

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри нанофізики конденсованих середовищ

проф. Валерій Антонович Скришевський

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 20 _____ р.

**ФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ РАДІОСЕНСИБІЛІЗУЮЧИХ
НАНОЧАСТИНОК БІОМОЛЕКУЛАМИ ДЛЯ АКТИВНОГО
ТАРГЕТИНГУ РЕЦЕПТОРІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В ОНКОЛОГІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності

105 Прикладна фізика та наноматеріали

Шведа Вадима Геннадійовича

Науковий керівник
науковий співробітник Institut Lumière Matière, Université de Lyon
Ph.D., associate professor **Lux François (Люкс Франсуа)**

Науковий керівник від Інституту
Директор навчально-наукового Інституту високих технологій
Проф., д.х.н. **Комаров Ігор Володимирович**

Оцінка захисту роботи _____

Київ - 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Швед В.Г. Функціоналізація радіосенсибілізуючих наночастинок біомолекулами для активного таргетингу рецепторів для застосування в онкології. — Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 105 Прикладна фізика та наноматеріали.

В роботі розглянута історія відкриття рецепторів імунних контрольних точок та поява нового напрямку в лікуванні ракових захворювань, шляхом інгібування цих рецепторів для стимулювання роботи клітин внутрішнього та адаптивного імунітету людини: макрофагів і Т-клітин. Пропонується використання наночастинок AGuIX® для їх біортогональної функціоналізації однодоменними VHH антитілами (нанотілами) для створення потенційних лікарських засобів для імунотерапії раку та можливої радіотерапії, яка вже успішно використовується в комбінації з наночастинками AGuIX® та пройшла першу стадію клінічних випробувань. Наведено літогляд основних підходів до кон'югації біомолекул та пропонується використання реакції клік-хімії, а саме циклоприєднання азид-алкінів для функціоналізації наночастинок AGuIX® нанотілами. Протоколи синтезу, виділення та очищення продуктів функціоналізації, а також детальні фізичні методи дослідження та характеристика біокон'югатів наведені в експериментальній частині.

Ключові слова: нанохімія, наномедицина, радіосенсибілізація, мембранні рецептори, імунні контрольні точки та їх інгібітори, PD-L1 та CD47 рецептори, Т-клітини, макрофаги, онкологія, протиракова терапія, радіотерапія, MPT, білки, протеїни, біокон'югація, наночастинки AGuIX®, клік-хімія, циклоприєднання азид-алкіну, HPLC, ICP-MS, MALDI-ToF, DLS, дзета-потенціал.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	7
1.1. Відкриття терапії онкозахворювань шляхом сповільнення негативної імунної	
Біофізичні властивості однодоменних антитіл (нанотіл).....	12
розчинність.....	14
афінність та зв'язування вільних пустот.....	15
здатність проникати у тканини.....	16
функціональна модифікація.....	16
Наночастинки AGuIX® для тераностики.....	16
1.5. Практичне застосування клік-хімії для біокон'югації.....	21
РОЗДІЛ 2. Теоретична частина.....	29
2.1. Концепт функціоналізації наночастинок AGuIX®.....	32
2.2. Біомолекули для функціоналізації.....	32
РОЗДІЛ 3. Експериментальна частина.....	37
3.1. Функціоналізація наночастинок AGuIX®.....	37
3.1.1. Синтез AGuIX®-DBCO.....	37
3.1.2. Синтез AGuIX®-Cy5.5-DBCO.....	37
3.1.3. Синтез азидів однодоменних VHH антитіл (нанотіл).....	38
3.1.4. Синтез біокон'югатів наночастинок AGuIX®.....	39
3.2. Характеризація та дослідження продуктів функціоналізації.....	39
3.2.1. Високоєфективна рідинна хроматографія.....	39
3.2.2. Рідинна хроматографія комбінована з мас-спектрометрією з індуктивно-зв'язаною плазмою.....	40
3.2.3. MALDI-ToF аналіз.....	41
3.2.4. Дослідження гідродинамічного діаметру та дзета-потенціалу.....	42
3.3. Очищення продуктів функціоналізації.....	43
ВИСНОВКИ.....	44

СПИСОК	
ЛІТЕРАТУРИ.....	46

ВИКОРИСТАНОЇ

ВСТУП

Наномедицина – є відносно новою областю досліджень та інновацій, що привернула до себе значну увагу в останні роки. Однією з головних

проблем цієї галузі сьогодні є знання про те, як вибірково доставити наночастинки до хворої клітини [1]. Ще відомий німецький вчений, Лауреат Нобелівської премії з фізіології та медицини 1908 року Пауль Ерліх ввів концепцію “магічної кулі” - лікарського засобу, що цілеспрямовано буде “влучати” в біологічну мішень для лікування захворювання. Розвиток терапевтичних наночастинок зростає все більше і більше, вони є цікавим вибором, тому що можуть діяти як терапевтичний засіб (наприклад: радіосенсибілізуючий ефект, фотодинамічна терапія), є контрастними агентами для візуалізації тканин та самі можуть діяти як активний засіб [2]. Цей тип наночастинок дуже часто проявляє так званий «пасивний» таргетинг: вони переважно накопичуються в уражених тканинах (запалення, пухлини, тощо), судинна система яких має «рихлі» стінки, здатні пропускати нанорозмірні молекули. Однак пасивний таргетинг залишається ще дуже неоднозначним з огляду на проблеми, які існують у пацієнтів та процеси в їх організмі, які можуть виникати через цей ефект [3]. Це дає поштовх для досліджень спрямованих на розробку нових методів лікування з «активним» ефектом таргетингу, тому все більше вчених привертають увагу до сфери біофункціоналізованих наночастинок.

Мета цієї роботи це створення протоколу для синтезу біокон'югатів наночастинок AGuIX® [4] з білковими молекулами для застосування продуктів в імунотерапії, шляхом інгібування деяких мембранних рецепторів ракових клітин, що перешкоджають нормальній роботі клітин імунної системи організму людини.

Використанні наночастинки AGuIX®, розроблені стартапом NHTherAGuIX, заснованим у 2015 році у Франції, призначені для вибіркового націлювання на пухлини, щоб краще дослідити їх локалізацію в організмі та покращити результати променевої терапії після внутрішньовенного введення [5]. Відомо, що деякі моноклональні антитіла, чи малі однодоменні антитіла можуть селективно зв'язуватись з деякими раковими рецепторами. Також, відомо вже декілька препаратів затверджених

FDA, які базуються на імунотерапії при ракових захворюваннях, тому виникає можливість спробувати поєднати наночастинки AGuIX® з цікавими біомолекулами [6].

Проект пов'язаний із синтезом біокон'югатів наночастинок AGuIX® з деякими біомолекулами (антитілами чи малими протеїнами) для імунотерапії раку є спільним проектом хімічної лабораторії команди FENNES Інституту світла і матерії (Institut Lumière Matière) при Університеті Клода Бернара Ліону 1 (Université Claude Bernard Lyon 1) у Франції та Гарвардської медичної школи міста Бостон (Harvard Medical School, Boston) у Сполучених Штатах Америки.

Частина інформації пов'язаної з характеристикою та дослідженням фінальних продуктів біокон'югатів наночастинок є конфіденційною та може бути доступною після завершення досліджень над цим проектом та опублікування повних результатів експериментів та біологічних досліджень у відповідних наукових журналах. В даній роботі представлені теоретичні та часткові практичні результати цього проекту, що на думку команди дослідників не є критичними для показу на широку аудиторію та мінімізують порушення авторських прав усіх членів цього проекту.

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1. Відкриття терапії онкозахворювань шляхом сповільнення негативної імунної регуляції.

Вже більше ніж як 100 років лікування раку базується на хірургічному втручанні, радіотерапії та хіміотерапії, в тому числі різноманітних цільових терапіях. Але імунотерапія змінила парадигму лікування ракових захворювань в силу націлювання дії лікарського засобу на активацію імунної системи людини, а не пряму боротьбу з раковими клітинами.

За останнє десятиліття виріс інтерес до імунотерапії пов'язаної з інгібуванням рецепторів імунних контрольних точок, спрямованої на дослідження цитотоксичного Т-лімфоцито-асоційованого білку 4 (CTLA-4) або білку програмованої клітинної смерті. Ці два білки, які націлені на інгібування рецепторів Т-клітин та проявляють протипухлинну відповідь вже змінили клінічний підхід до лікування раку.

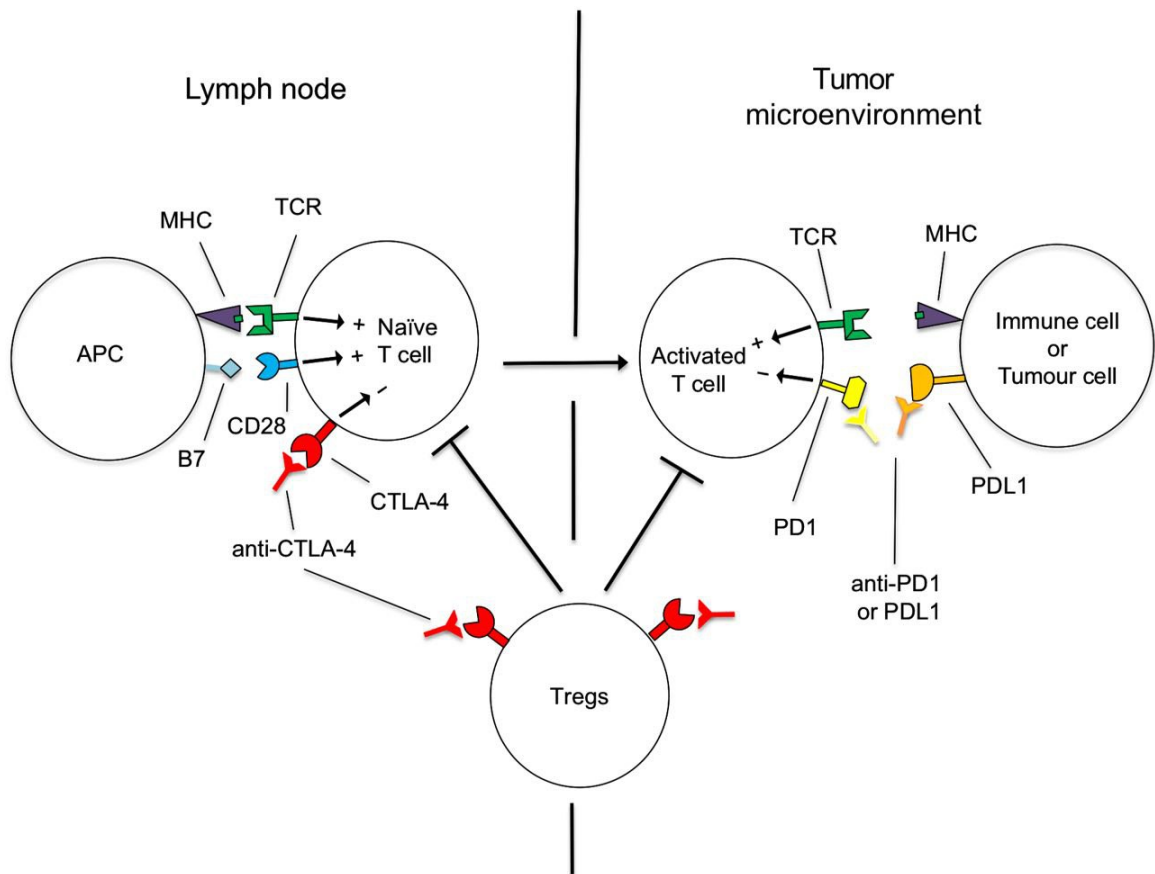
У 2010 році людський анти-цитотоксичний Т-лімфоцитарний антиген 4 (CTLA-4), іпіліумаб, став першим лікарським засобом такого типу для покращення виживання пацієнтів з метастазами при меланомі, тим самим подвоїв 10-річні показники виживаності, порівнюючи з історичними даними [7,8]. В 2011 році іпіліумаб був затверджений FDA для клінічного використання при тяжкій формі меланоми, що заклало фундамент для імунотерапії.

Також, є інтерес до блокування іншого рецептора імунної контрольної точки, що відповідає за запрограмовану клітинну смерть (PD-1) чи його ліганду (PD-L1). Відомо, що ліганд PD-L1 забезпечує виживання при різних злякисних новоутвореннях з вищим і нижчими показниками відповіді, частота побічних ефектів яких є вищою в порівнянні з анти-CTLA 4 рецептором [9-12].

Відповідно, антитіла спрямовані на PD-1: PD-L1 напрямок були затверджені в якості першої та другої лінії терапії для постійно зростаючого списку злякисних новоутворень, включаючи меланому, лімфому, рак легень, рак нирок, рак голови та шиї, рак сечового міхуру, рак печінки [13]. Шість з

цих інгібіторів імунних контрольних точок вже були затвердженні FDA для лікування багатьох видів раку, включаючи те, що один з них став єдиним засобом для лікування раку будь якого типу, що є затвердженим для пухлин з певним генетичним біомаркером незалежно від їх тканинного походження, тобто не залежить від виду раку. Кінцеве об'єднання цих підходів відбулося при дослідженні прогресуючої меланоми у пацієнтів, які отримали комбінацію анти-CTLA-4 та анти-PD-1 інгібіторів [14].

Цей революційний підхід у лікуванні раку почесно слід надати Джеймсу Еллісону і Тасуку Хондзьо, які у своїх ранніх дослідженнях заявили про відкриття рецепторів CTLA-4 у 1995 році та PD-1 у 1992, 1999 та 2000 роках відповідно [13-19]. Важливо, що в загальному для імунології вони відкрили молекули-інгібітори рецепторів імунних контрольних точок у Т-клітинах, що мають різний механізм дії. Незважаючи на деякі ґрунтовні функціональні дослідження взаємодії CTLA-4-Ig рецептору з білками, що показали імуносупресію [20,21], була плутанина між функціями CTLA-4 та коstimулятором CD28. Механістичне визначення того, що CTLA-4 був протилежний до CD28 за функціонуванням було ключовим проривом у дослідженнях Крамелля та Еллісона, а негативна регуляторна роль CTLA-4 була визначена шляхом генетичного таргетингу на мишах. Ефект інгібування CTLA-4 є дуже важливим для нормального функціонування імунної системи, що виконує функцію “контрольного пункту”, що застерігає імунну систему від небажаної реакції на власні клітини організму. Ці висновки стали фундаментальними для подальших досліджень раку. Еллісон показав, що CTLA-4 функціонує як “тормоз” для Т-клітин, і він став першим, хто продемонстрував, що інгібування CTLA-4 рецептора за допомогою антитіла може запобігти розвитку пухлини у мишах, а також допомагає руйнувати великі скупчення пухлин [22].



Мал. 1. Антитіла, що блокують CTLA-4 чи PD-1/PD-L1 можуть мати протипухлинну дію (зліва). Після первинної активації Т-клітини, специфічної до пухлин, в лімфатичному вузлі з антиген-репрезентуючими клітинами (APC) за рахунок взаємодії рецептору Т-клітини з МНС-репрезентативним похідним білком, CTLA-4 перерегулюється і починає діяти як негативний регулятор костимуляції, що може бути заблокований антитілами проти CTLA-4.

1.2. Інгібітори імунних контрольних точок.

Блокування рецепторів імунних контрольних точок є ефективною стратегією для підсилення активності Т-клітин імунної системи, що робить цей метод одним з найбільш перспективних імунотерапевтичних стратегій для лікування раку. Декілька інгібіторів імунних контрольних точок вже були затвердженні FDA, наприклад, моноклональні антитіла для блокування роботи CTLA-4, PD-1 та PD-L1 рецепторів. Більшості пацієнтам з пухлинами

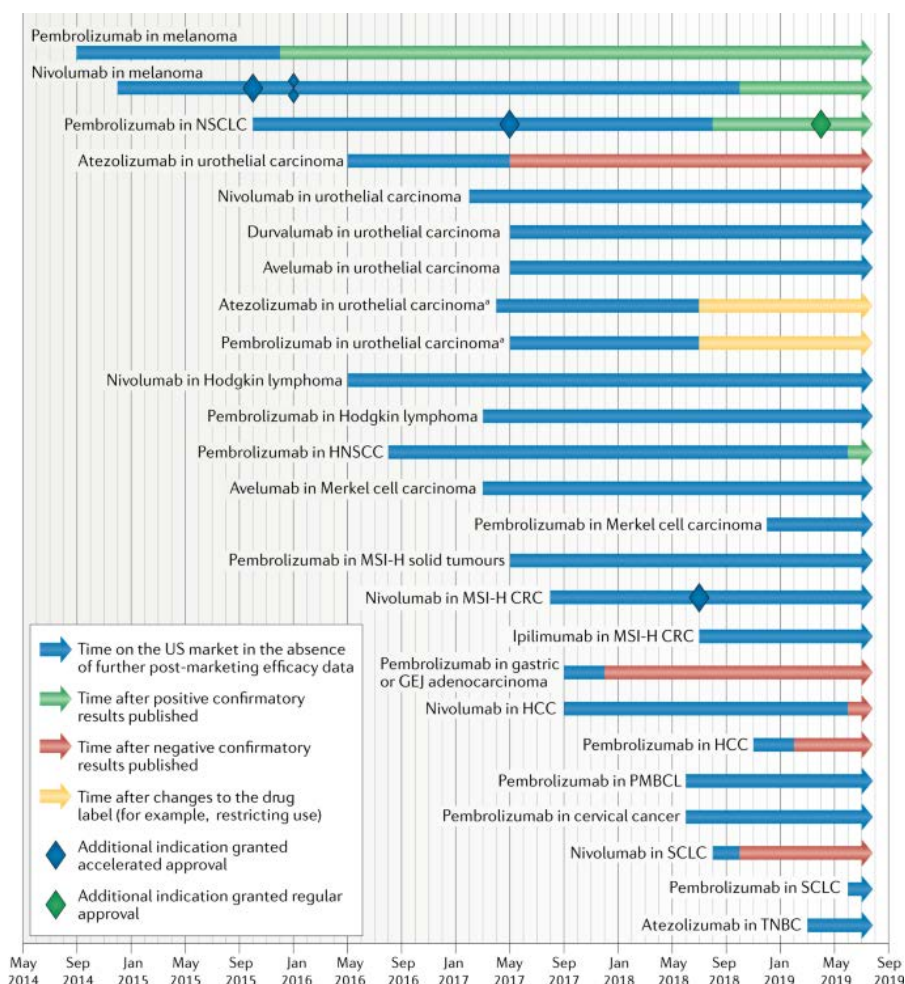
ці антитіла допомогли, але у деяких не було виявлено терапевтичного ефекту.

Загалом імунотерапія включає в себе адаптивну клітинну імунотерапію, інгібітори імунних контрольних точок, протиракові вакцини, агоністи костимулюючих рецепторів, моноклональні антитіла (mAbs) та терапію онколітичними вірусами [23]. В останні роки дослідження в області імунних контрольних точок стало одним з найактуальніших напрямків в імунотерапії [24].

Молекули імунних контрольних точок - це рецептори на поверхні імунних клітин, які після зв'язування зі своїм лігандом передають сигнали інгібування чи стимулювання [24]. Лікарські засоби націлені на молекули імунних контрольних точок, які можуть передавати інгібуючі сигнали називаються інгібітори імунних контрольних точок. Серед цих рецепторів найбільш дослідженими є цитотоксичний Т-лімфоцит-асоційований білок 4 (CTLA-4), рецептор запрограмованої смерті 1 (PD-1), ліганд що програмує клітинну смерть (PD-L1), Т-клітинний імуноглобулін та муцин-домен-3 (TIM-3) та ген активації лімфоцитів 3 (LAG-3) [24,25]. Блокування механізмів імунної втечі та толерантності пухлини через імунні контрольні точки є ефективним способом підсилення протипухлинного ефекта. Інгібітор імунних контрольних точок, особливо на основі моноклональних антитіл mAb, в якості імунорегуляторного фактору, може специфічно зв'язуватися з Т-клітинами чи клітинами пухлин, тим самим підсилюючи протипухлинну дію Т-клітин [26-28].

Традиційне блокування імунних контрольних точок на основі моноклональних антитіл є основним методом лікування та виявлення пухлин. Результати доклінічних та наступних клінічних випробувань привели до утвердження різноманітних інгібіторів контрольних точок FDA для лікування нирково-клітинного раку, меланоми, лімфоми, класичної лімфоми Ходжкіна, протокової аденокарциноми підшлункової залози, раку шийки матки, недрібноклітинного раку легенів, плоскостінного раку голови

та шиї та рак молочної залози. Деякі затвердженні інгібітори імунних контрольних точок мають у своєму складі моноклональні антитіла направлені на інгібування PD-1 рецептора: nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®) та cemiplimab (Sanofi, Regeneron); моноклональні антитіла для інгібування PD-L1 рецептора такі як atezolizumab (Tecentriq®), avelumab (Bavencio®) та durvalumab (Imfinzi®); моноклональні антитіла для блокування CTLA-4 рецептора ipilimumab [29-34]. Більшості пацієнтам з пухлинами ці антитіла допомогли. Крім цього моноклональні антитіла мають низьку стабільність, високу ціну виробництва, погано проникають у тканини та мають деякі побічні ефекти пов'язані з імунітетом, що лімітує їх використання [36-38].



Мал. 2. Графік одобрень та підтверджуючих випробувань для всіх інгібіторів імунних контрольних точок, що отримали прискорене затвердження станом на липень 2019 р.

Для покращення терапевтичного ефекту антитіл для блокування рецепторів імунних контрольних точок потрібно аналізувати експресію імунних контрольних точок до та під час лікування. Через гетерогенну високодинамічну експресію молекул імунних контрольних точок в первинних або метастазах пухлин традиційні імуногістохімічні методи обмежені, оскільки вони не можуть виявити динамічну інформацію про молекули імунних контрольних точок в середовищі пухлини [39, 40]. Тому терміново потрібен динамічний і точний метод виявлення в реальному часі з високою роздільною здатністю.

Вже було відомо про методи візуалізації мічених молекул з антитілами, але їх слабка здатність проникати в тканини, тривалий час циркуляції та високо контрастна візуалізація є головними перешкоджаючими факторами, що не дають їм стати ідеальними агентами візуалізації [26, 29, 41]. Таким чином розробка нових аналогів з більш швидкою кінетикою має першоважливе значення.

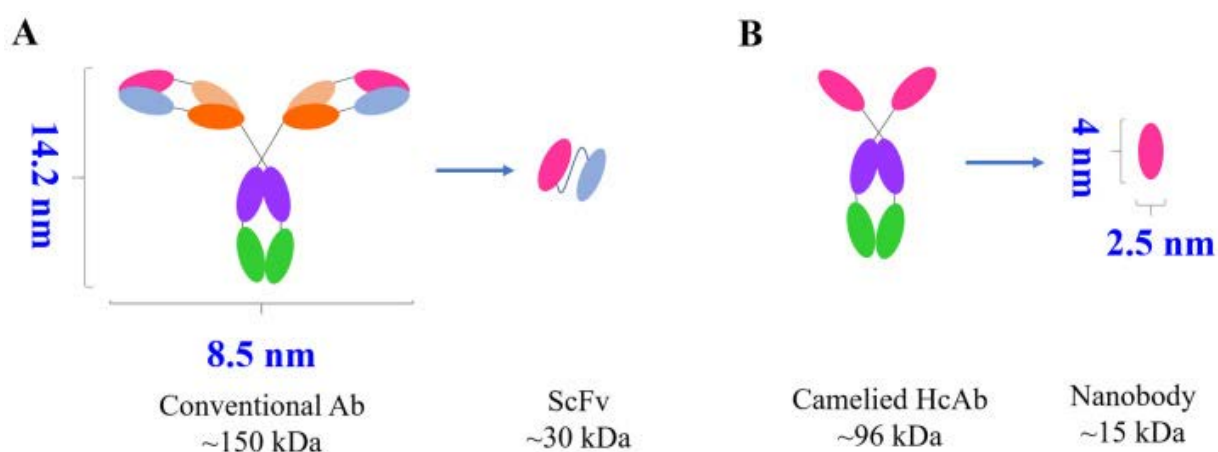
Для збільшення ефективності імунотерапії, включаючи терапію блокування рецепторів імунних точок, була запроваджена мініатюризація антитіл. Нанотіла мають малу молекулярну масу, що забезпечує для них високу проникаючу здатність в тканини, де вони швидко та специфічно зв'язуються зі своїми антигенами, а незв'язані нанотіла можуть швидко бути виведені через ниркову екскрецію. Тому, в порівнянні з моноклональними антитілами, нанотіла дають більш високі сигнали мішень-фон одразу після їх введення [38].

Подібно до інгібіторів імунних контрольних точок на основі моноклональних антитіл, нанотіла, які націлені на молекули імунних контрольних точок, були розроблені як ефективні інструменти для вивчення пухлинної імунотерапії та імунної візуалізації [41].

1.3. Біофізичні властивості однодоменних антитіл (нанотіл)

В 1993 році спеціальні антитіла були знайдені в плазмі крові Camelids (верблюди, лама, альпаки) та акулах [42]. Ці антитіла відрізняються від

звичайних наявністю тетрапептидного ланцюга, які не мають легкого ланцюга, тому їх називають важким ланцюговим антитілом (heavy chain antibody). Через відсутність домену СН1 та легкого ланцюга, антиген-зв'язуючий регіон важкого ланцюга антитіла складається тільки з варіабельної області важкого ланцюга антитіла [43]. Через це, такі антитіла називаються однодоменні антитіла (single domain antibody - sdAb), або VHH антитіла чи нанотіла (Мал. 3). Вони можуть бути отримані через клонування та експресію. Спеціальна структура та унікальні біологічні властивості нанотіл привертають значну увагу в численних статтях та велика кількість дослідницьких інститутів займаються скринінгом нових нанотіл в якості потенційних ліків для лікування раку та його діагностики [44-47].



Мал. 3. (А) Традиційні антитіла та одно-ланцюгові фрагменти антитіл (ScFv). (В) Важкий ланцюг антитіла верблюда (HcAb) та нанотіло (Nanobody).

1.3.1. Мала молекулярна маса та низька імуногенність

Кристалічна структура однодоменних антитіл (нанотіл) дуже близька до м'яча для регбі з діаметром приблизно 2.5 нм та довжиною приблизно 4.2 нм. Середня молекулярна маса приблизно дорівнює 15 кДа, що приблизно дорівнює одній десятої звичайного антитіла. До речі, вони є найменшими антитілами з повними функціональними властивостями, які існують на сьогодні [48-50]. Деякі методи використання нанотіл мають кращі результати ніж звичайні антитіла, такі як агенти для трассировки зображень [51-55],

мікроскопічні зображення [56], ензиматичні інгібітори [57, 58] та електрохімічні біосенсори [59-66]. Через їх малий розмір, регіон зв'язування між нанотілом та епітопом формують високо-специфічний комплекс, що забезпечує значну перевагу в збільшені чуттєвості сигналу зв'язування.

Області зв'язування регіонів нанотіл мають більше ніж 80% гомологічної ідентичності у послідовності з людським VH регіоном антитіла та їх 3D-структури можуть перекриватися. Послідовність гену VHH антитіла верблюда є високогомологічною до людської послідовності VH3-сім'ї рецепторів [68-70].

1.3.2. Висока стабільність

Нанотіла є значно менші ніж звичайні традиційні антитіла та для них є характерна наявність дисульфідного зв'язку, що робить їх структуру більш стабільною до нагрівання та кислого середовища [71,72]. В екстремальних умовах навколишнього середовища, за таких же високих температур, кислотного чи лужного середовища, структура традиційних поліклональних антитіл змінюється, оголюючи їх гідрофобну поверхню. Таким чином оголені гідрофобні молекули агрегують одна з одною, формуючи великі молекулярні агрегати, що випадають в осад, втрачаючи первинні функції [73]. На відміну від звичайних антитіл, нанотіло утворює різні конформери для захисту амінокислотної стабільності. Після хімічної чи термічної денатурації, нанотіло згортається, утворюючи дисульфідний зв'язок між комплементарним регіоном-1 детермінації CDR1 та CDR3, покращуючи стабільність структури та забезпечити стабільність функціональної активності [74-77]. Стабільність нанотіл дає перевагу у подальшому використанні їх в якості потенційних лікарських засобів.

1.3.3. Покращення розчинність

Відомо декілька відмінностей між VHH та VH традиційними антитілами. VH структура звичайного антитіла доволі легко утворюють включення при експресії наодинці, чи коли відкриті гідрофобні області прилипають один до одної, що робить антитіло погано розчинним у воді.

Чотири гідрофобні амінокислоти в FR2 фрагментах нанотіл заміщають гідрофобні амінокислоти звичайного антитіла FR2, наприклад, 42-га амінокислота в VH традиційних антитіл часто є валін, в той час як у VHH це фенілаланін чи тирозин. 49-а амінокислота в VH традиційних антитілах часто є гліцин, в той час як в VHH це глютамат 50-та амінокислота в VH традиційних антитіл часто є лейцин, а в VHH це аргінін чи цистеїн. 52-га амінокислота в VH традиційних антитіл часто є триптофан, а у VHH - це гліцин. Ці чотири амінокислоти в VHH нанотілах є гідрофільними, що робить їх поверхню нанотіла більш гідрофільною та підвищує їх розчинність у воді [49, 74, 78-81].

1.3.4. Висока афінність та зв'язування вільних пустот

Як і традиційні VH антитіла, VHH включають 4FR та CDR3 фрагменти. CDR1 та CDR3 VHH нанотіл є довшими, ніж у VH, що компенсує недолік антиген зв'язуючої здатності, спричинений делецією легких ланцюгів в певному ступені [49]. Цистеїн в CDR3 фрагменті VHH також утворює дисульфідні зв'язки з цистеїном в CDR1 чи FR2. Ці збільшені послідовності та петличні структури збільшують область зв'язування антитіла з антигеном. Різноманітність антитіл також приводять до замітної стабільності структури, що витримує високі температури, жорсткі екстремальні умови [76, 79-81]. Крім цього, нанотіла не мають традиційного Fc-фрагмента, що дозволяє запобігти комплементарних реакцій, що викликані цим сегментом [81].

Звичайні Fab фрагменти та типові ScFv мають вогнуті чи плоскі антигензв'язуючі ділянки, тому можуть бути ідентифіковані тільки поверхневі антигени. Нанотіла мають петлі CDR3, які звичайно довші ніж у звичайних VH-антитілах, що дозволяє їм зв'язуватись з нетрадиційними епітопами, такими як білкові “впадини” та деякими прихованими епітопами, які не розпізнаються традиційними антитілами (46,75). Тому нанотіла є більш придатними, ніж сайт зв'язування з поглибленою ділянкою поверхні антитіла, таким як каталітичний сайт реакції ферменту, блокуючи тим самим його каталітичну властивість [79, 80, 82, 83].

1.3.5. Висока здатність проникати у тканини

Нанотіла невеликі за розміром, високорозчинні, тому вони мають сильну та швидку здатність проникати в тканини та можуть проникати в щільні тканини, такі як тверді пухлини [81, 83]. Крім цього, нанотіла можуть проникати через гематоенцефалічний бар'єр [80, 84, 85], тому можуть стати новими потенційними методами лікування захворювань мозку, таких як деменція. Дослідження показали, що отримані з верблюда нанотіла імунізують ендотеліальні клітини цереброваскулярної системи, і вони можуть виявлятися на зовнішній стороні ендотеліальних клітин судин шляхом трансцитозу. Їх малий розмір забезпечує кращу проникаючу здатність крізь тканини та імунну границю симпатичних клітин. Крім цього, нанотіла легко фільтруються гломерулами, а швидкість очищення крові висока, тому надлишок вільних нанотіл швидко ліквідується, не даючи негативного впливу на організм.

1.3.6. Легка функціональна модифікація

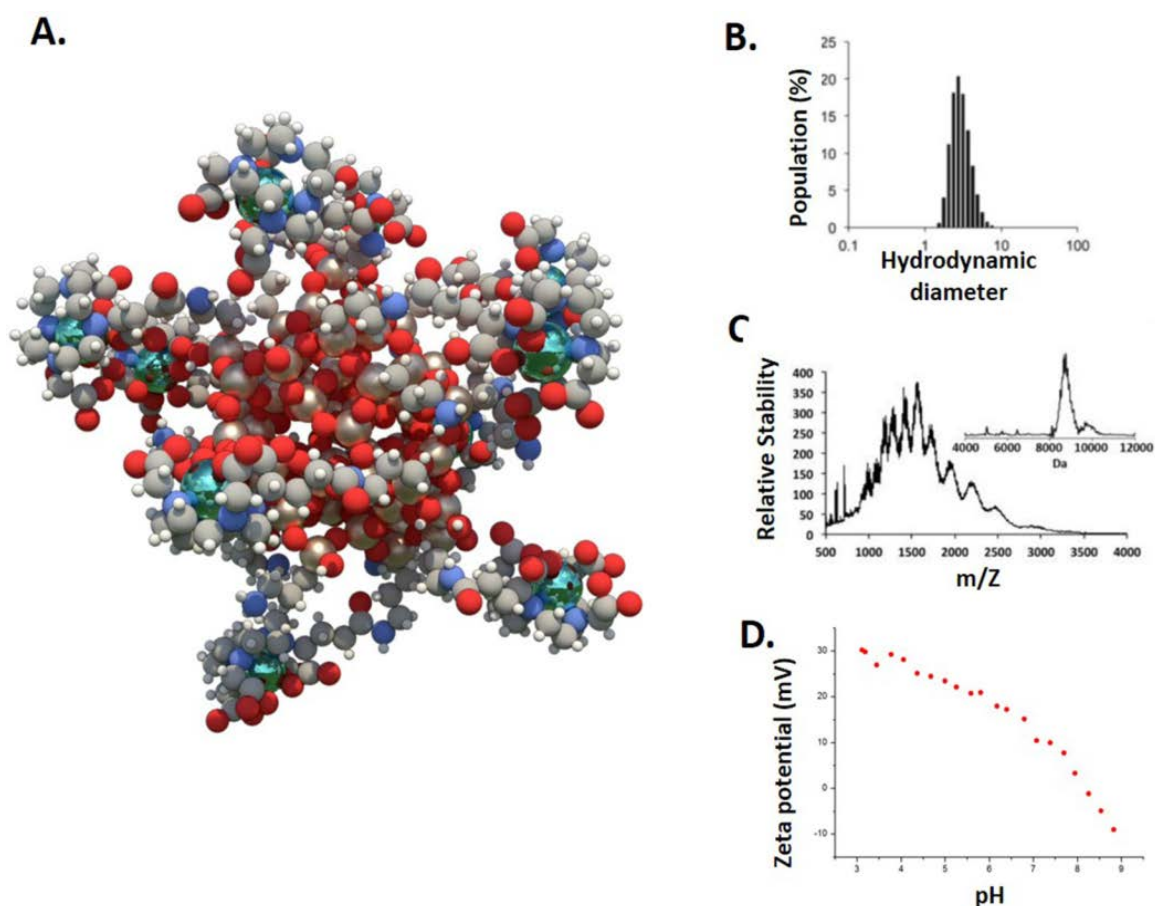
Нанотіла - це VHN клоновані, за допомогою генної інженерії, гени з плазми крові верблюда чи альпаки, далі експремованні прокаріотичними чи еукаріотичними клітинами. Таким чином нанотіла легко модифікуються чи генетично змінюються [86].

Токсини, молекули біотину та інші таргетні молекули також можуть бути приєднані до хвоста нанотіла для функціональної модифікації [55, 87]. Крім цього, генетична модифікація VHN може трансформувати моновалентні нанотіла в різноманітні форми, такі як бівалентні нанотіла, біоспецифічні чи мультивалентні нанотіла [88, 89].

1.4. Наночастинки AGuIX® для тераностики

AGuIX® (Activation and Guidance of Irradiation by X-ray) - це наночастинки розміром менше ніж 5 нм, що складаються з полісілоксанової матриці та хелатів гадолінія з DOTAGA. Ці наночастинки були нещодавно

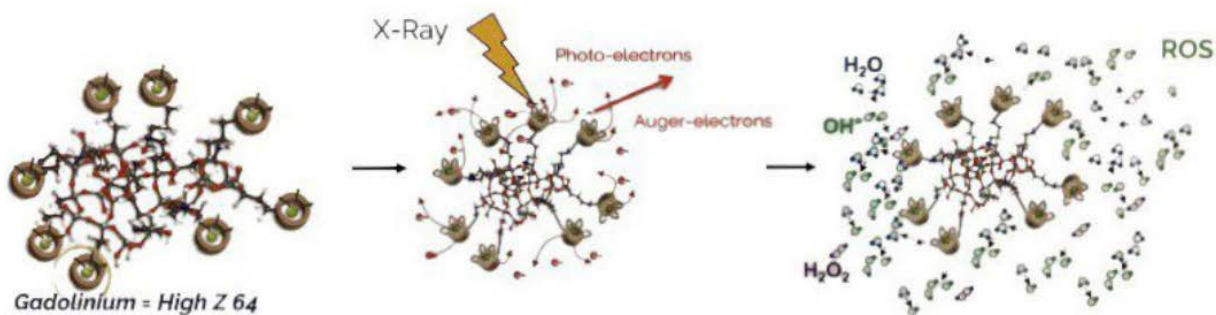
прийняті в клінічні дослідження в комплексі з радіотерапією. Протягом нормативних випробувань на токсичність на двох видах тварин (гризунах та мавпах) не було виявлено жодних проявів токсичності. Біорозподіл, використовуючи різноманітні моделі тварин, показав, що пасивне поглинання в пухлинах, дякуючи підвищеної проникності та ефекту утримання при поєднанні нирковою елімінацією наночастинок після внутрішньовенного введення. Високий радіосенсибілізуючий ефект спостерігається при різних видах опромінення *in vitro* та *in vivo* на великих типах раку (мозок, легені, меланома, голова та шия, інше). Одна наночастинка AGuIX® статистично містить близько 15 атомів гадолінію (13,58% за масою) [90].



Мал. 4. (А) Схематичне зображення AGuIX® наночастинок (атоми гадолінію, виділенні зеленим кольором, хелатовані лігандами DONAGA, приєднаних ковалентно до полісілоксанової матриці). (В) Розподіл гідродинамічного діаметру наночастинок AGuIX® (~3 нм), отримане

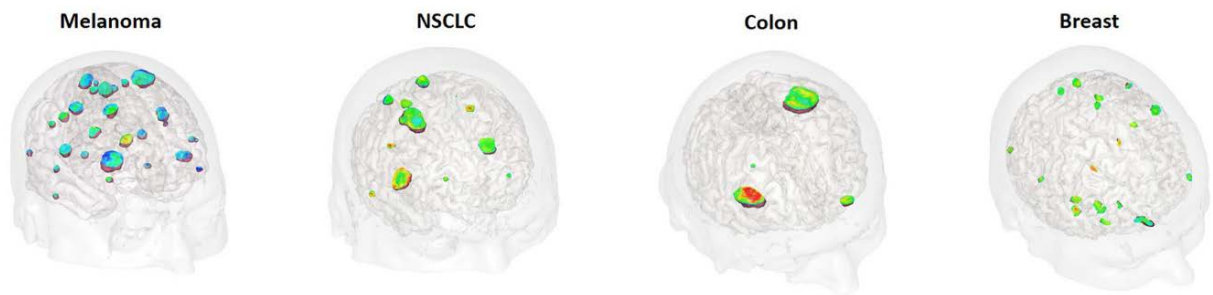
методом динамічного розсіювання світла. (C) Мас-спектр отриманий за допомогою електроспрей іонізаційної мас-спектрометрії. Для частинок отримана маса близько 10 кДа. (D) Залежність дзета-потенціалу від рН для наночастинок AGuIX®.

Наночастинки AGuIX® можуть використовуватися як лікарський засіб для лікування ракових пухлин. Завдяки наявності у них важкого атому Гадолінію, що гарно поглинає рентгенівське випромінювання, здатності до пасивного накопичення біля ракових клітин за рахунок ефекту полегшеного транспорту крізь оболонки кровоносних судин (EPR), опромінення наночастинок невеликою дозою рентгенівського опромінення спричиняє виділення вторинних та Оже-електронів з атомів Гадолінія. Електрони швидко реагують з водою, яка знаходиться у позаклітинному матриксі чи всередині ракових клітин, та утворюють реактивні форми кисню (ROS), які в свою чергу спричиняють утворення пероксидних радикалів, які руйнують оболонку та внутрішній вміст ракових клітин, викликаючи клітинну смерть.



Мал. 5. Схема взаємодії наночастинок AGuIX® з рентгенівським опроміненням та подальшим утворенням реактивних форм Оксигену.

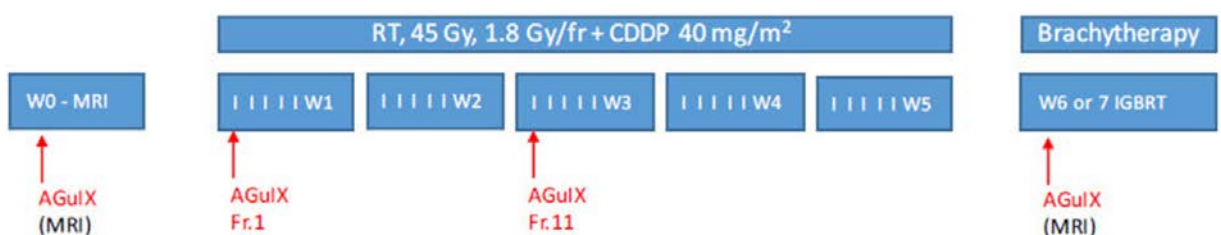
Наночастинки AGuIX® застосовуються в якості контрасту для МРТ. За допомогою них були досліджені метастази в головному мозку пацієнтів з наявними видами ракових захворювань як меланома, “не малий” клітинний рак легень, рак товстої кишки та рак грудей.



Мал. 6. Ілюстрація 3D МРТ зображень клінічних випробувань проекту NanoRAD, отримані після 2 годин після внутрішньовенного введення наночастинок AGuIX®. Метастази головного мозку були контрастно-засвічені наночастинками, в той час як у здорових тканинах сигналу не спостерігається.

Перше дослідження адміністрації наночастинок AGuIX® було зроблене протягом клінічних досліджень за проекту NanoRAD (NCT02820454) [91]. Дослідження NanoRAD є на першій стадії клінічних досліджень, які відбуваються в CHU Grenoble Alpes, метою яких є лікування різноманітних метастазів головного мозку, використовуючи рентгенівське опромінення мозку (10 x 3 Грей протягом максимум трьох тижнів) в комбінації з наночастинками AGuIX® (одна ін'єкція за 4 години до початку першої сесії опромінення рентгенівським променями).

NanoCOL клінічні дослідження (NCT03308604) були затвердженні французьким регулюючим офісом. NanoCOL є на першій стадії клінічних досліджень, які відбуваються в інституті Gustave Roussy (Villejuif) [92]. Мета цього проекту це лікування розповсюдженого раку шийки-матки за допомогою радіотерапії в комбінації з наночастинками AGuIX® иа цисплатином (CDPP) (Мал. 7).



Мал. 7. Протокол дослідження NanoCOL для першої стадії клінічних досліджень.

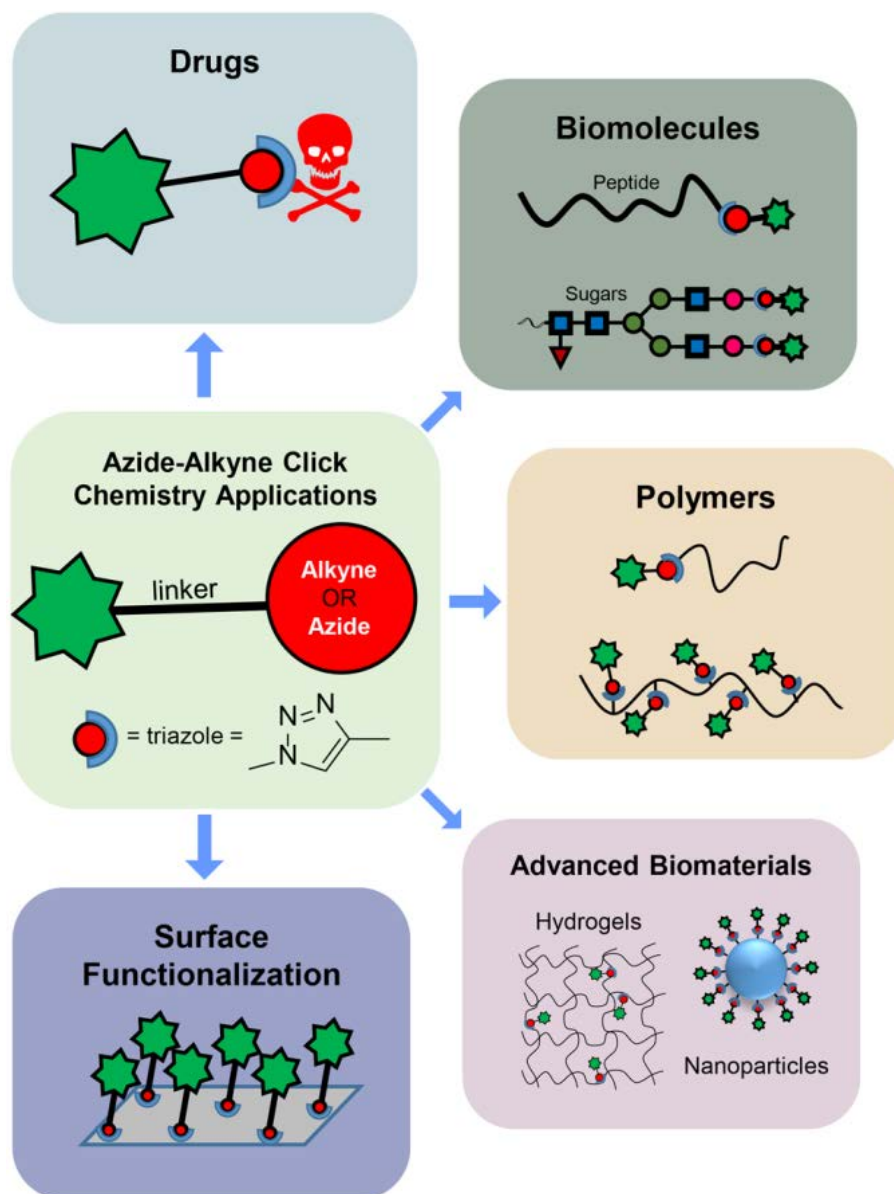
Перший пацієнт клінічного дослідження NanoCOL був включений до проекту в травні 2018 року. Вже 15 пацієнтів з 354 метастазами головного мозку було включено до досліджень. Не спостерігається обмежувальних токсичних ефектів навіть, використовуючи дозу наночастинок AGuIX® 100 мг/кг. Період напіввиведення AGuIX® з плазми крові був однаковим в усіх тестових групах пацієнтів (в середньому 1,3 год з інтервалом 0,8-3 год). Ефективне націлювання на метастази зберігає контрастні властивості AGuIX® у метастазах у пацієнтах з меланою, раком легень, молочної залози та товстої кишки. Концентрація AGuIX® в метастазах після введення препарату була пропорційна введеній дозі. У 13 з 14 пацієнтів, які пройшли курс лікування, спостерігався терапевтичний ефект: стабілізація та зменшення об'єму пухлин. МРТ аналіз показав значну кореляцію між контрастним підсиленням та реакцією пухлин на опромінення, що підтверджую радіосенсибілізаційний ефект.

Комбінація AGuIX® з радіотерапією для пацієнтів з метастазами головного мозку є безпечним методом лікування. AGuIX® специфічно націлені на накопичення в метастазах головного мозку та залишаються в пухлинах до 1 тижня. Теперішні дослідження другої фази клінічних досліджень дозволяє точніше дослідити ефективність наночастинок AGuIX® [93].

1.5. Практичне застосування клік-хімії для біокон'югації

Дослідження біологічних систем часто обмежено використанням доступних біомолекул. Поява “клік-хімії” зробила революцію в хімії біокон'югації, забезпечивши прості умови для хімічних реакцій, що

підходять як для великих так і для малих біомолекул (флуорофори, токсини або терапевтичні препарати).



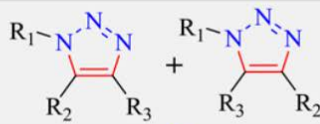
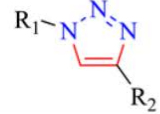
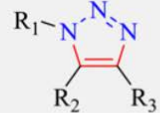
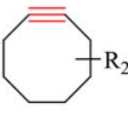
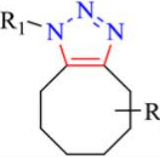
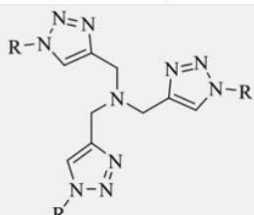
Мал. 8. Схематичне зображення сфер застосування реакції циклоприєднання азид-алкінів для біокон'югації малих лікарських засобів, біомолекул, полімерів, біоматеріалів чи функціоналізації поверхні певних субстратів.

Шарплес та співавтори в огляді 2001 року [94] запропонували розробити набір потужних, селективних та надійних реакцій для з'єднання молекулярних фрагментів за м'яких реакційних умов. Він назвав основу цього методу "клік-хімією". Унікальні особливості клік-хімії забезпечують

набір інструментів для ефективних методів з'єднання молекул для синтезу різноманітних кон'югатів.

Таким чином, дякуючи появі клік-хімії, біоортогональні реакції перетворились у високоспецифічні інструменти, що дозволяють досліджувати біологічні системи. З усіх розроблених біоортогональних клік-реакцій, найбільш широко застосовується каталізуєма міддю реакція циклоприєднання азид-алкінів (copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: CuAAC). З початку її створення дослідники різних галузей використовували цю високоефективну реакцію для синтезу кон'югатів з різноманітною природою та функціональними групами. Для вдосконалення CuAAC була запропонована реакція деформаційного циклоприєднання азид-алкінів (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition reaction: SPAAC) та вона змогла прибрати деякі недоліки CuAAC. В літературі представлені інші типи клік-реакцій такі як реакція Дільса-Альдера [95], лігування за Штаудінгером [96, 97], приєднання тіолів за Міхаелем [98, 99], оксимне легування [100, 101] та інші. Для отримання більш широкого огляду на реакції клік-хімії існує ряд оглядів, які дають відміну інформацію для застосування цих реакцій [102-107]. Однак, практичні проблеми та обмеження з точки зору відповідних фізико-хімічних властивостей молекул кон'югатів не дають можливості використовувати ці реакції.

Утворення 1,2,3-триазолів за допомогою реакції циклоприєднання азид-алкінів було вперше запропоновано та вивчено Хойсеном у 1960х роках (Табл. 1) [108].

Reaction Type	Reagent 1	Reagent 2	Catalyst	Product	Limitations
Huisgen AAC	R_1-N_3	$R_2-C\equiv C-R_3$ Internal or terminal alkyne	Δ		>100°C Days-Weeks Not regioselective
CuAAC	R_1-N_3	$C\equiv C-R_2$	Cu^{I+}		Requires catalyst, reducing agent, and stabilizing agent*
RuAAC	R_1-N_3	$R_2-C\equiv C-R_3$ Internal or terminal alkyne	Ru^{2+}		Requires catalyst Forms 1,5- regioisomer
SPAAC	R_1-N_3				Not regioselective Cyclooctyne reagents more expensive
* Examples of Cu-stabilizing reagents commonly employed in the CuAAC reaction				R = benzyl (TBTA) R = <i>tert</i> -butyl (TTTA) R = $CH_2CH_2CH_2OH$ (THPTA)	

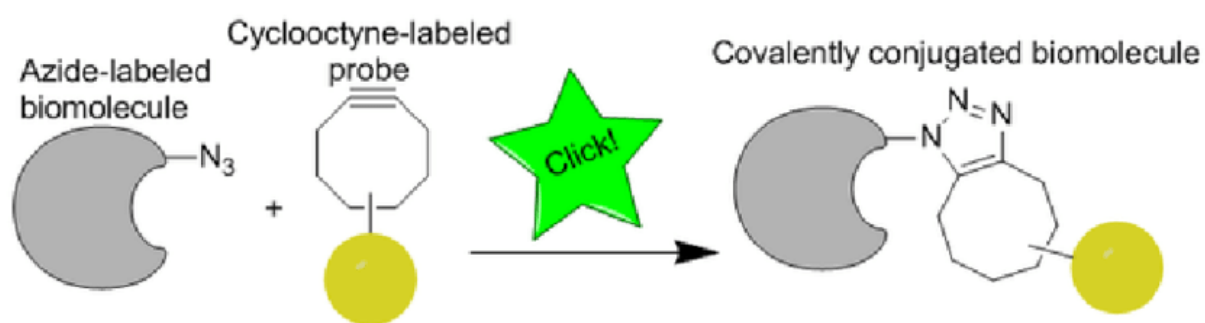
Таблиця 1. Зображення схем основних типів реакції циклоприєднання азид-алкінів та їх обмеження.

Цей гетероцикл є чудовою біоізостеричною заміною амідів завдяки його стабільності до можливих біологічних “стресів” такі як ензимну деградацію, окиснення чи відновлення та вплив різного значення рН середовища.

У 2002 році групи вчених Шарплеса та Мелдаля [109, 110] незалежно один від одного прийшли до висновку, що використання солей міді(I) в каталітичних кількостях призводить до утворення регіоспецифічних 1,4-заміщених триазолів за м'яких умов реакції та зі швидкістю у 106-107 разів більшою ніж при використанні суміші 1,4- та 1,5-заміщених продуктів за відсутності міді. Крім цього, ця реакція перебігає при широкому діапазоні температур (0-160 °C), в різноманітних розчинниках (включаючи воду) та при широких показань рН середовища (4-12) [111, 109, 112-114]. Перші застосування реакції CuAAC були доволі успішними, але швидко були виявлені недоліки пов'язані з використанням солей міді. Катіон міді(I)

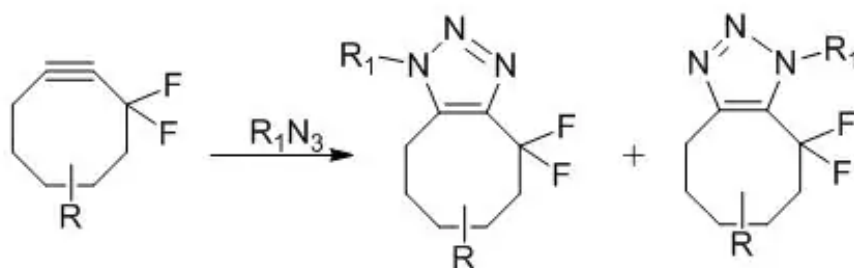
швидко окиснюються до міді(II), тому швидко втрачає свої каталітичні властивості, необхідні для реакції циклоприєднання. Крім цього, токсичний вплив катіонів міді на клітини обмежує її використання у клітинному середовищі, де життєспроможність клітин є найголовнішим критерієм для використання таких речовин.

Для запобігання використанню солей міді в якості відновника, Бертоцці та співавтори розробили реакцію SPAAC (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition) у 2004 році (Табл. 1, Мал. 9), також відома під назвою Cu-Free Click Chemistry [115].



Мал. 9. Схематичне зображення використання реакції клік-хімії за відсутності каталізатора міді для утворення біокон'югатів [116].

Ця модифікація дозволяє відбуватись реакції дуже швидко та ефективно за відсутності каталізатора завдяки високого напруження та деформації циклооктинового кільця (18 ккал/моль), що дозволяє використовувати м'які умови реакції її відносно швидкий час перебігу [117]. Незважаючи на деякі переваги, ця реакція не забезпечує регіоспецифічність продукту реакції, утворюючи суміш 1,4-заміщених продуктів.

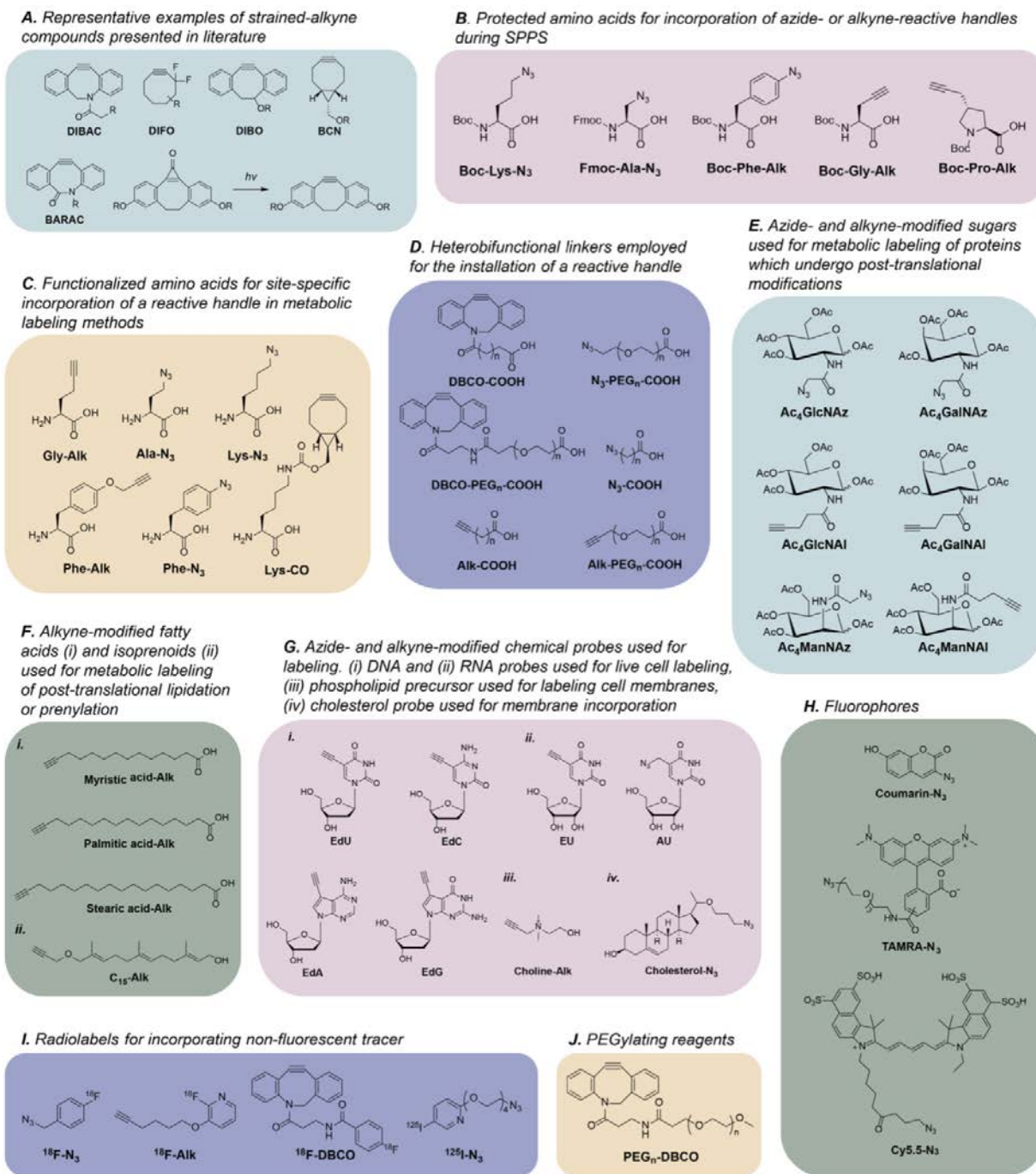


Мал. 10. Використання дифлуорованих циклооктинових реагентів для

демонстрації утворення суміші регіоізомерних продуктів триазолів за кімнатної температури та атмосферного тиску та за відсутності каталізатору [118].

Першопочатково водорозчинність циклооктинових реагентів викликала широкий інтерес до їх використання, але нещодавно в реакціях почали використовувати “розчинні” фрагменти як поліетиленгліколь (ПЕГ/PEG) чи сульфонатні групи в якості лінкерів, приєднаних до циклооктинового кільця. Крім цього, собівартість різноманітних похідних циклооктанових реагентів значно вища ніж їх термінальні алкінові аналоги. На щастя, альтернативні синтетичні методи [119] роблять SPAAC реагенти більш доступними та менш затратними для використання (Мал. 11).

Підводячи підсумок, можна зазначити, що використання реакцій клік-хімії знайшло широке коло застосування для утворення біокон’югатів, а використання циклоприєднання азид-алкіну за відсутності міді в якості каталізатора робить придатним такий тип реакцій для використання *in vivo* в біологічних системах та біоортоганальної клік-хімії.



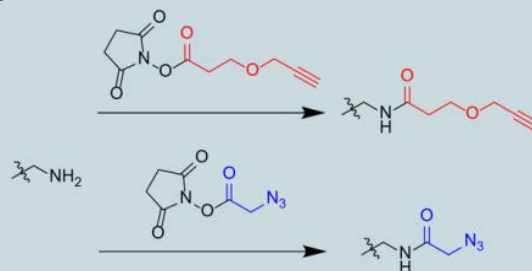
Мал. 11. Комерційно доступні реагенти для функціоналізації біомолекул за допомогою реакції циклоприєднання азид-алкіну [120].

Існує два загальних підходи до функціоналізації біомолекул за допомогою азидних чи алкінових фрагментів: опосередковане N-гідроксисукцинімід (NHS) утворення амідного зв'язку, використовуючи амін та карбонову кислоту, або реакція тіолу з заміщеним мелаїдом (Мал. 12). NHS-естери є одними з найпопулярніших сполук, що використовуються для функціоналізації біомолекул, завдяки їх сумісності з водним середовищем,

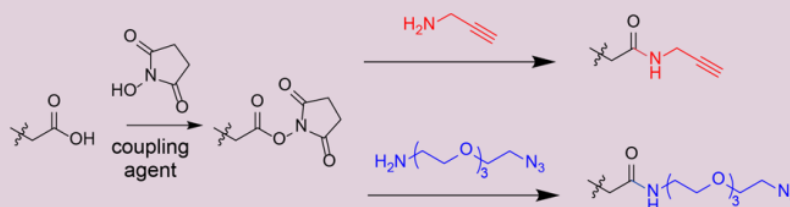
комерційній доступності та здатності вибірково зв'язуватись з первинними амінами, які знаходяться на залишках лізину чи на N-кінці протеїнів (Мал. 12А). Для реакцій з біомолекулами зазвичай використовують водні розчини за рН 7-9. За рН ближче до 9 реакція відбувається ефективніше завдяки високому ступеню депротонування аміну. Але за підвищеного значення рН відбувається гідроліз активованого ефіру з більшою швидкістю. Навпаки, за нейтрального рН реакція між первинними амінами та ефірами NHS відбувається з меншою швидкістю, але при цьому зменшується ризик гідролізу ефіру. Таким чином, діапазон значень рН між 7 та 9 зазвичай використовується для балансу між швидкістю реакції та ступеня функціоналізації, а також, враховуючи розчинність у воді та стабільність біомолекул. Реакції з NHS зазвичай відбуваються за кімнатної температури протягом 1-2 годин. Однак, реакції з чутливими біомолекулами можуть проводити при 4°C залишаючи реакційну суміш на ніч.

NHS-естери також можуть модифікувати інші нуклеофільні групи в молекулі, такі як депротоновані гідроксильні чи тіольні молекули. В якості альтернативи, карбонові кислоти можуть бути функціоналізовані шляхом утворення *in situ* активованого ефіру за використання NHS та відповідного реагенту для з'єднання, такий як 1-етил-3-(3-(диметиламіно)пропіл)карбодимід (EDC) чи N,N'-дициклогексилкарбодимід (DCC).

A. General reaction scheme for azide- and alkyne-functionalization of a primary amine using NHS ester chemistry

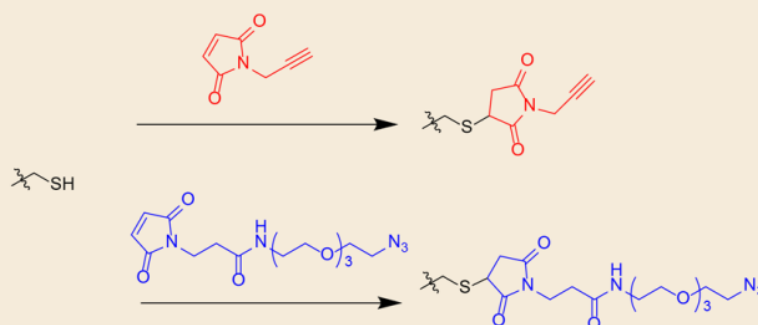


B. General reaction scheme for azide- and alkyne-functionalization of a carboxylic acid using NHS ester chemistry, where the coupling agent could be EDC* or DCC* depending on the reaction environment



* 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)
 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

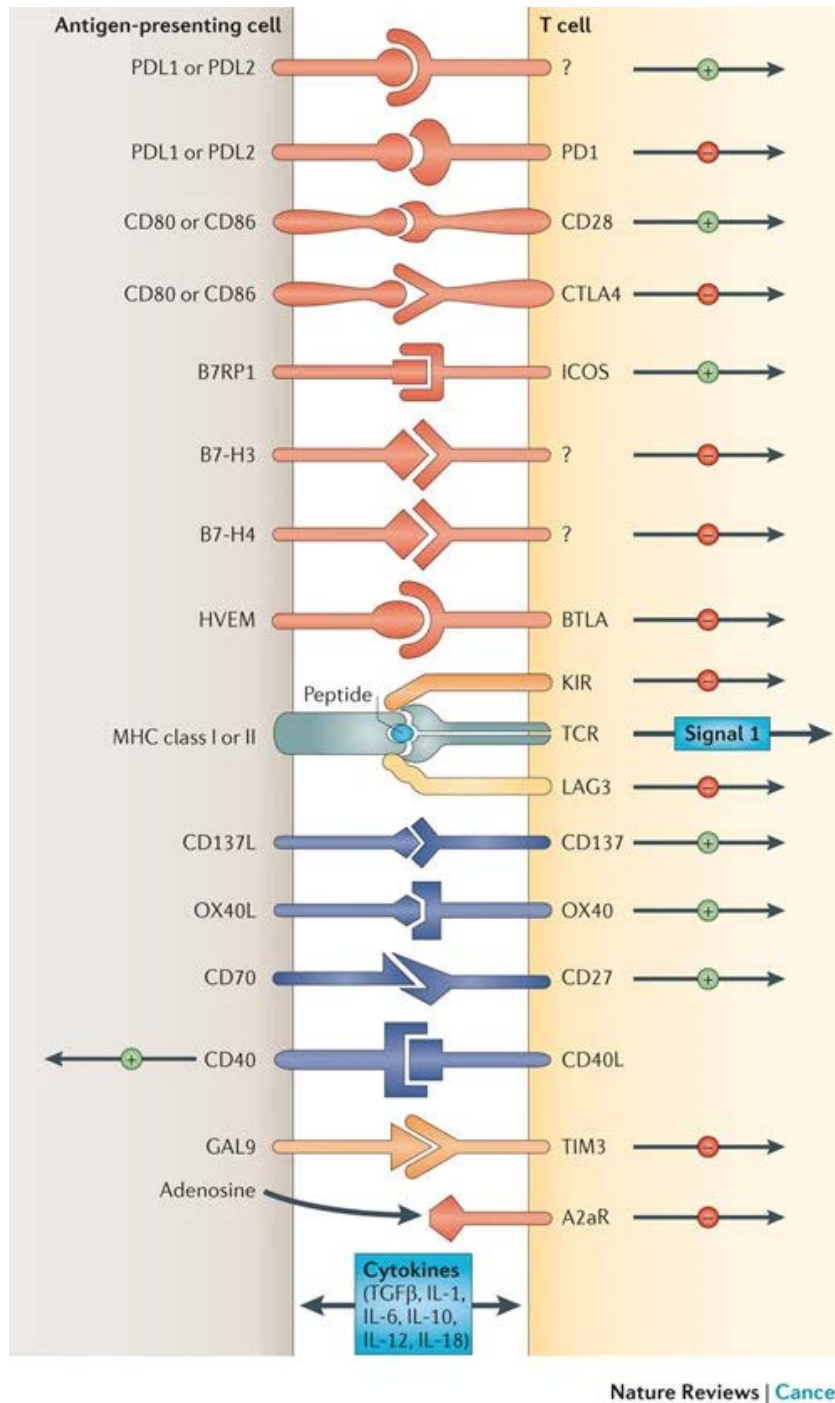
C. General reaction scheme for azide- and alkyne-functionalization of a thiol using maleimide chemistry



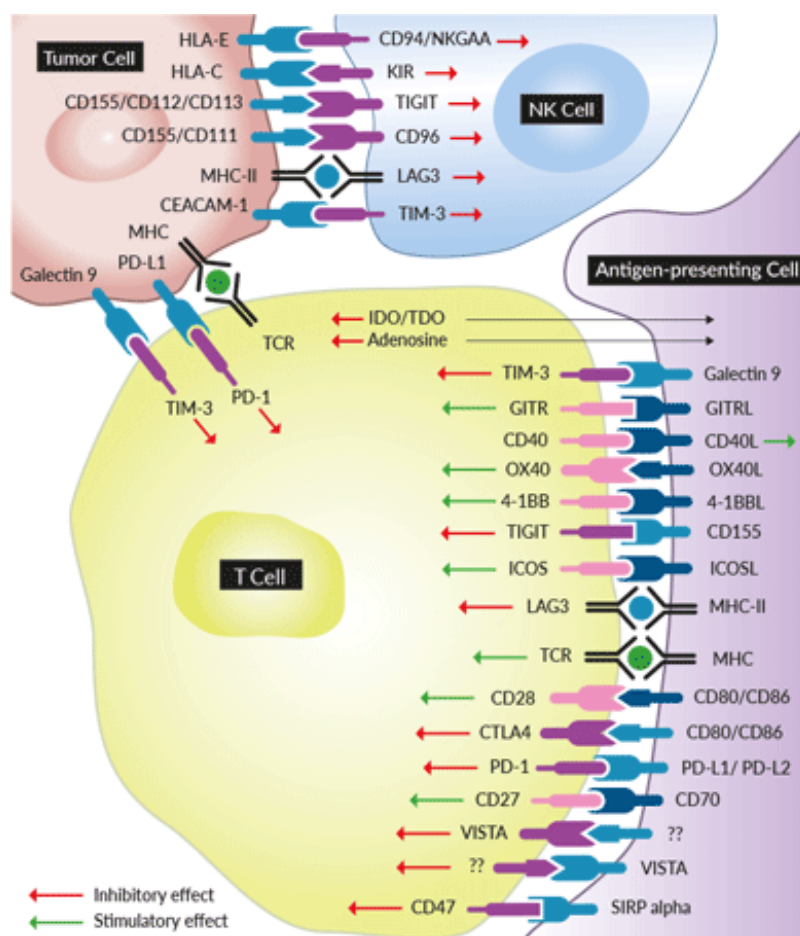
Мал. 12. Загальні схеми реакцій функціоналізації біомолекул за допомогою азид-алкінів.

РОЗДІЛ 2. Теоретична частина

Функціоналізація наночастинок специфічними біомолекулами може давати активні продукти (біокон'югати) для таргетингу та [121] інгібування сильно експресованих поверхневих мембранних рецепторів ракових клітин, що можуть регулювати імунну відповідь організму [122].



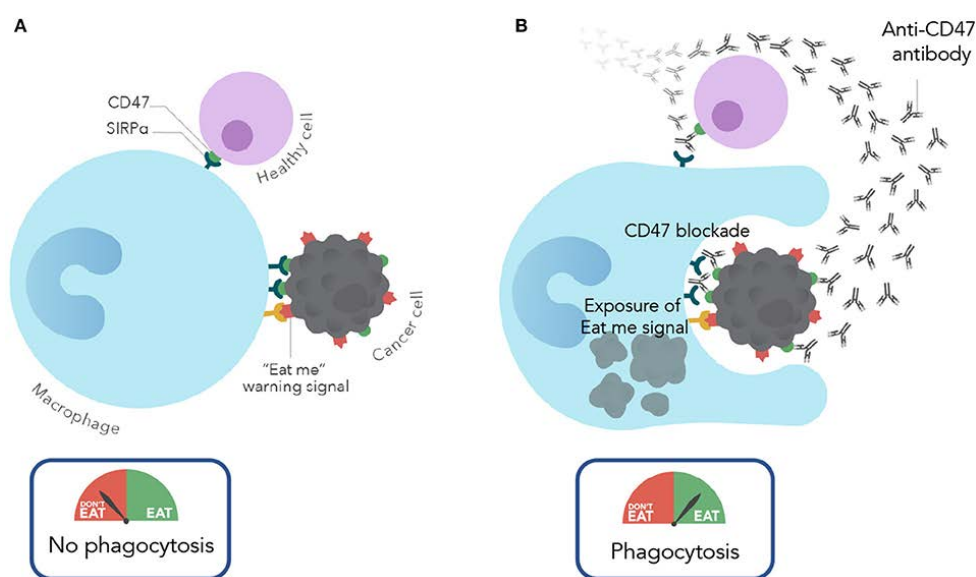
Мал. 13. Схема багаточисленних коактивуючих чи інгібуючих взаємодій, що існують між Т-клітинами та антиген-репрезентуючими клітинами [123].



Мал. 14. Ілюстративна схема рецепторів та лігандів імунних контрольних точок та інших імунних рецепторів, що відповідають за розпізнавання між собою клітин імунної системи людини та ракових клітин (антиген-репрезентуючих клітин).

Активація чи інгібування деяких рецепторів ракових клітин може регулювати імунну відповідь організму. Наприклад, на поверхні багатьох ракових клітин зустрічається сильно експресований PD-L1 рецептор, який може зв'язуватись з відповідним PD-1 ко-рецептором, що знаходиться на поверхні Т-клітин. В цьому випадку результатом взаємодії рецепторів буде маскування ракової клітини, та порушення розпізнавання ракової клітини Т-клітинами імунної системи. Відповідно, інгібування активності PD-L1 чи PD-1 рецепторів може стимулювати кращу імунну відповідь та можливість організму самостійно створити відповідні антитіла до певної ракової клітини за допомогою роботи клітин адаптивного імунітету.

На поверхні деяких ракових клітин наявний сильно експресований CD47 рецептор, що також зустрічається і у звичайних здорових клітинах [124]. При взаємодії CD47 рецептора досліджуваної клітини та SIRPα білкового комплексу, що знаходиться на поверхні макрофагів, клітина-мішень починає виробляти назовні так звані “не їж мене” молекули-месенджери, які розпізнаються макрофагами як стоп-сигнал [125]. Такий сигнал в кінцевому випадку допомагає раковим клітинам досягти імунної втечі, інгібуючи розмноження макрофагів та зберегти злякисну клітину від фагоцитозу, контрольованого макрофагами. Тому важливість пошуку інгібіторів CD47-SIRPα імунної системи привертає все більше уваги в області імунотерапії раку. Відповідно інгібування активності CD47 чи SIRPα рецепторів може стимулювати кращу імунну відповідь від вродженого імунітету, а саме покращити роботу макрофагів для фагоцитарного зниження ракових клітин.



Мал. 15. Схематичне зображення процесу інгібування CD47 рецептору на поверхні ракової клітини для активації фагоцитозу за допомогою макрофага.

Такий підхід відкриває нові можливості для активного таргетингу деяких ракових клітин наночастинками. Окрім цього, наночастинка зв'язана з активною біомолекулою, що є лігандом до певного рецептора, також може

мати корисні властивості: магнітні, електричні, флуоресценція. інше.

2.1. Концепт функціоналізації наночастинок AGuIX®

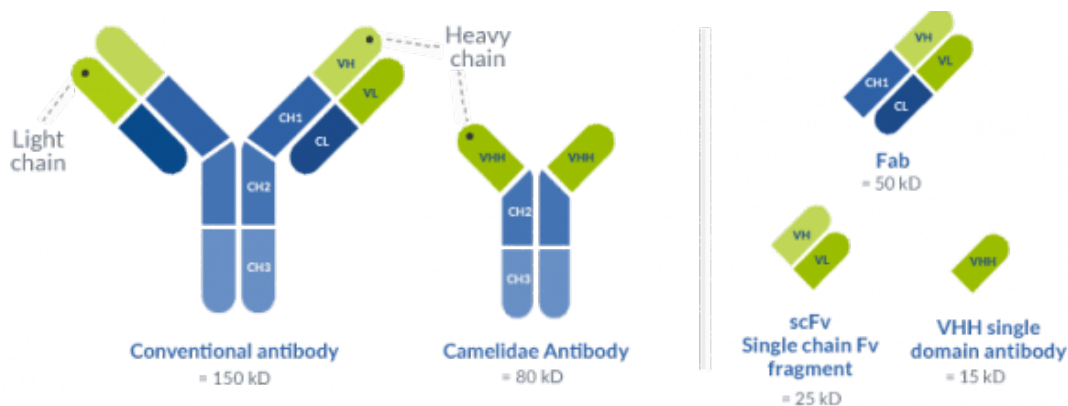
Виникла ідея використовувати вже запатентовані наночастинок AGuIX®, які мають радіосенсibiliзаційні властивості, для подальшої функціоналізації їх поверхні ковалентно зв'язаними біомолекулами, що потенційно можуть бути лігандами до певних поверхневих клітинних рецепторів ракових клітин. Додатково, пропонується функціоналізувати наночастинок AGuIX® флуоресцентними мітками для кращого дослідження отриманих біокон'югатів *in vitro* та *in vivo* на клітинах.

2.2 Біомолекули для функціоналізації

В якості біомолекул для активного таргетингу пропонується використовувати малі поліпептиди (<10 амінокислотних залишків) та активні варіабельні VHH-однодоменні частини (variable heavy) важкого ланцюга антитіл.

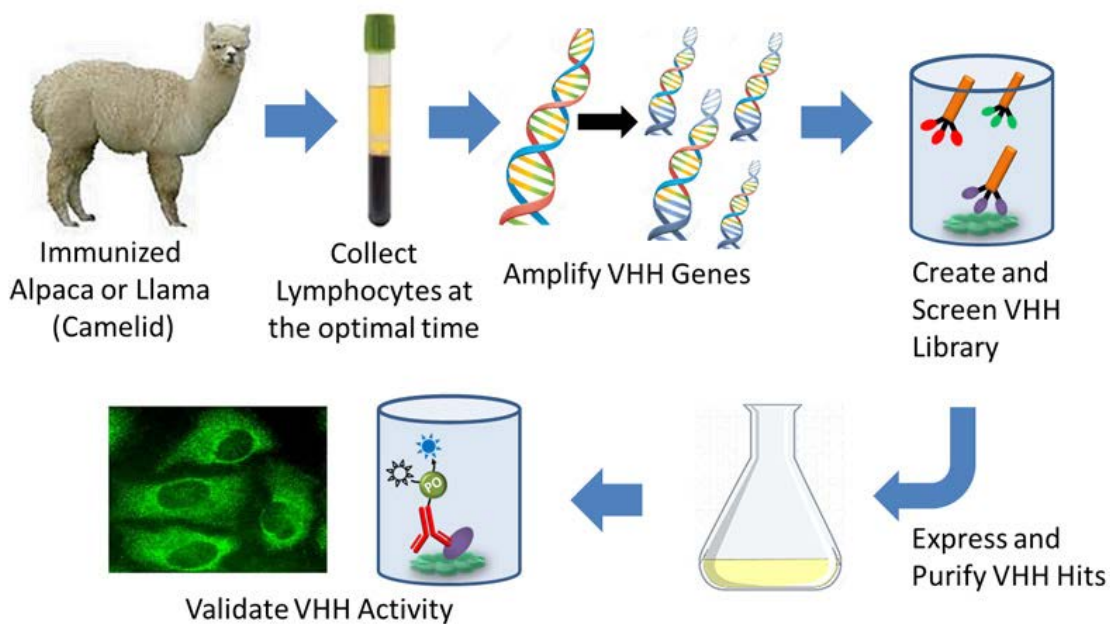
Перелік активних біомолекул, використаних для дослідження функціоналізації, та їх функції представлені нижче у таблиці.

Близько 25 років тому у тварин [126], представників сімейства Camelidae, у сироватці крові було виявлено незвичні антитіла, що складаються лише з урізаних важких ланцюгів, на відміну від антитіл, що містяться у сироватці крові людини, які наявні за повної відсутності легень. Функцію розпізнавання антигену у цих незвичайних антитілах виконує лише один варіабельний домен VHH (variable heavy chain) (Мал. 16).



Мал. 16. Порівняння будови звичайного антитіла (conventional antibody) IgG ссавців (людей, мишей, крис, кролів, інше) та антитіла тварин сімейства Camelidae - Camelidae antibody [127].

Рекомбінантний білок, що є аналогом або похідним такого антиген-розпізнавального варіабельного домену, отримав назву “однодоменне V_{HH} антитіло” (VHH single domain antibody), або “нанотіло”, або “наноантитіло” (nanobody), яке може мати молекулярну масу близько 15 кДа [128].



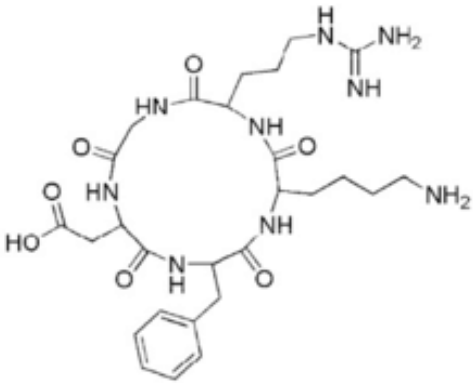
Мал. 17. Загальна схема пошуку та отримання однодоменних VHH антитіл (наноантитіл) за допомогою рекомбінантної технології.

Однодоменні антитіла (наноантитіла або нанотіла) та їх похідні знайшли широке застосування у багатьох галузях біології та медицини, відкрили нові перспективи для вирішення таких проблем, як діагностика та

імунотерапія раку, інфекційних та аутоімунних захворювань, а також нейтралізація отруту та токсинів.

В даній роботі пропонується використовувати однодоменні VHH антитіла, високоспецифічні до зв'язування та інгібування роботи деяких поверхневих мембранних рецепторів, що сильно експресовані серед ракових клітин, та регулюють роботу імунної системи людини.

Нижче у таблиці наведено коротку інформацію про біомолекули, що пропонуються для функціоналізації AGuIX® наночастинок

Біомолекула	Активна функція
<div style="text-align: center;">  <p>cRGD (cycloRGDfK) пептид</p> <p>Амінокислотна послідовність: Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) [129] Молекулярна маса: 603,68 Да</p> </div>	<p>cRGD пептид має високу специфічність до зв'язування з $\alpha_v\beta_3$ інтегринами (інгібітор), поверхневими мембранними білками, які сильно експресовані на поверхні ракових клітин</p>
<p>A4-V_HH домен</p> <p>Амінокислотна послідовність: QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAAS GIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAA STGGDEAIYRDSVKDRFTISRDAKNS VFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTD RDGTEWRRY</p>	<p>A4-VHH домен є високоспецифічним лігандом для зв'язування та інгібування з CD47 рецепторами [124].</p> <p>Інгібування CD47 рецепторів підвищує активність макрофагів: активація неспецифічного</p>

Молекулярна маса: $\approx 13,4$ кДа	імунітету
A12-V_HN домен Амінокислотна послідовність: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTAS GSTFSRNAMAWFRQAPGKEREFVSG ISRTGTNSYDADSVKGRFTISKDNAK NTVTLQMNSLKPEDTAIYYCALSQT ASVATTERL Молекулярна маса: ≈ 14 кДа	A4-V _H N домен є лігандом для зв'язування з PD-L1 рецепторами [130, 131]. Інгібування PD-L1 рецепторів підвищує активність Т клітин, що дає можливість навчити імунні клітини розпізнавати ракові клітини: активація специфічного імунітету
1B7-V_HN домен Молекулярна маса: ≈ 14 кДа	Контрольний домен
96G3m-V_HN домен Молекулярна маса: $\approx 14,4$ кДа	Контрольний домен

Таким чином, основною метою дослідження є створення активних біокон'югатів наночастинок з однодоменними V_HN антитілами A4 та A12, що допоможуть підвищити імунну відповідь організму при розпізнаванні ракових клітин, а саме покращення роботи адаптивного імунітету в якості Т-клітин та вродженого імунітету в якості макрофагів (NK - natural killers) та водночас використовуючи вже відомі радіосенсибілізуючі властивості самих наночастинок досягти локального терапевтичного ефекту за рахунок опромінення пухлин рентгенівським випромінюванням.

Мал. 18. Схематичне зображення принципу роботи інгібіторів імунних контрольних точок. Зверху: інгібування рецептору PD-L1 для стимулювання роботи Т-клітин; знизу: інгібування рецептору CD47 для стимулювання роботи макрофагів.

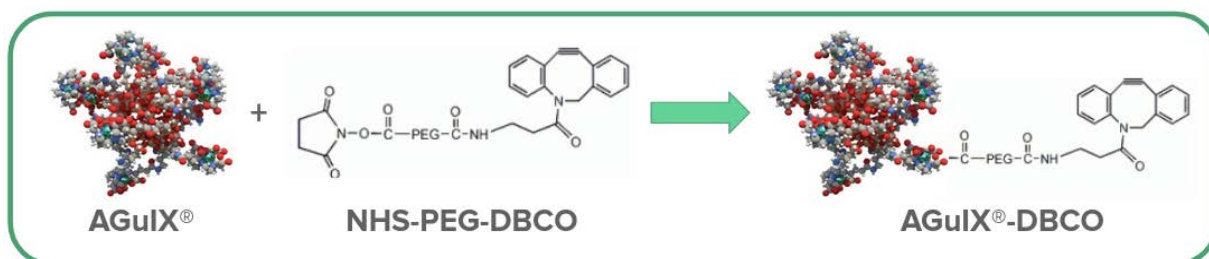
РОЗДІЛ 3. Експериментальна частина

3.1. Функціоналізація наночастинок AGuIX®

3.1.1. Синтез AGuIX®-DBCO

Для проведення реакції використовується приготовлений у лабораторії водний розчин (ультра деіонізована вода 18.2 МОм) ліофілізованих наночастинок AGuIX® (100 г/л), вироблених компанією Sanofi, France. В якості реагента для подальшої клік-реакції, використовується розчин естеру дибензоциклооктину-ПЕГ₄-N-гідросукциниміду (NHS-PEG-DBCO) у диметилсульфоксиді, придбаного у компанії [132].

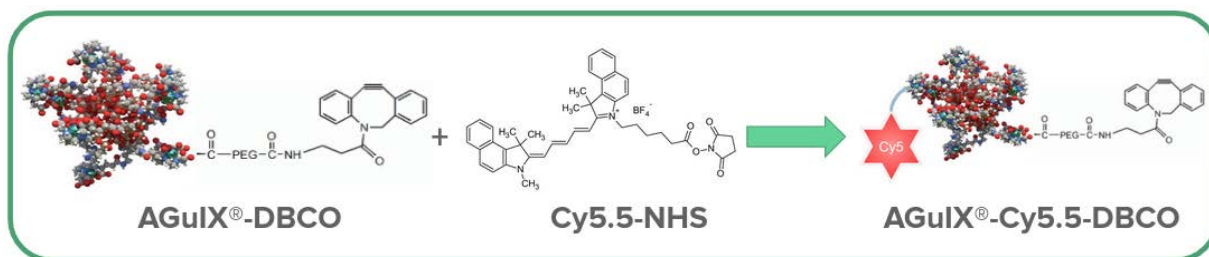
До 15 молярних еквівалентів за вмістом гадолінію ($w(\text{Gd})=13,58\%$) водного розчину наночастинок AGuIX® додають 10 еквівалентів NHS-PEG-DBCO. Реакцію проводять протягом 2-3 годин, перемішуючи за кімнатної температури. Після, реакційну суміш поміщають у центрифугуючий концентратор Vivaspin® (6 чи 20 мл) виробництва компанії Sartorius з напівпроникною PES мембраною з розділенням до 5000 Да. Реакційну суміш розбавляють водою та концентрують у центрифугі для фільтрування та відділення реагентів від продукту реакції. Процедуру повторюють 5 разів для кращого очищення. На останньому етапі розчин сильно концентрують для запобігання можливої деградації полісилоксанової матриці наночастинок AGuIX®. Готовий водний розчин продукту AGuIX®-DBCO переноситься у скляні віали та ліофілізується для отримання сухого порошку для подальшого зберігання за кімнатної температури.



3.1.2. Синтез AGuIX®-Cy5.5-DBCO

Для проведення реакції використовується попередньо синтезована функціональна похідна наночастинок AGuIX®-DBCO. Реакція відбувається

за наступною схемою.

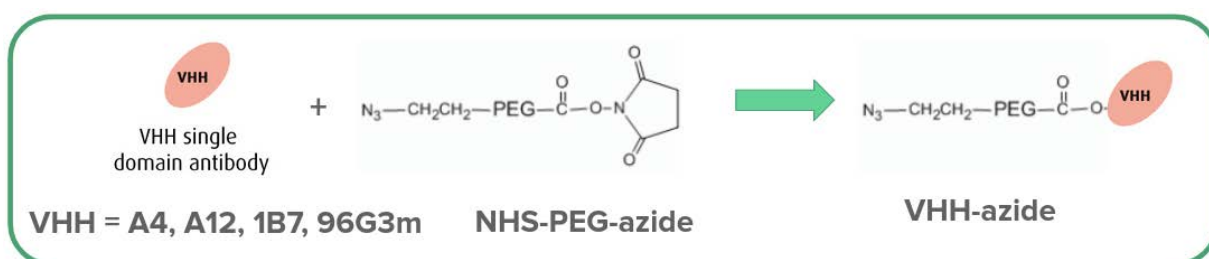


До 500 молярних еквівалентів за вмістом Gd водного розчину (100 г/л) AGuIX®-DBCO (w(Gd)=13,58%) додають 1 еквівалент розчину у ДМСО (25 мг/мл) флуоресцентного барвника Cyanine5.5 NHS ester (767,67 г/моль), придбаного у компанії Abscam, USA (ab146455) [133]. Реакційну суміш перемішують протягом двох годин за кімнатної температури у темряві. Після, реакційну суміш розбавляють водою та концентрують у центрифугі для фільтрування та відділення реагентів від продукту реакції, використовуючи аналогічний протокол як для очищення AGuIX®-DBCO. Після останнього етапу розчин концентрують та зберігають у холодильнику.

3.1.3. Синтез азидів однодомених VHH антитіл (нанотіл)

Для синтезу функціоналізації A4, A12, 96G3m, 1B7 та нанотіл за допомогою приєднання азидного фрагменту використовуються невеликі за концентрацією (до 1 мг/мл) розчини відповідних нанотіл у стандартному фосфатному буфері (PBS). Нанотіла попередньо створила біологічна лабораторія, що працює спільно над цим проектом.

До 1 молярного еквіваленту розчину VHH нанотіла (A4, A12, 96G3m та 1B7 відповідно) додають 10 молярних еквівалентів NHS-PEG₄-Azide (198,14 г/моль), придбаного в компанії Thermo Fisher Scientific [134]. Реакція відбувається за наступною схемою.

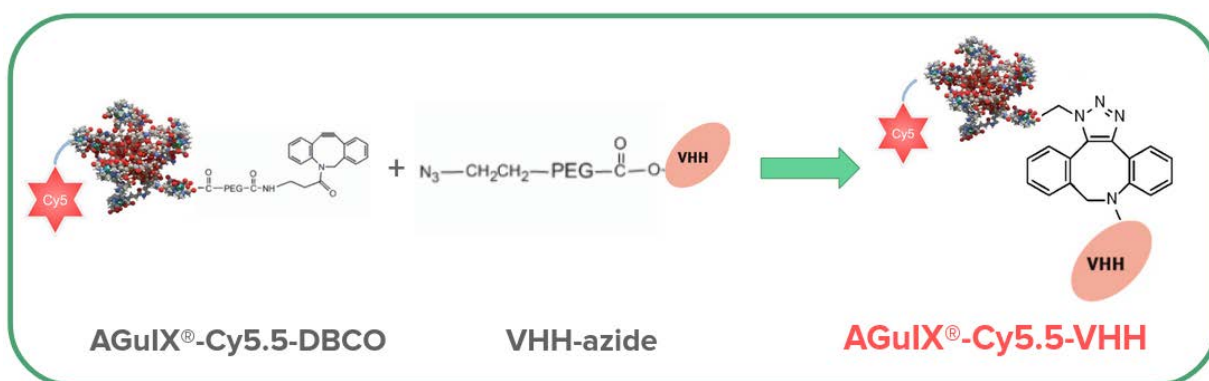


Реакційну суміш перемішують протягом двох годин за кімнатної

температури. Після, реакційну суміш розбавляють стандартним фосфатним буфером PBS та концентрують у центрифугі для фільтрування та відділення реагентів від продукту реакції, використовуючи аналогічний протокол як для очищення AGuIX®-DBCO, ала і цьому випадку використовується центрифугуючий концентратор Vivaspin® з розділенням до 10000 Да. Після останнього етапу розчин концентрують та зберігають у морозильній камері.

3.1.4. Синтез біокон'югатів наночастинок AGuIX®

Синтез біокон'югатів наночастинок AGuIX® відбувається за допомогою реакції клік-хімії за відсутності каталізатора - катіонів Cu(I). Для цього 1 молярний еквівалент розчину (1 мг/мл) у PBS попередньо синтезованого VHH-азиду (де VHH: A4, A12, 96G3m та 1B7 відповідні нанотіла) змішується з 450 молярним еквівалентом водного розчину синтезованого AGuIX®-Cy5.5-DBCO.



Реакцію проводять у темряві, перемішуючи протягом 24 годин, у холодильнику за температури 5°C. Після реакції, продукт фільтрують та очищають від реагентів за допомогою концентраційного центрифугування, використовуючи фільтр Vivaspin® (6 чи 20 мл) з розділенням до 10000 Да.

3.2. Характеризація та дослідження продуктів функціоналізації

3.2.1. Високоєфективна рідинна хроматографія

Для контролю усіх стадій функціоналізації наночастинок попередньо перед реакцією, одразу після реакції та після декількох етапів очищення відбираються зразки розчинів реагентів та продуктів для аналізу за допомогою високоєфективної рідинної хроматографії на приладі Agilent Technologies 1200 Series, використовуючи хроматографічну колонку

Superdex® 75 10/300 GL та ацетатний буфер в якості елюенту Acetate buffer SEC 0,1 М. Для приготування буферу 5.7 мл льодяної оцтової кислоти CH_3COOH , 7.7 г ацетату амонію $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ розчиняють в 1 л ультрадеіонізованої води 18.2 МОм; рН розчину складає 4.70. Для детекції сигналу та часу виходу речовин використовуються УФ-видимий детектор адсорбції (Agilent DAD G1315B) з характеристичною довжиною хвилі для детекції AGuIX® наночастинок при поглинанні 295 нм з референтним сигналом 400 нм, та флуоресцентний детектор (Agilent FLD G1321A) для розпізнавання флуоресценції біомолекул та флуоресцентного барвника Cy5.5 із максимумом збудження 280 нм та емісією 340 нм. Час аналізу розчину одного зразка (50 мкл) для достатнього хроматографічного дослідження речовин за допомогою цього методу складає 40 хв. Швидкість подачі елюенту складає 0.8 мл/хв. Аналіз відбувається за кімнатної температури, без контролю за допомогою термостата. Контроль за приладом, запис, аналіз та обробка хроматограм виконується у програмному середовищі Agilent ChemStation for LC&LC/MS Systems, що є продуктом компанії Agilent Technologies.

3.2.2. Рідинна хроматографія комбінована з мас-спектрометрією з індуктивно-зв'язаною плазмою

На кожній стадії синтезу перед реакцією та після фінального очищення продукту аналізуються зразки розчинів реагентів, що містять вихідні чи функціоналізовані наночастинок AGuIX® для аналізу та контролю вмісту атомів гадолінію Gd за масою. Аналіз зразків відбувається за допомогою рідинної хроматографії на приладі LC Autosampler, PerkinElmer®, використовуючи хроматографічну колонку Superdex® 75 10/300 GL та ацетатний буфер 0,1 М в якості елюенту. Для приготування буферу 5.7 мл льодяної оцтової кислоти CH_3COOH , 7.7 г ацетату амонію розчиняють в 1 л ультрадеіонізованої води 18.2 МОм; рН розчину складає 4,70. Для детекції сигналу атомів гадолінію при відповідному часі виходу наночастинок при хроматографії використовується мас-спектрометрія з індуктивно-зв'язаною

плазмою. Весь аналіз відбувається за допомогою приладу ICP Mass Spectrometer NexION® 2000 виробництва PerkinElmer®. Час аналізу одного зразка (100 мкл розчину) складає 40 хв. Швидкість подачі елюенту 0.8 мл/хв. Контроль за приладом, запис, аналіз та обробка хроматограм виконується у програмному середовищі Syngistix™ Software Version 2.3 виробництва PerkinElmer®.

3.2.3. MALDI-ToF аналіз

Для контролю вдалої функціоналізації азидом однодомених VNH нанотіл використовується метод матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації з детектором часу польоту заряджених частинок (MALDI-ToF). Для цього мікро концентровані об'єми розчинів відповідних вихідних нанотіл та їх функціоналізованих азидних похідних аналізуються для дослідження молекулярних мас відповідних іонів після іонізації зразків. За різницею молекулярних мас іонів та інтенсивностей відповідних піків сигналу для вихідних нанотіл та їх відповідних похідних, визначається успішність та вихід продукту реакції функціоналізації. Аналіз проводиться за допомогою приладу Voyager DE-Pro MALDI ToF Mass Spectrometer виробництва компанії AB Sciex. Контроль за приладом, запис, аналіз та обробка мас-спектрів виконується у програмному середовищі Voyager Instrument Control Panel виробництва AB Sciex.

Для аналізу окремо готувались розчини у стандартному фосфатному буфері PBS чотирьох нанотіл (A4, A12, 96G3m, 1B7) та їх азидних похідних VNH-azide, до кожного розчину додається матричний артефакт для аналізу (2,5-дигідроксибензойна кислота). Готові розчини зразків для аналізу наносяться краплинами на спеціальну металеву пластину для аналізу, сушаться на повітрі до випаровування розчинника та аналізуються за допомогою приладу. Перед аналізом прилад потрібно відкалібрувати за допомогою розчину спеціальних протеїнів з точною молекулярною масою. Після аналізу мас-спектр аналізується та шукаються відповідні молекулярні маси нанотіл та їх азидних похідних.

3.2.4. Дослідження гідродинамічного діаметру та дзета-потенціалу

Для додаткового контролю отриманих біокон'югатів наночастинок AGuIX® з відповідними VHH нанотілами використовується дослідження гідродинамічного діаметру та поверхневого дзета-потенціалу за допомогою методу динамічного розсіювання світла, використовуючи прилад Zetasizer Nano - ZS (He-Ne лазер 633 нм, 5 мВт, з 173° неінвазивним детектором зворотного відбиття з вузькосмуговим детектором) ZEN 3600 виробництва компанії Malvern Instruments.

Для аналізу гідродинамічного діаметру зразки об'ємом 1 мл водного розчину вихідних наночастинок AGuIX® (10 мг/мл) та відповідних водних розчинів отриманих біокон'югатів з VHH нанотілами (10 мг/мл) поміщаються в спеціальну пластикову кювету DTS1061 виробництва компанії Malvern Instruments для аналізу.

Для дослідження залежності дзета-потенціалу від рН наночастинок AGuIX® та їх біокон'югатів AGuIX®-Cy5.5-VHH готують розчин у спеціальній ємності для титрування, що складається з: 1 мл водного розчину AGuIX® чи відповідної функціональної похідної з концентрацією 10 мМ, 50 мкл 1 М розчину NaCl (Roth) та 8,95 мл ультрадеіонізованої води. Додатково готують 0.1 М розчини HCl (приготовлена з 34-37% розчину HCl PlasmaPure, SCP Science) та NaOH (приготованого з NaOH, Sigma-Aldrich) для автотитрування за допомогою приладу MPT-Z Multi Purpose Titrator, Model MPT-2 виробництва компанії Malvern Instruments.

рН електрод HANNA Instruments автотитратора попередньо калібрується буферними розчинами з рН=4,01 (HI70004C), рН=7,01 (HI70007C) та рН=10,01 (HI70010C). Перед початком дослідження дзета потенціалу розчин калібрують за допомогою рН-метра, доводячи рН розчину до 3, ручним способом.

Назва параметру в приладі для протоколу	Дані
---	------

Матеріал	SiO _x
Диспергент	вода + NaCl 5 mM
Метод розрахунку	Huckel
Температура	25 °C
Час калібрування	60 с
Комірка	ZEN1010-High concentration zeta cell s
Число вимірів	1
Титранти	0,1 М HCl, 0,1 М NaOH
Початковий об'єм	10 мл
Початковий та кінцевий рН	Початок з рН 3 до рН 9
Інкремент	0,3
Шаг значення рН при титруванні	0,15

3.3. Очищення продуктів функціоналізації

Після синтезу на кожних стадіях азидних похідних нанотіл VNH-azide, флуоресцентних похідних наночастинок AGuIX®-Cy5.5-DBCO та біокон'югатів AGuIX®-Cy5.5-VNH відповідно, усі розчини продуктів додатково очищаються за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії на приладі Agilent Technologies 1200 Series, використовуючи хроматографічну колонку Superdex® 75 10/300 GL та ацетатний буфер в якості елюенту Acetate buffer SEC 0,1 М.

ВИСНОВКИ

- Було проведено літературний огляд останніх публікацій, присвячених функціонуванню рецепторів імунних контрольних точок, пов'язаних з роботою клітин імунної системи людини та їх впливу на особливості та складнощі лікування ракових захворювань, використовуючи інгібітори імунних контрольних точок в якості потенційних лікарських засобів для імунотерапії раку
- Проаналізовано список останніх доступних препаратів, затверджених FDA на основі моноклональних антитіл та перспективи використання можливих аналогів - однодомених VHH нанотіл, як інгібіторів рецепторів імунних контрольних точок для потенційного стимулювання роботи адаптивного та внутрішнього імунітету людини
- Запропоновано використання запатентованих наночастинок AGuIX® для тераностики в якості платформи для їх біоортогональної функціоналізації однодоменими VHH нанотілами з метою отримання нових похідних для активного таргетингу CD47 та PD-L1 рецепторів для потенційного лікування ракових захворювань
- Проаналізовані основні методи біокон'югації наночастинок з біомолекулами та в результаті обрано метод використання реакції клік-хімії за відсутності каталізатора Cu(I) для отримання функціональних похідних
- Розроблено детальний постадійний протокол синтезу, очищення, аналізу та характеристики різними фізичними методами функціональних похідних наночастинок AGuIX® з відповідними VHH нанотілами
- Властивості наночастинок AGuIX® дозволяють використовувати їх як МРТ-контраст для виявлення пухлин та дослідження метастаз, а здатність до радіосенсибілізації - для локального лікування
- Наявність активного фрагменту VHH нанотіла на поверхні AGuIX® має збільшити селективність зв'язування наночастинок з раковими клітинами, інгібуючи рецептори імунних контрольних точок, що в

свою чергу повинно стимулювати роботу клітин внутрішнього та адаптивного імунітетів

- Для наступних біологічних досліджень отриманих біокон'югатів (інгібіторів рецепторів імунних контрольних точок) *in vitro* та *in vivo* пропонується додатково провести їх тестування на зв'язування з CD47 та PD-L1 рецепторами за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу в режимі реального-часу, використовуючи комерційно доступний проточний аналізатор компанії Biacore™ SPR з чіпом CM5, попередньо модифікувавши поверхню чіпа відповідними рецепторами для аналізу

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] Liao, D., Liu, Z., Wrasidlo, W., Chen, T., Luo, Y., Xiang, R., & Reissfeld, R. A. (2011). Synthetic enzyme inhibitor: a novel targeting ligand for nanotherapeutic drug delivery inhibiting tumor growth without systemic toxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 665–673. doi :10.1016/j.nano.2011.03.001
- [2] Friedman, A., Claypool, S., & Liu, R. (2013). The Smart Targeting of Nanoparticles. *Current Pharmaceutical Design*, 19(35), 6315–6329. doi:10.2174/13816128113199990375
- [3] Golombek, S. K., May, J.-N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F., & Lammers, T. (2018). Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2018.07.007
- [4] Lux F, Tran VL, Thomas E, et al. AGuIX[®] from bench to bedside-Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br J Radiol*. 2019 Jan;92(1093):20180365. doi: 10.1259/bjr.20180365.
- [5] <https://nhtheraguix.com/history-of-nht/>
- [6] Wang Y, Tong Z, Zhang W, Zhang W, Buzdin A, Mu X, Yan Q, Zhao X, Chang H-H, Duhon M, Zhou X, Zhao G, Chen H and Li X (2021) FDA-Approved and Emerging Next Generation Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. *Front. Oncol*. 11:683419. doi: 10.3389/fonc.2021.683419.
- [7] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711–723.
- [8] Schadendorf D, Hodi FS, Robert C et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1889–1894.
- [9] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1

- antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2455–2465.
- [10] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2443–2454.
- [11] Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 1345–1356.
- [12] Schachter J, Ribas A, Long GV et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet* 2017; 390(10105): 1853–1862.
- [13] Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer* 2018; 6: 8.
- [14] Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 1345–1356.
- [15] Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995; 182: 459–465.
- [16] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11: 3887–3895.
- [17] Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027–1034.
- [18] Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif- carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11: 141–151.

- [19] Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 1998; 10: 1563–1572.
- [20] Linsley PS, Wallace PM, Johnson J et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992; 257: 792–795.
- [21] Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992; 257: 789–792.
- [22] Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271: 1734–1736.
- [23] Fan CA, Reader J, Roque DM. Review of immune therapies targeting ovarian cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2018;19:74. doi: 10.1007/s11864-018-0584-3.
- [24] Marin-Acevedo JA, Soyano AE, Dholaria B, Knutson KL, Lou Y. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *J Hematol Oncol*. 2018;11:8. doi: 10.1186/s13045-017-0552-6.
- [25] Ok CY, Young KH. Checkpoint inhibitors in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2017;10:103. doi: 10.1186/s13045-017-0474-3.
- [26] Baghdadi M, Takeuchi S, Wada H, Seino K. Blocking mono-clonal antibodies of TIM proteins as orchestrators of anti-tumor immune response. *MAbs*. 2014;6:1124–1132. doi: 10.4161/mabs.32107.
- [27] Rodallec A, Sicard G, Fanciullino R, Benzekry S, Lacarelle B, Milano G, Ciccolini J. Turning cold tumors into hot tumors: Harnessing the potential of tumor immunity using nanoparticles. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018;14:1139–1147.
- [28] Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: Response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:655–668. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.88.
- [29] Darwin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint

- inhibitors: Recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*. 2018;50:1–11. doi: 10.1038/s12276-018-0191-1.
- [30] Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*. 2018;62:29–39. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.001.
- [31] Shen H, Yang ES, Conry M, Fiveash J, Contreras C, Bonner JA, Shi LZ. Predictive biomarkers for immune checkpoint blockade and opportunities for combination therapies. *Genes Dis*. 2019;6:232–246. doi: 10.1016/j.gendis.2019.06.006.
- [32] Kamath SD, Kalyan A, Benson AB., III Pembrolizumab for the treatment of gastric cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18:1177–1187. doi: 10.1080/14737140.2018.1526084.
- [33] Hsu FS, Su CH, Huang KH. A comprehensive review of US FDA-approved immune checkpoint inhibitors in urothelial carcinoma. *J Immunol Res*. 2017;2017:6940546. doi: 10.1155/2017/6940546.
- [34] Song MK, Park BB, Uhm J. Understanding immune evasion and therapeutic targeting associated with PD-1/PD-L1 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1326. doi: 10.3390/ijms20061326.
- [35] Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, Berdelou A, Varga A, Bahleda R, Hollebecque A, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: A comprehensive review. *Eur J Cancer*. 2016;54:139–148. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.016.
- [36] Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol*. 2017;8:1603. doi: 10.3389/fimmu.2017.01603.
- [37] Ubah OC, Buschhaus MJ, Ferguson L, Kovaleva M, Steven J, Porter AJ, Barelle CJ. Next-generation flexible formats of VNAR domains expand the

- drug platform's utility and developability. *Biochem Soc Trans.* 2018;46:1559–1565. doi: 10.1042/BST20180177.
- [38] Wang H, Meng AM, Li SH, Zhou XL. A nanobody targeting carcinoembryonic antigen as a promising molecular probe for non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep.* 2017;16:625–630. doi: 10.3892/mmr.2017.6677.
- [39] Broos K, Lecocq Q, Raes G, Devoogdt N, Keyaerts M, Breckpot K. Noninvasive imaging of the PD-1:PD-L1 immune checkpoint: Embracing nuclear medicine for the benefit of personalized immunotherapy. *Theranostics.* 2018;8:3559–3570. doi: 10.7150/thno.24762.
- [40] Mayer AT, Natarajan A, Gordon SR, Maute RL, McCracken MN, Ring AM, Weissman IL, Gambhir SS. Practical immuno-PET radiotracer design considerations for human immune checkpoint imaging. *J Nucl Med.* 2017;58:538–546. doi: 10.2967/jnumed.116.177659.
- [41] Lecocq Q, De Vlaeminck Y, Hanssens H, D'Huyvetter M, Raes G, Goyvaerts C, Keyaerts M, Devoogdt N, Breckpot K. Theranostics in immuno-oncology using nanobody derivatives. *Theranostics.* 2019;9:7772–7791. doi: 10.7150/thno.34941.
- [42] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363:446–448. doi: 10.1038/363446a0.
- [43] Muyldermans S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:775–797. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- [44] Könning D, Zielonka S, Grzeschik J, Empting M, Valldorf B, Krah S, Schröter C, Sellmann C, Hock B, Kolmar H. Camelid and shark single domain antibodies: Structural features and therapeutic potential. *Curr Opin Struct Biol.* 2017;45:10–16. doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.019.
- [45] Krah S, Schröter C, Zielonka S, Empting M, Valldorf B, Kolmar H. Single-domain antibodies for biomedical applications. *Immunopharmacol*

- Immunotoxicol. 2016;38:21–28. doi: 10.3109/08923973.2015.1102934.
- [46] Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: Big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016;21:1076–1113. doi: 10.1016/j.drudis.2016.04.003.
- [47] Stijlemans B, De Baetselier P, Caljon G, Van Den Abbeele J, Van Ginderachter JA, Magez S. Nanobodies as tools to understand, diagnose, and treat African trypanosomiasis. *Front Immunol*. 2017;8:724. doi: 10.3389/fimmu.2017.00724.
- [48] Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyltermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)* 2013;8:1013–1026. doi: 10.2217/nmm.13.86.
- [49] Arezumand R, Alibakhshi A, Ranjbari J, Ramazani A, Muyltermans S. Nanobodies as novel agents for targeting angio-genesis in solid cancers. *Front Immunol*. 2017;8:1746. doi: 10.3389/fimmu.2017.01746.
- [50] Van Heeke G, Allosery K, De Brabandere V, De Smedt T, Detalle L, de Fougérolles A. Nanobodies[®] as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;169:47–56. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.012.
- [51] Massa S, Xavier C, Muyltermans S, Devoogdt N. Emerging site-specific bioconjugation strategies for radioimmunotracer development. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13:1149–1163. doi: 10.1080/17425247.2016.1178235.
- [52] Massa S, Vikani N, Betti C, Ballet S, Vanderhaegen S, Steyaert J, Descamps B, Vanhove C, Bunschoten A, van Leeuwen FW, et al. Sortase A-mediated site-specific labeling of camelid single-domain antibody-fragments: A versatile strategy for multiple molecular imaging modalities. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016;11:328–339. doi: 10.1002/cmimi.1696.
- [53] 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;172:607–617. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.298.
- [54] Iezzi ME, Policastro L, Werbach S, Podhajcer O, Canziani GA. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging

- and treatment. *Front Immunol.* 2018;9:273. doi: 10.3389/fimmu.2018.00273.
- [55] Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol.* 2017;8:1442. doi: 10.3389/fimmu.2017.01442.
- [56] Beghein E, Gettemans J. Nanobody technology: A versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration. *Front Immunol.* 2017;8:771. doi: 10.3389/fimmu.2017.00771.
- [57] Menzel S, Rissiek B, Haag F, Goldbaum FA, Koch-Nolte F. The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): Nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs. *FEBS J.* 2013;280:3543–3550. doi: 10.1111/febs.12313.
- [58] Unger M, Eichhoff AM, Schumacher L, Strycio M, Menzel S, Schwan C, Alzogaray V, Zylberman V, Seman M, Brandner J, et al. Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary *Clostridium difficile* toxin CDT. *Sci Rep.* 2015;5:7850. doi: 10.1038/srep07850.
- [59] Mars A, Bouhaouala-Zahar B, Raouafi N. Ultrasensitive sensing of *Androctonus australis* hector scorpion venom toxins in biological fluids using an electrochemical graphene quantum dots/nanobody-based platform. *Talanta.* 2018;190:182–187. doi: 10.1016/j.talanta.2018.07.087.
- [60] Singh A, Pasha SK, Manickam P, Bhansali S. Single-domain antibody based thermally stable electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron.* 2016;83:162–168. doi: 10.1016/j.bios.2016.04.054.
- [61] Zhu Z, Shi L, Feng H, Zhou HS. Single domain antibody coated gold nanoparticles as enhancer for *Clostridium difficile* toxin detection by electrochemical impedance immunosensors. *Bioelectrochemistry.* 2015;101:153–158. doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.10.003.
- [62] Li G, Zhu M, Ma L, Yan J, Lu X, Shen Y, Wan Y. Generation of small

- single domain nanobody binders for sensitive detection of testosterone by electrochemical impedance spectroscopy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8:13830–13839. doi: 10.1021/acsami.6b04658.
- [63] Li H, Sun Y, Elseviers J, Muyltermans S, Liu S, Wan Y. A nanobody-based electrochemiluminescent immunosensor for sensitive detection of human procalcitonin. *Analyst*. 2014;139:3718–3721. doi: 10.1039/c4an00626g.
- [64] Liu X, Wen Y, Wang W, Zhao Z, Han Y, Tang K, Wang D. Nanobody-based electrochemical competitive immunosensor for the detection of AFB₁ through AFB₁-HCR as signal amplifier. *Mikrochim Acta*. 2020;187:352. doi: 10.1007/s00604-020-04343-2.
- [65] Liu A, Yin K, Mi L, Ma M, Liu Y, Li Y, Wei W, Zhang Y, Liu S. A novel photoelectrochemical immunosensor by integration of nanobody and ZnO nanorods for sensitive detection of nucleoside diphosphatase kinase-A. *Anal Chim Acta*. 2017;973:82–90. doi: 10.1016/j.aca.2017.03.048.
- [66] Zhou Q, Li G, Zhang Y, Zhu M, Wan Y, Shen Y. Highly selective and sensitive electrochemical immunoassay of Cry1C using nanobody and π - π stacked graphene oxide/thionine assembly. *Anal Chem*. 2016;88:9830–9836. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02945.
- [67] Steeland S, Puimège L, Vandenbroucke RE, Van Hauwermeiren F, Haustraete J, Devoogdt N, Hulpiau P, Leroux-Roels G, Laukens D, Meuleman P, et al. Generation and characterization of small single domain antibodies inhibiting human tumor necrosis factor receptor 1. *J Biol Chem*. 2015;290:4022–4037. doi: 10.1074/jbc.M114.617787.
- [68] Kazemi-Lomedasht F, Pooshang-Bagheri K, Habibi-Anbouhi M, Hajizadeh-Safar E, Shahbazzadeh D, Mirzahosseini H, Behdani M. In vivo immunotherapy of lung cancer using cross-species reactive vascular endothelial growth factor nano-bodies. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20:489–496.
- [69] Salvador JP, Vilaplana L, Marco MP. Nanobody: Outstanding features for

- diagnostic and therapeutic applications. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411:1703–1713. doi: 10.1007/s00216-019-01633-4.
- [70] De Munter S, Van Parys A, Bral L, Ingels J, Goetgeluk G, Bonte S, Pille M, Billiet L, Weening K, Verhee A, et al. Rapid and effective generation of nanobody based CARs using PCR and gibson assembly. *Int J Mol Sci.* 2020;21:883. doi: 10.3390/ijms21030883.
- [71] Ren W, Li Z, Xu Y, Wan D, Barnych B, Li Y, Tu Z, He Q, Fu J, Hammock BD. One-step ultrasensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on nanobody/nanoluciferase fusion for detection of aflatoxin B₁ in cereal. *J Agric Food Chem.* 2019;67:5221–5229. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00688.
- [72] Allegra A, Innao V, Gerace D, Vaddinelli D, Allegra AG, Musolino C. Nanobodies and cancer: Current status and new perspectives. *Cancer Invest.* 2018;36:221–237. doi: 10.1080/07357907.2018.1458858.
- [73] De Genst E, Chan PH, Pardon E, Hsu SD, Kumita JR, Christodoulou J, Menzer L, Chirgadze DY, Robinson CV, Muyldermans S, et al. A nanobody binding to non-amyloido-genic regions of the protein human lysozyme enhances partial unfolding but inhibits amyloid fibril formation. *J Phys Chem B.* 2013;117:13245–13258. doi: 10.1021/jp403425z.
- [74] Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Front Immunol.* 2017;8:977. doi: 10.3389/fimmu.2017.00977.
- [75] Akazawa-Ogawa Y, Uegaki K, Hagihara Y. The role of intra-domain disulfide bonds in heat-induced irreversible denaturation of camelid single domain VHH antibodies. *J Biochem.* 2016;159:111–121. doi: 10.1093/jb/mvv082.
- [76] Goldman ER, Liu JL, Zabetakis D, Anderson GP. Enhancing stability of camelid and shark single domain antibodies: An overview. *Front Immunol.* 2017;8:865. doi: 10.3389/fimmu.2017.00865.
- [77] Kunz P, Zinner K, Mücke N, Bartoschik T, Muyldermans S, Hoheisel JD. The structural basis of nanobody unfolding reversibility and

- thermoresistance. *Sci Rep*. 2018;8:7934. doi: 10.1038/s41598-018-26338-z.
- [78] Schumacher D, Helma J, Schneider AFL, Leonhardt H, Hackenberger CPR. Nanobodies: Chemical functionalization strategies and intracellular applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018;57:2314–2333. doi: 10.1002/anie.201708459.
- [79] Wang Y, Fan Z, Shao L, Kong X, Hou X, Tian D, Sun Y, Xiao Y, Yu L. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3287–3303. doi: 10.2147/IJN.S107194.
- [80] Jovčevska I, Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020;34:11–26. doi: 10.1007/s40259-019-00392-z.
- [81] Zottel A, Jovčevska I, Šamec N, Mlakar J, Šriбар J, Križaj I, Skoblar Vidmar M, Komel R. Anti-vimentin, anti-TUFM, anti-NAP1L1 and anti-DPYSL2 nanobodies display cytotoxic effect and reduce glioblastoma cell migration. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920915302. doi: 10.1177/1758835920915302.
- [82] Zavrtanik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. *J Mol Biol*. 2018;430:4369–4368. doi: 10.1016/j.jmb.2018.09.002.
- [83] Arbabi-Ghahroudi M. Camelid single-domain antibodies: Historical perspective and future outlook. *Front Immunol*. 2017;8:1589. doi: 10.3389/fimmu.2017.01589.
- [84] Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*. 2002;16:240–242. doi: 10.1096/fj.01-0343fje.
- [85] Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J*

- Neurochem. 2005;95:1201–1214. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x.
- [86] Sheng Y, Wang K, Lu Q, Ji P, Liu B, Zhu J, Liu Q, Sun Y, Zhang J, Zhou EM, Zhao Q. Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against newcastle disease virus in the immunoassay. *J Nanobiotechnology*. 2019;17:35. doi: 10.1186/s12951-019-0468-0.
- [87] Behdani M, Zeinali S, Karimipour M, Khanahmad H, Schoonooghe S, Aslemarz A, Seyed N, Moazami-Godarzi R, Baniahmad F, Habibi-Anbouhi M, et al. Development of VEGFR2-specific nanobody pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *N Biotechnol*. 2013;30:205–209. doi: 10.1016/j.nbt.2012.09.002.
- [88] Sadeghnezhad G, Romão E, Bernedo-Navarro R, Massa S, Khajeh K, Muyldermans S, Hassania S. Identification of new DR5 agonistic nanobodies and generation of multivalent nanobody constructs for cancer treatment. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4818. doi: 10.3390/ijms20194818.
- [89] Huet HA, Growney JD, Johnson JA, Li J, Bilic S, Ostrom L, Zafari M, Kowal C, Yang G, Royo A, et al. Multivalent nano-bodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *Mabs*. 2014;6:1560–1570. doi: 10.4161/19420862.2014.975099.
- [90] Lux, F., Tran, V. L., Thomas, E., et al. (2019). AGuiX ® from bench to bedside-transfer of an ultras-small theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. In *British Journal of Radiology* (Vol. 92, Issue 1093). British Institute of Radiology. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180365>
- [91] Radiosensitization of Multiple Brain Metastases Using AGuiX Gadolinium Based Nanoparticles (NANO-RAD. ClinicalTrials. gov: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02820454>.
- [92] AGuiX Gadolinium-based Nanoparticles in Combination With Chemoradiation and Brachytherapy (NANOCOL. ClinicalTrials. gov: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03308604>: <https://clinicaltrials.gov/>

ct2/show/NCT03308604.

- [93] Verry, C., Dufort, S., Villa, J., et al (2021). Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer: A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *Radiotherapy and Oncology*, 160, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.04.021>
- [94] Kolb, H. C., Finn, M. G., and Sharpless, K. B. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* 40, 2004–2021.
- [95] Fringuelli, F., and Taticchi, A. (2002) *The Diels Alder Reaction: Selected Practical Methods*, Wiley, Chichester; New York.
- [96] Liu, S., and Edgar, K. J. (2015) Staudinger Reactions for Selective Functionalization of Polysaccharides: A Review. *Biomacromolecules* 16, 2556–2571.
- [97] Schilling, C. I., Jung, N., Biskup, M., Schepers, U., and Brase, S. (2011) Bioconjugation via Azide–Staudinger Ligation: an Overview. *Chem. Soc. Rev.* 40, 4840–4871.
- [98] Belbekhouche, S., Guerrouache, M., and Carbonnier, B. (2016) Thiol–Maleimide Michael Addition Click Reaction: A New Route to Surface Modification of Porous Polymeric Monolith. *Macromol. Chem. Phys.* 217, 997–1006.
- [99] Nair, D. P., Podgórski, M., Chatani, S., Gong, T., Xi, W., Fenoli, C. R., and Bowman, C. N. (2014) The Thiol–Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* 26, 724–744.
- [100] Ulrich, S., Boturyn, D., Marra, A., Renaudet, O., and

- Dumy, P. (2014) Oxime Ligation: a Chemoselective Click-type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs. *Chem. – Eur. J.* 20, 34–41.
- [101] Spears, R. J., and Fascione, M. A. (2016) Site-selective Incorporation and Ligation of Protein Aldehydes. *Org. Biomol. Chem.* 14, 7622–7638.
- [102] Amblard, F., Cho, J. H., and Schinazi, R. F. (2009) Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem. Rev.* 109, 4207–4220.
- [103] Golas, P. L., and Matyjaszewski, K. (2010) Marrying Click Chemistry with Polymerization: Expanding the Scope of Polymeric Materials. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1338–1354.
- [104] Hein, J. E., and Fokin, V. V. (2010) Copper-catalyzed azide-alkyne Cycloaddition (CuAAC) and Beyond: New Reactivity of Copper(I) Acetylides. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1302–1315.
- [105] Nandivada, H., Jiang, X., and Lahann, J. (2007) Click Chemistry: Versatility and Control in the Hands of Materials Scientists. *Adv. Mater.* 19, 2197–2208.
- [106] Presolski, S. I., Hong, V. P., and Finn, M. G. (2011) Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc Chem. Biol.* 3, 153–162.
- [107] Tang, W., and Becker, M. L. (2014) “Click” Reactions: a Versatile Toolbox for the Synthesis of Peptide-conjugates. *Chem. Soc. Rev.* 43, 7013–7039.

- [108] Huisgen, R. (1963) 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2, 565–598.
- [109] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* 41, 2596–2599.
- [110] Tornøe, C., Christensen, C., and Meldal, M. (2002) Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynesto Azides. *J. Org. Chem.* 67, 3057–3064.
- [111] Bock, V. D., Hiemstra, H., and van Maarseveen, J. H. (2006) Cu(I)-Catalyzed Alkyne-Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 51–68.
- [112] Hein, C. D., Liu, X. M., and Wang, D. (2008) Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* 25, 2216–2230.
- [113] Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B., and Fokin, V. V. (2005) Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 210–216.
- [114] Rodionov, V. O., Fokin, V. V., and Finn, M. G. (2005) Mechanism of the Ligand-free CuI-catalyzed Azide-alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem., Int.*

Ed. 44, 2210–2215.

- [115] Agard, N. J., Prescher, J. A., and Bertozzi, C. R. (2004) A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15046–15047.
- [116] DepositOnce: Engineering the genetic code of *Escherichia coli* with methionine analogues and bioorthogonal amino acids for protein immobilization. (n.d.). Retrieved May 22, 2022, from <https://depositonce.tu-berlin.de/handle/11303/5821>.
- [117] Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., and Bertozzi, C. R. (2007) Copper-free Click Chemistry for Dynamic In vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16793–16797.
- [118] Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. v., Noodleman, L., Sharpless, K. B., et al 38; Fokin, V. v. (2005). Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*(1), 210–216. <https://doi.org/10.1021/ja0471525>.
- [119] Adronov, A., Chadwick, R., Van Gyzen, S., and Liogier, S. (2014) Scalable Synthesis of Strained Cyclooctyne Derivatives. *Synthesis* 46, 669–677.
- [120] Pickens, C. J., Johnson, S. N., Pressnall, M. M., Leon, M. A., & Berkland, C. J. (2017). Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chemistry*, 29(3), 686–701. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00633.
- [121] Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, Gupta R, Tsai JM, Sinha R, Corey D, Ring AM, Connolly AJ,

- Weissman IL. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017 May 25;545(7655):495-499. doi: 10.1038/nature22396.
- [122] Novel immunotherapies to combine with PD-1/PD-L1 treatment. (n.d.). Retrieved May 22, 2022, from <https://www.nature.com/articles/d43747-020-00950-3>.
- [123] Pardoll, D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252–264 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- [124] Ingram JR, Blomberg OS, Sockolosky JT, Ali L, Schmidt FI, Pishesha N, Espinosa C, Dougan SK, Garcia KC, Ploegh HL, Dougan M. Localized CD47 blockade enhances immunotherapy for murine melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Sep 19;114(38):10184-10189. doi: 10.1073/pnas.1710776114.
- [125] Li, Z., Li, Y., Gao, J., Fu, Y., Hua, P., Jing, Y., Cai, M., Wang, H., & Tong, T. (2021). The role of CD47-SIRP α immune checkpoint in tumor immune evasion and innate immunotherapy. In *Life Sciences* (Vol. 273, p. 119150). Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119150.
- [126] Gorshkova, E. N., Vasilenko, E. A., Tillib, S. v., & Astrakhantseva, I. v. (2016). Single domain antibodies and bioengineering drugs on their basis: New opportunities for diagnostics and therapy. In *Medical Immunology (Russia)* (Vol. 18, Issue 6, pp. 505–520). Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI). doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-505-520.
- [127] <https://www.proteogenix.science/antibody-production/phage-display-services/vhh-single-domain-antibody-production/>
- [128] <https://www.hybribody.com/contenu/synthetic-vhh-library-menu/take-advantage-of-vhh-antibody-properties>
- [129] <https://www.novoprolabs.com/p/cyclo-arg-gly-asp-d-phe-lys-318723.html>
- [130] Dougan, M., Ingram, J. R., Jeong, H. J. et al. (2018). Targeting cytokine

therapy to the pancreatic tumor microenvironment using PD-L1-specific VHHs. *Cancer Immunology Research*, 6(4), 389–401. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0495.

[131] Ingram, J. R., Dougan, M., Rashidian, M., Knoll, M., Keliher, E. J., Garrett, S., Garforth, S., Blomberg, O. S., Espinosa, C., Bhan, A., Almo, S. C., Weissleder, R., Lodish, H., Dougan, S. K., & Ploegh, H. L. (2017). PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-00799-8.

[132] <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/aldrich/764019>.

[133] <https://www.abcam.com/cyanine55-nhs-ester-amine-reactive-far-red-emitting-fluorescent-dye-ab146455.html>.

[134] https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26130?gclid=Cj0KCQjw1ZeUBhDyARIsAOzAqQJx6bFeqRaMuKqL58qj5OC4HvTbnlkTkiM6waIF-WVqxdDtWqDwoj8aAgOVEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw1ZeUBhDyARIsAOzAqQJx6bFeqRaMuKqL58qj5OC4HvTbnlkTkiM6waIF-WVqxdDtWqDwoj8aAgOVEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!459073496772!!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con.