dimasi N., Brunetti M., Biasiol G., Altamura S., Cortese R., De Francesco R., Sollazzo M.: Affinity selection of a camelized V(H) domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease. *Protein Eng.*, 1997; 10: 607–614
- [39] Muyldermans S.: Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.*, 2001; 74: 277–302
- [40] Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J.A., Hamers R.: Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.*, 1994; 7: 1129–1135
- [41] Nguyen V.K., Desmyter A., Muyldermans S.: Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol.*, 2001; 79: 261–296
- [42] Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S.: Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol. Immunol.*, 1999; 36: 515–524
- [43] Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S.: Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.*, 2000; 19: 921–930
- [44] Nguyen V.K., Muyldermans S., Hamers R.: The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol.*, 1998; 275: 413–418
- [45] Nguyen V.K., Su C., Muyldermans S., van der Loo W.: Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*, 2002; 54: 39–47
- [46] Omidfar K., Rasaee M.J., Modjtahedi H., Forouzandeh M., Taghikhani M., Golmakani N.: Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR. *Tumour Biol.*, 2004; 25: 296–305
- [47] Papavasiliou F.N., Schatz D.G.: Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*, 2002; 109: S35–S44
- [48] Paul-Murphy J., Gershwin L.J., Thatcher E.F., Fowler M.E., Habig W.H.: Immune response of the llama (*Lama glama*) to tetanus toxoid vaccination. *Am. J. Vet. Res.*, 1989; 50: 1279–1281
- [49] Pluckthun Lab Homepage, <http://www.biochem.unizh.ch/plueckthun/> 20.02.2005
- [50] Rahbarizadeh F., Rasaee M.J., Forouzandeh Moghadam M., Allameh A.A., Sadroddiny E.: Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. *Hybrid Hybridomics*, 2004; 23: 151–159
- [51] Rast J.P., Amemiya C.T., Litman R.T., Strong S.J., Litman G.W.: Distinct patterns of IgH structure and organization in a divergent lineage of chondrichthyan fishes. *Immunogenetics*, 1998; 47: 234–245
- [52] Riechmann L., Muyldermans S.: Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelized human VH domains. *J. Immunol. Methods*, 1999; 231: 25–38
- [53] Rogozin I.B., Kolchanov N.A.: Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1171: 11–18
- [54] Rogozin I.B., Pavlov Y.I., Bebenek K., Matsuda T., Kunkel T.A.: Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum. *Nature Immunol.*, 2001; 2: 530–536
- [55] Saerens D., Kinne J., Bosmans E., Wernery U., Muyldermans S., Conrath K.: Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 51965–51972
- [56] Seligmann M., Mihaesco E., Preud'homme J.L., Danon F., Brouet J.C.: Heavy chain diseases: current findings and concepts. *Immunol. Rev.*, 1979; 48: 145–167
- [57] Spinelli S., Frenken L.G., Hermans P., Verrips T., Brown K., Tegoni M., Cambillau C.: Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry*, 2000; 39: 1217–1222

- [58] Stanfield R.L., Dooley H., Flajnik M.F., Wilson I.A.: Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science*, 2004; 305: 1770–1773
- [59] Stijlemans B., Conrath K., Cortez-Retamozo V., Van Xong H., Wyns L., Senter P., Revets H., De Baetselier P., Muyldermans S., Magez S.: Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 1256–1261
- [60] Streltsov V.A., Varghese J.N., Carmichael J.A., Irving R.A., Hudson P.J., Nuttall S.D.: Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 12444–12449
- [61] Tanha J., Xu P., Chen Z., Ni F., Kaplan H., Narang S.A., MacKenzie C.R.: Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 24774–24780
- [62] Transue T.R., De Genst E., Ghahroudi M.A., Wyns L., Muyldermans S.: Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins*, 1998; 32: 515–522
- [63] van der Linden R., de Geus B., Stok W., Bos W., van Wassenaar D., Verrips T., Frenken L.: Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Llama glama. *J. Immunol. Methods*, 2000; 240: 185–195
- [64] van der Linden R.H., Frenken L.G., de Geus B., Harmsen M.M., Ruuls R.C., Stok W., de Ron L., Wilson S., Davis P., Verrips C.T.: Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1431: 37–46
- [65] Vaughan C.K., Sollazzo M.: Of minibody, camel and bacteriophage. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2001; 4: 417–430
- [66] Vu K.B., Ghahroudi M.A., Wyns L., Muyldermans S.: Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.*, 1997; 34: 1121–1131
- [67] Woolven B.P., Frenken L.G., van der Logt P., Nicholls P.J.: The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*, 1999; 50: 98–101
- [68] Yau K.Y., Groves M.A., Li S., Sheedy C., Lee H., Tanha J., MacKenzie C.R., Jeremut L., Hall J.C.: Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library. *J. Immunol. Methods*, 2003; 281: 161–175
- [69] Zhang J., Tanha J., Hiram T., Khieu N.H., To R., Tong-Sevinc H., Stone E., Brisson J.R., MacKenzie C.R.: Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J. Mol. Biol.*, 2004; 335: 49–56