IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۴۰۲، دوره ۷، پیاپی ۱۷ صفحه ۱۳۸-۱۲۳

مقاله مروری

نانوبادی‌ها و روش‌های افزایش نیمه عمر آن‌ها

فرناز خدابخش[۱]، مرتضی سلیمیان[۲]، رضا آهنگری‌کهن[۳*]

۱. بخش ژنتیک و فناوری نوین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
۲. دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳. بخش نانوبیوتکنولوژی، گروه فناوری‌های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: ۹ مهر ۱۴۰۲ پذیرش: ۱۰ آبان ۱۴۰۲

چکیده

توسعه قطعات آنتی‌بادی جهت رفع مشکلات ناشی از آنتی‌بادی‌های تجاری از قبیل اندازه بزرگ آن‌ها و فرآیندهای تولید پر هزینه و زمان‌بر درحال گسترش است. یکی از این قطعات، نانوبادی‌ها می‌باشند که در سرم خانواده شترسانان یافت می‌شوند. نانوبادی‌ها به‌عنوان کوچکترین قطعه عملکردی آنتی‌بادی‌ها، کاربردهای بسیاری را در تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف بویژه سرطان‌های جامد دارند. بااین‌حال اندازه کوچک آن‌ها، سبب دفع سریع آن‌ها از گردش خون بعد از تجویز شده که منجر به محدودیت استفاده از آن‌ها در بالین می‌شود. برای رفع این مشکل، روش‌های مختلفی جهت افزایش نیمه عمر پلاسمایی پروتئین‌های درمانی با اندازه کوچک پیشنهاد شده است که بطورکلی بااستفاده‌از دو سازوکار (۱) بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی قسمت قابل کریستاله‌شدن ایمنوگلوبین‌ها و (۲) افزایش حجم هیدرودینامیکی استفاده می‌کنند. سازوکار اول به‌صورت طبیعی در بدن منجربه افزایش نیمه عمر پلاسمایی ایمنوگلوبین‌ها و آلبومین می‌شود. اتصال شیمیایی به پلیمرهای مصنوعی، اتصال ژنتیکی به پپتیدهای شبه‌پلیمری و تکرار دوتایی از توالی نانوبادی از مجموعه روش‌هایی هستند که با سازوکار دوم منجر به افزایش نیمه عمر پلاسمایی نانوبادی‌ها می‌شوند. در این مقاله مروری، ابتدا به‌طورمختصر به معرفی نانوبادی‌ها پرداخته و سپس روش‌های افزایش نیمه عمر پلاسمایی آن‌ها به‌طورمفصل بحث خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: فارماکوکینتیک، قطعات آنتی‌بادی، نانوبادی، نیمه عمر پلاسمایی

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها و قطعات آن‌ها

امروزه آنتی‌بادی‌ها[۱] بیشترین میزان فروش را در بین پروتئین‌های درمانی به خود اختصاص داده‌اند [۲، ۱]. این پروتئین‌های درمانی مشکلات ناشی از عوارض جانبی و عدم‌اختصاصیت داروهای شیمیایی را برطرف کرده‌اند. بااین‌وجود، نفوذ کم به‌درون بافت‌های توموری به‌دلیل اندازه بزرگ، ساختار غیرمنعطف و پایداری پایین استفاده از آن‌ها را در بالین محدود کرده است [۳]. علاوه بر این، دُز[۲] اغلب آنتی‌بادی‌های درمانی در مقایسه با دیگر پروتئین‌های درمانی نسبتاً بالا بوده و لذا تولید آن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای یک عامل محدودکننده به‌شمار می‌رود [۲]. برای حل مشکلات ذکر شده، استفاده از قطعات آنتی‌بادی همچون منطقه اتصال آنتی‌ژن[۳] و قطعه متغیر تک‌زنجیره‌ای[۴] و بهره‌گیری از سامانه‌های بیانی ساده‌تر پروکایوتی[۵] پیشنهاد شده است. این سامانه‌های بیانی می‌توانند مقدار بیشتری از پروتئین مورد نظر را در مقایسه با سامانه‌های یوکاریوتی[۶] تامین نموده و جهت تولید قطعات آنتی‌بادی فاقد تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون[۷]، بسیار سودمند می‌باشند. علاوه‌براین، قطعات آنتی‌بادی مزایای خاصی نسبت به

[1] Antibodies
[2] Dose
[3] Fragment antigen-binding
[4] Single-chain variable fragment
[5] Prokaryotic systems
[6] Eukaryotic systems
[7] Glycosylation

* نویسنده مسئول مکاتبات: cohan.reza@gmail.com (ORCID: 0000-0002-0490-4184)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

ماکروملکول‌های آنتی‌بادی دارند. به‌طورمثال، قطعات آنتی‌بادی به‌دلیل اندازه کوچک‌تر، سریع‌تر از ماکروملکول‌های آنتی‌بادی به درون بافت‌های جامد (مانند تومورها[8]) نفوذ می‌کنند. همچنین فقدان قسمت قابل کریستالیزه شدن[9] در قطعات آنتی‌بادی، خطر ایمنی‌زایی را در انسان کاهش می‌دهد [۵، ۴، ۲].

نانوبادی‌ها

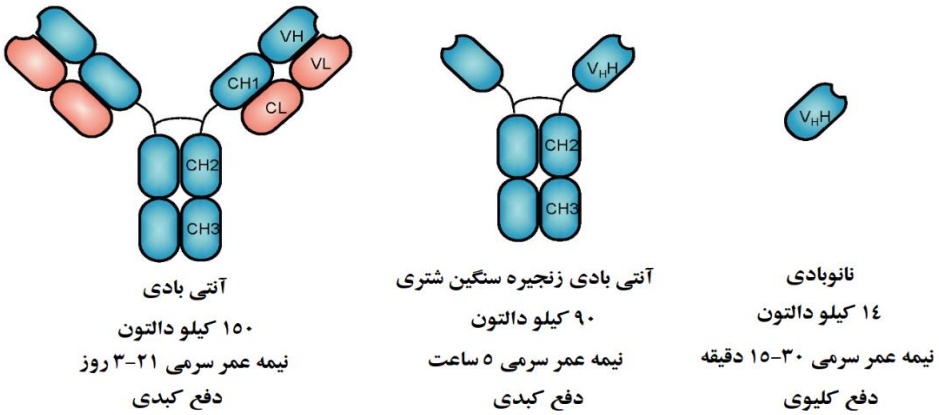
نوع خاصی از آنتی‌بادی‌ها علاوه بر آنتی‌بادی‌های مرسوم در سرم خانواده شترسانان[10] وجود دارد که آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین[11] نامیده می‌شوند. این نوع آنتی‌بادی‌ها به‌علت نداشتن زنجیره سبک و اولین ناحیه ثابت منحصربفرد می‌باشند. ناحیه متصل‌شونده به آنتی‌ژن در قسمت انتهایی آمین[12] بوده که به‌نام نانوبادی[13] شناخته می‌شود. در مقایسه، نانوبادی‌ها حدود ۰/۱ آنتی‌بادی‌های تجاری معمول وزن دارند (۱۴ کیلودالتون در برابر ۱۵۰ کیلو دالتون) (شکل ۱) [۶]. مشابه ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی‌بادی‌های مرسوم، نانوبادی‌ها از لحاظ ساختاری حاوی چهار ناحیه داربست[14] و سه منطقه تعیین‌کننده مکمل[15] می‌باشند [۶]. بااین‌حال، CDR3 نانوبادی‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌های مرسوم از تعداد آمینواسیدهای بیشتری تشکیل شده است و معمولا این ناحیه نسبت به مناطق تعیین‌کننده مکمل دیگر نانوبادی (CDR1 و CDR2) در اتصال به آنتی‌ژن دخالت بیشتری دارند. شاخص‌ترین ویژگی نانوبادی‌ها حضور آمینواسیدهای جانشین شده در چهار موقعیت (فنیل‌آلانین ۳۷، گلوتامیک اسید ۴۴، آرژنین ۴۵ و گلایسین ۴۷) از ناحیه قاب[8] شماره دو می‌باشد که در قسمت متغیر زنجیره سنگین آنتی‌بادی‌های مرسوم به‌صورت محافظت شده می‌باشند [۷]. این آمینواسیدهای جانشین‌شده به آب دوست‌شدن نانوبادی ها کمک می‌کنند [۶]. علاوه‌بر پیوند دی‌سولفیدی درون‌دامنه‌ای حفظ شده[16] که در قسمت متغیر آنتی‌بادی‌ها (سیستئین‌های شماره ۱۰۴ و ۲۳) وجود دارد، چندین پیوند دی‌سولفیدی غیرمتعارف در نانوبادی‌ها یافت می‌شود. رایج‌ترین پیوند دی‌سولفیدی بین CDR1 و CDR3 (سیستئین‌های شماره ۱۰۲ و ۳۳) است. این پیوند دی‌سولفیدی غیرمتعارف یک عملکرد حفاظت شده در نانوبادی‌ها دارد و با تثبیت ساختار CDR3 منجر به افزایش میل ترکیبی نانوبادی به آنتی ژن می‌شود [۸]. شکل ۱، مقایسه اندازه، وزن ملکولی، نیمه عمر سرمی و نحوه پاکسازی نانوبادی‌ها را در مقایسه با منوکلونال آنتی‌بادی انسانی و آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شترسانان نشان می‌دهد [۹].

مزایا و معایب نانوبادی‌ها

از مزایای نانوبادی‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌های مرسوم می‌توان به حلالیت بالا، بیان خوب، پایداری بالا در شرایط فیزیکوشیمیایی گوناگون، نفوذ سریع به درون بافت‌های جامد، تشخیص مکان‌های آنتی‌ژنی پنهان، دارا بودن اندازه کوچک‌تر، پایین‌تربودن ایمنی‌زایی آن در انسان به‌علت وجود همسانی[17] بین ناحیه متغیر زنجیره سنگین انسانی با آنتی بادی زنجیره سنگین شتر، میل ترکیبی بالا و اختصاصی به گیرنده اشاره نمود [۱۰]. این نانوبادی‌ها در مقایسه با قطعه متغیر تک زنجیره ای که دارای مشکلاتی همچون پایداری[18] و پایین‌بودن میل اتصال هستند، مناسب‌تر هستند [۷]. نانوبادی‌ها بیش از سایر آنتی‌بادی‌ها قادر به تحمل حرارت و ترکیبات شیمیایی بوده، لذا قابلیت استفاده در محیط‌های سخت را دارند. برای‌مثال، می‌توانند به‌صورت خوراکی در درمان سرطان کولون و بیماری‌های گوارشی مورد استفاده قرار گیرند. اندازه کوچک نانوبادی ها همچنین عبور آن‌ها از سد مغزی- خونی[19] میسر کرده و بنابراین می‌توانند در بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مانند آلزایمر مورد استفاده قرار گیرند [۱۱]. چندین نانوبادی جهت درمان توسط شرکت Ablynx در مراحل بالینی یک و دو در حال بررسی هستند. بااینحال نانوبادی‌ها به‌دلیل اندازه کوچک، پاکسازی[20] سریع کلیوی و در نتیجه نیمه عمر سرمی بسیار پایینی دارند و این مشکل، بسیاری از کاربردهای بالقوه آن‌ها را محدود کرده است [۱۲].

[8] Tumors
[9] Crystallizable fragment
[10] Camelidae
[11] Heavy-chain antibodies
[12] N-terminal
[13] Nanobody
[14] Framework regions
[15] Complementarity-determining regions
[16] Conserved canonical intra-domain disulfide bond
[17] Homology
[18] Stability
[19] Blood-brain barrier
[20] Clearance (CL)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ۱- اندازه، وزن ملکولی، نیمه عمر سرمی و نحوه پاکسازی نانوبادی در مقایسه با منوکلونال آنتی‌بادی انسانی و آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شترسانان [۹].

سازوکارهای افزایش نیمه عمر پلاسمایی نانوبادی‌ها

همانطورکه ذکر شد، یکی از مهمترین مشکلات نانوبادی‌ها برای استفاده در بالین پارامترهای فارماکوکینتیکی ضعیف آن‌ها ازقبیل حجم توزیع[۲۱] بالا، پاکسازی سریع کلیوی، نیمه عمر انتهایی[۲۲] کم و میانگین زمان اقامت[۲۳] پایین در بدن می‌باشد [۱۳]. برای‌این‌منظور، روش‌های مختلفی جهت بهبود خواص فارماکوکینتیک آن‌ها توسعه یافته است که به‌طورکلی، به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند [۱۴]: (۱) بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی قسمت قابل کریستاله‌شدن ایمنوگلوبولین‌ها[۲۴] که مسئول نیمه عمر پلاسمایی طولانی ایمنوگلوبولین ها و آلبومین در بدن می‌باشد و (۲) افزایش حجم هیدرودینامیکی[۲۵] که باعث کاهش نشت عروقی و همچنین کاهش پاکسازی کلیوی پروتئین می‌گردد. در جدول ۱، خلاصه‌ای از راهبردهای مورد استفاده جهت افزایش نیمه عمر پلاسمایی نانوبادی‌ها و سازوکار آن‌ها خلاصه شده است [۲۷-۱۵].

سازوکار بازگردش اندوزومی

نشان داده شده است که قسمت قابل کریستالیزه‌شدن ایمونوگلوبین‌ها و قسمت سوم انتهای کربوکسیل[۲۶] آلبومین با استفاده از سازوکار بازگردش اندوزومی، نقش مهمی در افزایش زمان ماندگاری این پروتئین ها در خون ایفا می‌نمایند [۲۸]. در این مکانیسم، پروتئین آلبومین و همچنین قسمت قابل کریستالیزه‌شدن ایمنوگلوبولین‌ها، به گیرنده نوزادی با میل تمایلی[۲۷] بالا که در سطح سلول‌های منوسیت[۲۸] یا سلول‌های اندوتلیال عروقی[۲۹] می‌باشند در شرایط اسیدی متصل می‌شوند و پروتئین دارویی اتصال یافته را از دسترس قرارگیری لایزوزوم‌های[۳۰] موجود در فضای اندوزومی محافظت می‌کند. این میل تمایلی اتصال در شرایط pH خنثی بسیار پایین بوده که سبب بازگردش مجدد این پروتئین‌ها به خون می‌شود. پروتئین‌هایی که توانایی اتصال به گیرنده نوزادی قسمت قابل‌کریستاله‌شدن ایمنوگلوبولین ها را ندارند در این سازوکار در لایزوزوم‌ها تخریب می‌شوند. با اتصال نانوبادی‌ها به این توالی‌ها، می‌توان ازطریق سازوکار مشابه، خواص فارماکوکینتیکی را بهبود بخشید (شکل ۲) [۲۹، ۱۴]. از مزایای این روش می‌توان به افزایش چند برابری نیمه عمر پروتئین در مقایسه با روش‌های دیگر اشاره نمود. بااین‌حال، اتصال پروتئین به قسمت قابل‌کریستالیزه‌شدن ایمونوگلوبین‌ها و آلبومین علاوه بر نیاز به بیان این پروتئین‌ها در سیستم‌های یوکاریوتی، سبب تغییرات در ساختار پروتئین به‌دلیل تاخوردگی نامناسب و همچنین تغییر خواص فیزیکوشیمیایی مانند نقطه ایزوالکتریک می‌شود. علاوه‌براین، قسمت قابل‌کریستالیزه‌شدن ایمونوگلوبین‌ها به‌دلیل وجود قند، موجب ایمنی‌زایی داروی نوترکیب نهایی می‌شود [۳۰، ۱۴].

[21] Volume of distribution (V_d)
[22] Terminal half-life ($T_{1/2}$)
[23] Mean Residence Time (MRT)
[24] Endosomal recycling of neonatal Fc receptor (FcRn)
[25] Hydrodynamic volume
[26] C-terminal DIII
[27] Affinity
[28] Monocyte cells
[29] Endothelial cells
[30] Lysosomes

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

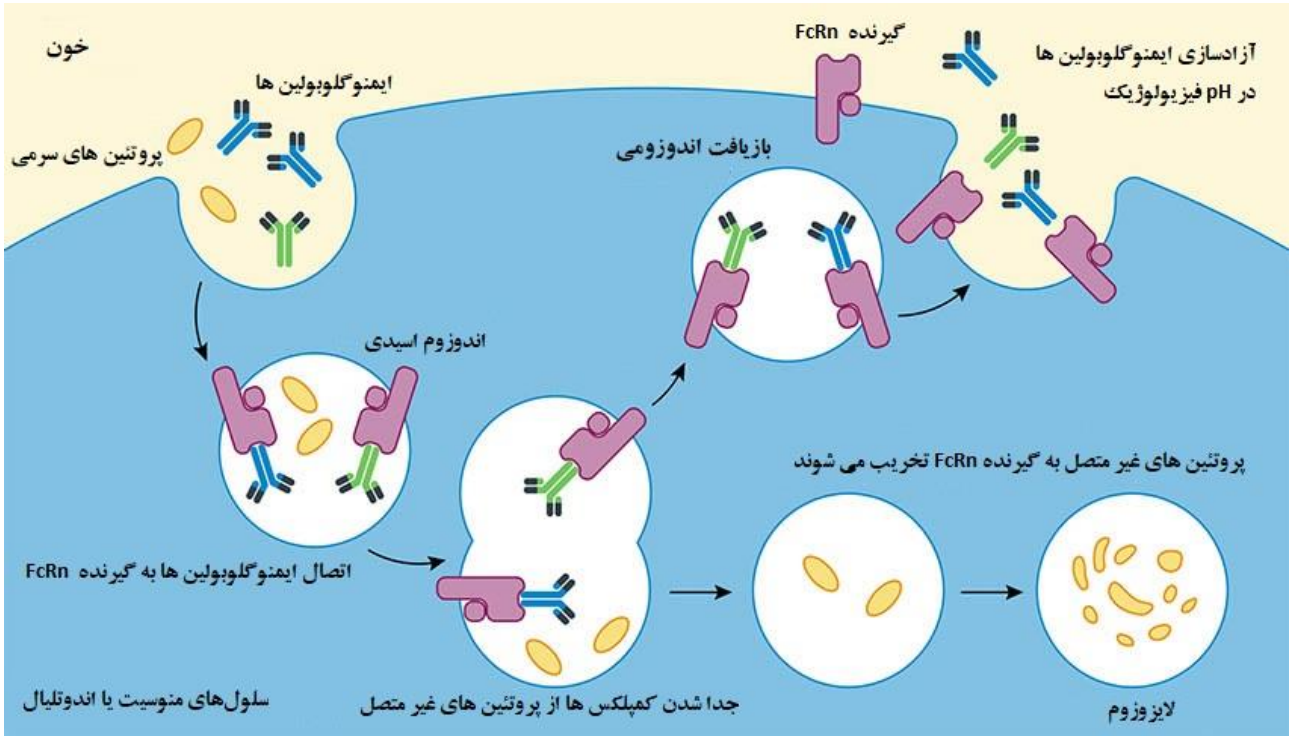
جدول ۱- راهبردهای مورد استفاده جهت افزایش نیمه عمر پلاسمایی نانوبادی‌ها

راهبرد	سازوکار	منبع
نانوبادی علیه آلبومین	فرآیند بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی قسمت قابل کریستالەشدن ایمنوگلوبولین‌ها	[۱۵-۱۸]
اتصال به قسمت قابل‌کریستالیزه‌شدن ایمنوگلوبولین‌ها	فرآیند بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی قسمت قابل کریستاله شدن ایمنوگلوبولین ها	[۱۹، ۲۰]
پگیلاسیون[31]	افزایش حجم هیدرودینامیکی	[۲۱، ۲۲]
پسیلاسیون[32]	افزایش حجم هیدرودینامیکی	[۲۳، ۲۴]
اتصال توالی دوتایی از نانوبادی	افزایش حجم هیدرودینامیکی	[۲۵-۲۷]

در مطالعات دیگر، محققان با استفاده طراحی و توسعه توالی‌های متصل‌شونده جدید مانند انواع نانوبادی‌ها، قطعات آنتی‌بادی و همچنین پروتئین‌های مهندسی‌شده، روش‌های جدیدی را با استفاده از همین سازوکار جهت بهبود خواص فارماکوکینتیک نانوبادی‌ها معرفی کرده‌اند. به‌طورمثال، هافمن[33] و همکارانش نشان دادند که اتصال نانوبادی‌ها به نانوبادی ضدآلبومین سبب کاهش ۳۷۶ برابری در پاکسازی[34] از خون شده و نیمه عمر نانوبادی را تا ۴/۹ روز در میمون نسبت به شکل غیرمتصل آن افزایش می‌دهد [۱۵]. در مطالعه‌ای دیگر، ونروی[35] و همکارانش در یک مطالعه پیش‌بالینی نشان دادند که اتصال نانوبادی ضدآلبومین به یک نانوبادی ضدگیرنده اینترلوکین شش[36]، منجر به افزایش نیمه عمر سرمی از ۴/۳ ساعت به ۶/۶ روز بعد از یک دُز تزریق داخل وریدی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در میمون های نژاد Cynomolgus می‌شود. لازم به ذکر است که کارایی این دارو هم اکنون در مطالعات بالینی در حال بررسی می‌باشد [۱۶]. در مطالعه‌ای جدید در سال ۲۰۲۲ که توسط خانم هامباچ[37] و همکارانش انجام گردید، یک دیابادی[38] ضد CD38 و CD16 به نانوبادی ضدآلبومین متصل و اثرات ضدسرطانی آن علیه رده‌های سلولی میلوما و همچنین نمونه‌های مغز استخوان انسان به‌صورت برون‌تنی بررسی گردید. آن‌ها اتصال نانوبادی را به آلبومین و همچنین CD38 و CD16 به روش فلوسایتومتری و بیولومینسانس تایید نمودند، بااین‌حال هنوز گزارشی در مورد بررسی بهبود خواص فارماکوکینتیک این فیوژن پروتئین در مدل‌های حیوانی توسط این گروه منتشر نشده است [۳۱]. با همین سازوکار، آنوردوربن[39] و همکارانش به طراحی و اتصال قسمت متصل شونده به ایمونوگلوبین از پروتئین استافیلوکوک آ به انتهای کربوکسیلی یک دیابادی[40] تک زنجیره‌ای دو ویژگی[41] پرداختند. نتایج آن‌ها افزایش نیمه عمر پلاسمایی را از حدود ۱/۵ ساعت در فرم طبیعی به ۱۱/۸ ساعت در فرم اتصال‌یافته نشان داد [۲۰]. مندروپ[42] و همکارانش با راهبرد اتصال توالی آلبومین انسانی مهندسی‌شده (که میل ترکیبی بالاتری به گیرنده نوزادی قسمت قابل کریستالەشدن ایمنوگلوبولین‌ها داشت) به ترکیب دوگانه قطعات متغیر تک‌زنجیره‌ای علیه گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و CD3[43] نشان دادند که نیمه عمر پلاسمایی این ترکیب از ۰/۶ ساعت به ۳۷ ساعت قابل افزایش می‌باشد [۱۷]. در تحقیق مشابهی، روتمن[44] و همکاران با اتصال قسمت قابل کریستالیزه‌شدن IgG1 به نانوبادی ضد آمیلوئید[45] بهبود قابل‌ملاحظه‌ای را در پارامترهای

[31] PEGylation
[32] PASylation
[33] Hoefman
[34] Clearance
[35] Van Roy
[36] IL-6R
[37] Hambach
[38] Diabody
[39] Unverdorben
[40] Diabody
[41] Bispecific single-chain diabody
[42] Mandrup
[43] Anti-EGFR nanobody-anti-CD3 scFv
[44] Rotman
[45] Anti-amyloid Nanobody-hIgG1-Fc

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ۲- افزایش نیمه‌عمر پلاسمایی ایمنوگلوبولین ازطریق سازوکار بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی قسمت قابل کریستاله‌شدن ایمنوگلوبولین‌ها. آلبومین نیز ازطریق اتصال قسمت سوم انتهای کربوکسیل خود به این گیرنده، نیمه‌عمر پلاسمایی بالایی دارد [۲۹].

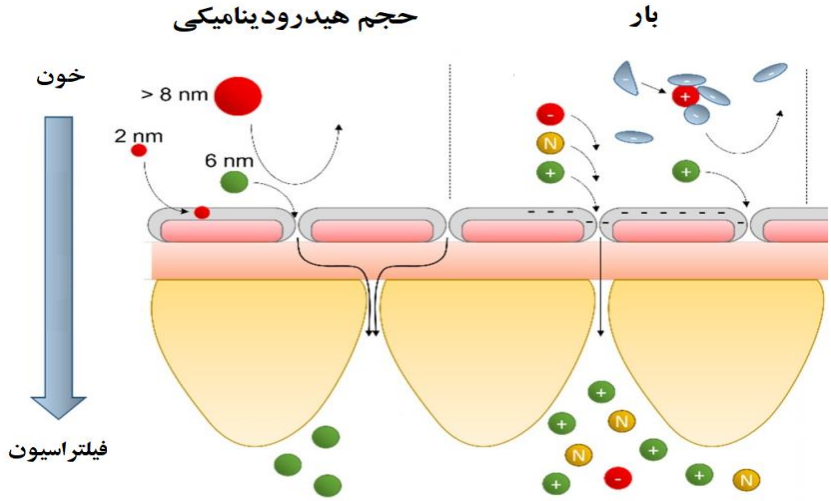
فارماکوکینتیک نانوبادی از قبیل حجم توزیع، پاکسازی کلیوی و غلظت حداکثر[۴۶] در خون مشاهده کردند [۱۹]. در مطالعه جدید در سال ۲۰۲۳ توسط آقای لیو[۴۷] و همکارانش، قسمت متصل‌شونده به ایمنوگلوبین مشتق‌شده از پروتئین جی استرپتوکوک به انتهای کربوکسیلی یک نانوبادی اختصاصی علیه CD70 وصل گردید. نتایج مطالعه فارماکوکینتیک پس از تزریق وریدی به موش‌های BALB/c یک افزایش ۳۹ برابری در نیمه عمر انتهایی به همراه افزایش چشمگیر در معیار سطح زیر منحنی[۴۸] از ۹۲۰ به ۳۲۵۶ را نشان داد [۱۸].

سازوکار افزایش حجم هیدرودینامیکی

مشخص شده است که اندازه منافذ گلومرولی[۴۹] در کپسول بومن[۵۰] کلیه انسان در حدود ۶۰ آنگستروم بوده و همچنین دارای بار سطحی کلی منفی به‌دلیل حضور پروتئوگلیکان‌های آنیونی موجود در ماتریکس خارج‌سلولی غشای پایه می‌باشند. بنابراین پروتئین‌های اسیدی بزرگ مانند آلبومین با قطر حدود ۹۰ آنگستروم[۵۱] و نقطه ایزوالکتریک[۵۲] حدود پنج (دارای بار منفی)، به‌مقدار کمتری ازطریق فیلتراسیون کلیوی[۵۳] از بدن دفع می‌گردند (شکل ۳) [۳۲]. بنابراین با سازوکار افزایش حجم هیدرودینامیکی می‌توان به کاهش میزان پاکسازی کلیوی و در نتیجه بهبود خواص فارماکوکینتیکی نانوبادی‌ها دست یافت. ازجمله این راهبردها می‌توان به اتصال شیمیایی با پلیمرهای مصنوعی، اتصال نوترکیب با پپتیدهای شبه‌پلیمری و تکرار دوتایی[۵۴] از توالی نانوبادی اشاره نمود که درادامه به‌طور مفصل توضیح داده خواهند شد [۱۴].

[46] Maximum concentration (C_{max})
[47] Liu
[48] Area Under Curve
[49] Glomerular pores
[50] Bowman's capsule
[51] Angstrom
[52] Isoelectric point
[53] Renal filtration
[54] Dimerization

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ۳- فیلتراسیون کلیوی پروتئین‌ها در گلومرول‌های کلیه تابعی از اندازه (حجم هیدرودینامیکی) و بار آن‌ها می‌باشد [۲۶]. حرف N تعداد تکرار از توالی‌ها را نشان می‌دهد[۳۲].

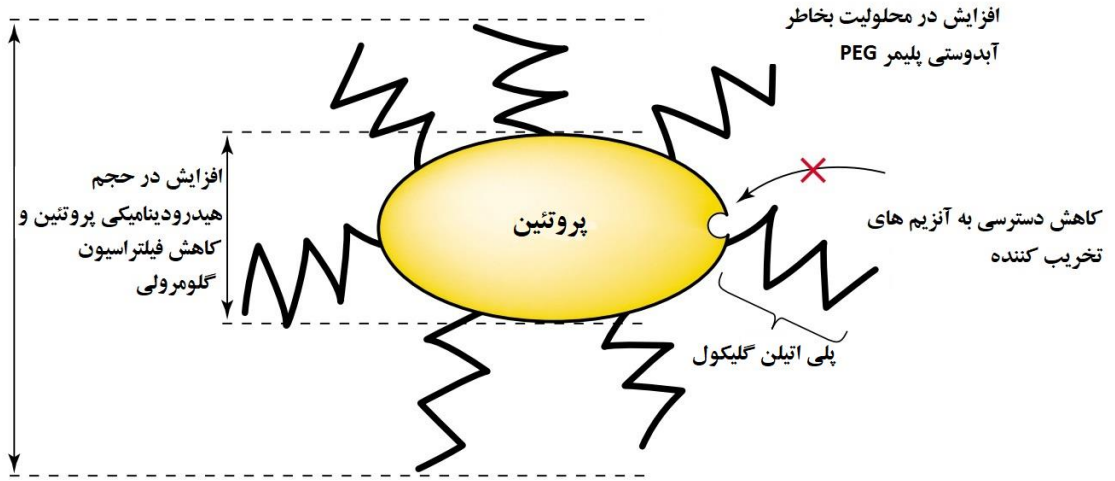
پگیلاسیون[55]

یک راهبرد جهت افزایش نیمه عمر با استفاده از افزایش حجم هیدرودینامیکی، اتصال شیمیایی نانوبادی‌ها به پلیمر مصنوعی پلی‌اتیلن‌گلیکول[56] می‌باشد [۳۳]. این فناوری به‌طورکلی، یک روش پذیرفته‌شده جهت افزایش نیمه عمر پروتئین‌ها می‌باشد و بطوری‌که چندین داروی از این دسته در بازار موجود می‌باشند. این پلیمر با تشکیل ساختارهای مارپیچ تصادفی[57] و همچنین حلالیت ذاتی بالا، منجر به افزایش حجم هیدرودینامیکی زیست‌ملکول‌های فعال دارویی شده و در نتیجه سبب کاهش فیلتراسیون کلیوی آن‌ها می‌گردد [۳۴]. ازآنجایی‌که این پلیمر بسیار هیدروفیل می‌باشد، وزن ملکولی پروتئین‌های پگیله ازطریق اتصال به ملکول‌های آب به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد بطوری‌که معمولا وزن کلی نانوبادی پگیله از وزن مجموع پلیمر و نانوبادی نیز بسیار بیشتر است. مکان اتصال پلیمر، طول و تعداد زنجیره‌های جانبی آن، در تعیین تاثیر این پلیمر بر فعالیت زیستی نانوبادی بسیار مهم است [۳۵]. همچنین این پلیمر با ایجاد ممانعت فضایی مانع از تخریب پروتئین دارویی توسط پروتئازهای خون می‌گردد. علاوه بر این، به‌دلیل جذب آب محلولیت پروتئین‌های دارویی آبگریز را نیز افزایش می‌دهد (شکل ۴) [۳۶].

بااین‌حال، این فناوری با محدودیت‌هایی نیز همراه است که می‌توان به ضرورت انجام یک یا چند واکنش شیمیایی اضافه در مراحل تولید، مراحل خالص‌سازی بیشتر در فرآیندهای پایین دستی، تغییرات نامطلوب بر روی پروتئین مورد نظر مانند کاهش فعالیت بیولوژیکی[58] و تغییر نقطه ایزوالکتریک، قیمت بالای پلیمرهای فعال‌شده و ناهمگونی[59] ذاتی آن‌ها و مشکلات مرتبط در آنالیز فرم‌های پگیله، افزایش ویسکوزیته[60] محلول به‌دلیل اتصال پلیمر و به‌تبع‌آن مشکلات در هنگام تزریق این فرآورده، وجود شواهدی بر ایمن‌زابودن و عدم‌تجزیه این پلیمر در بدن که منتهی به جمع شدن در بافت‌هایی همچون بافت کلیه و تشکیل کیسه‌های واکوئلی در آن‌ها خواهد شد اشاره نمود. معمولاً واکنش اتصال پلیمر به پروتئین دارویی مرحله‌ای ظریف و حساس بوده که نیاز به اطلاعات کافی از خصوصیات فیزیکو-شیمیایی پروتئین مورد نظر دارد. علاوه‌براین، واکنش اتصال و بهینه‌سازی شرایط آن، زمانبر و به مقدار زیادی از پروتئین اولیه با خلوص بالا نیاز دارد [۲۴]. از مطالعات انجام‌شده جهت افزایش نیمه عمر نانوبادی‌ها با این روش، می‌توان به مطالعات گسترده وگمیستر[61] و همکارانش اشاره نمود. در این مطالعات، پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول با طول‌های مختلف و حالت‌های خطی و شاخه‌دار جهت بهبود خواص فارماکوکنتیکی[62] نانوبادی علیه

[55] PEGylation
[56] Polyethylene glycol (PEG)
[57] Random coil
[58] Bioactivity
[59] Polydispersity
[60] Viscosity
[61] Vugmeyster
[62] Pharmacokinetics properties

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ٤- سازوکارهای پلیمر پلی‌اتیلن‌گلیکول جهت بهبود خواص فارماکوکینتیک پروتئین‌های دارویی [۳۶].

فاکتور نکروز تومور[۶۳] در موش نژاد B6CBAF1/J، رت نژاد Sprague–Dawley و میمون نژاد Cynomolgus، استفاده شد. نتایج این مطالعات نشان داد که پارامترهای فارماکوکینتیکی در اثر اتصال پلیمر پلی‌اتیلن‌گلیکول ۲۰ کیلودالتونی دوشاخه‌ای، به مقدار بیشتری نسبت به سایر پلیمرهای دیگر ازجمله پلیمرهای خطی و کوتاه، افزایش می‌یابد [۲۲]. درمطالعه‌ای‌دیگر، پن[۶۴] و همکارانش به پگیلاسیون یک آنتی بادی دو ویژگی متشکل از قسمت کریستالیزه‌شونده علیه CD3 و نانوبادی علیه آنتی‌ژن کارسینومبریونیک[۶۵] پرداختند که نتایج آن‌ها نشان‌دهنده افزایش ۱۲ برابری در نیمه عمر پلاسمایی فرم پگیله نسبت به فرم غیرپگیله بود [۲۱].

پپتیدهای شبه‌پلیمری

به‌طورعمده، پلی‌پپتیدهایی که از آمینواسیدهای طبیعی ساخته شده‌اند چندین مزیت را نسبت به پلی‌مرهای شیمیایی نظیر پلی‌اتیلن گلیکول دارند. نخست، آنها توسط پروتئازها[۶۶] تجزیه‌پذیر هستند که درنتیجه، سمیت پلیمر و یا تجمع در اندام‌ها (ازجمله کلیه، طحال و یا کبد) و یا در سلول‌ها (به‌خصوص در ماکروفاژها) قابل انتظار نیست. ثانیاً، توالی آمینواسیدی به‌صورت ژنتیکی می‌تواند رمزدهی شود و بنابراین پروتئین فعال دارویی می‌تواند به‌طورمستقیم، دراثر ترجمه پروتئین نوترکیب اتصال‌یافته به توالی آمینواسیدی با استفاده از مهندسی ژنتیک تولید شود. درنتیجه، فیوژن پروتئین حاصل که دارای یک قسمت تاخورده[۶۷] و یک بخش بدون تاخوردگی می‌باشد، می‌تواند در یک مرحله در میزبان‌های میکروبی به‌صورت محلول تولید شود. ایده استفاده از توالی‌های پپتیدی تکراری فاقد ساختار جهت افزایش نیمه عمر پلاسمایی با مطالعه آنزیمی به‌نام ترانس سیالیداز[۶۸] (در انگل *تریپانوزوما کروزی*[۶۹]) دارای توالی‌های تکراری ۱۲تایی شروع شد. آنزیم ترانس سیالیداز محتوی یک قسمت فعال با ۶۸۰ آمینواسید می‌باشد که به‌وسیله یک قسمت تکراری در انتهای کربوکسیلی به‌نام SAPA ادامه می‌یابد که خود از تکرارهای ۱۲تایی آمینواسیدی تشکیل شده است. مطالعات فارماکوکینتیک در موش نشان داد که ترانس‌سیالیداز طبیعی که دارای ۱۳ تکرار از توالی DSSAHSTPSTPA می‌باشد پنج برابر نیمه عمر پلاسمایی طولانی‌تری نسبت به آنزیم نوترکیبی که این توالی از آن حذف شده بود را دارا می‌باشد [۳۷]. همچنین بار کلی منفی این توالی ازطریق دافعه الکتروستاتیکی با غشای پایه گلرومرولی، فرآیند فیلتراسیون کلیوی این پروتئین را به تعویق می‌اندازد. اما به‌دلیل ایمنی‌زایی بالای این توالی، امکان استفاده آن‌ها در پروتئین‌های دارویی وجود نداشت [۳۹، ۳۸]. این

[63] Tumor necrosis factor (TNF)
[64] Pan
[65] anti-CEA Nanobody/CD3 Fab bispecific antibody
[66] Proteases
[67] Folded
[68] Trans-sialidase
[69] *Trypanosoma cruzi*

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

مشکل به‌وسیله مهندسی پروتئین و طراحی یک توالی مشتق از SAPA که ایمنی‌زایی بسیار پایینی را داشت و درعین‌حال قادر به حفظ ویژگی افزایش نیمه عمر پلاسمایی بود برطرف شد. مطالعات متعددی دیگری برای طراحی و ارزیابی توالی‌های جدید صورت پذیرفته است که به‌طورخلاصه در جدول ۲ آورده شده‌اند [۴۶-۴۰، ۱۴، ۱۲].

پلیمرهای شبه‌ژلاتین

پلی پپتیدهای شبه ژلاتین، حاوی تکرارهای $Gly\text{-}X_{aa}\text{-}Y_{aa}$ بوده که در آن، X_{aa} اغلب پرولین و Y_{aa} اغلب هیدروکسی‌پرولین می‌باشد. سوکسینیله‌شدن[۷۰] طبیعی ژلاتین در سلول ازطریق گروه آمینوی ابسیلون[۷۱] آمینواسید لایزین باعث افزایش آب دوستی این پلیمر و کاهش نقطه ایزو الکتریک[۷۲] آن می‌شود. همچنین نیروی دافعه الکتروستاتیکی[۷۳] میان بارهای منفی گروه‌های کربوکسیل در زنجیره‌های جانبی این پلیمر باعث افزایش حجم ملکول به‌صورت ساختار مارپیچ تصادفی می‌شود. بنابراین، ژلاتین سوکسینیله‌شده یک ملکول ایده‌ال برای استفاده در افزایش نیمه عمر پلاسمایی داروهای نوترکیب دارویی که قابلیت تحمل در انسان را هم دارد، شده است [۴۲].

پلیمرهای شبه‌الاستین

الاستین پروتئین تشکیل‌دهنده ماتریکس خارج سلولی[۷۴] بسیاری از بافت‌ها نظیر پوست می‌باشد. این پروتئین از پیش‌ساز تروپوالاستین[۷۵] که از قسمت‌های تکراری آبدوست غنی از لایزین و آلانین و یک قسمت آبگریز الاستومریک[۷۶] می‌باشد، تشکیل شده است. پلیمرهای شبه الاستین از تکرارهای VPGXG تشکیل شده‌اندکه X می‌تواند هر آمینواسیدی به‌غیراز پرولین باشد [۴۸، ۴۷]. بااینحال مطالعات نشان داده‌اند که اتصال پروتئین‌های دارویی به پلیمرهای شبه الاستین منجربه تجمع[۷۷] پروتئین در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد (دمای بدن)، تخریب توسط پروتئازهای داخل‌سلولی و کاهش فعالیت زیستی می‌شود [۴۹].

توالی‌های غنی از گلایسین

توالی‌های غنی از گلایسین در محلول‌های آبی فاقد ساختار ثانویه می‌باشند [۵۰]. چون تکرارهای تشکیل‌یافته از آمینواسید گلایسین حلالیت پروتئین را کاهش می‌دهند، بنابراین در این توالی‌ها از آمینواسید سرین به‌منظور ایجاد پیوند هیدروژنی با ملکول‌های آب و افزایش حلالیت استفاده شده است. بااین‌حال، تکرارهای طولانی از این آمینواسیدها سبب افزایش تجمع و رسوب پروتئین دارویی می‌شود، به‌طوری‌که توالی‌های تکراری بیش از ۲۰۰ تکرار آن قابل‌استفاده نیست و درنتیجه، استفاده از این توالی‌ها را در بالین محدود می‌نماید [۱۴].

توالی ایکس تن

این توالی پلی‌پپتیدی از آمینواسیدهای غیرتکراری بدون ساختار از گلاسین، آلانین، تیروزین، سرین، فنیل‌آلانین و گلوتامیک اسید تشکیل شده است که تحت مالکیت شرکت Amunix می‌باشد. در این ساختار، از آمینواسیدهای هیدروفوب مانند تریپتوفان، لوسین، ایزولوسین و والین که منجر به تجمع پروتئین[۷۸] و تحریک سیستم ایمنی می‌شوند، اجتناب شده است. نشان داده شده است که تکرارهای توالی PESTAG سبب کاهش تجمع، افزایش حلالیت و افزایش پایداری پروتئین در برابر دما می‌شوند [۵۱، ۲۸]. بااین‌حال این توالی اغلب موجب کاهش فعالیت زیستی پروتئین دارویی می‌شود. در این فناوری، به‌دلیل حضور آمینواسید گلوتامیک اسید، افزایش نیمه عمر پلاسمایی پروتئین دارویی با القاء بار منفی علاوه بر سازوکار افزایش حجم هیدرودینامیکی نیز صورت می‌گیرد [۲۸].

توالی پاس

مطالعات نشان داده اند که توالی‌های تکراری از سه آمینواسید کوچک پرولین، آلانین و سرین (به‌اختصار پاس) منجربه ساخت پلی‌پپتیدهای آبدوست طولانی با حلالیت بالا می‌شود که دارای ویژگی‌های بیوفیزیکی مانند حجم هیدرودینامیکی بالا و تشکیل ساختارهای مارپیچ تصادفی مشابه با پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول می‌باشند. برای طراحی این توالی از آلفا-ال آمینواسیدهای

[70] Succinylation
[71] Amino-epsilon
[72] Isoelectric point
[73] Electrostatic repulsion
[74] Extracellular matrix (ECM)
[75] Tropoelastin
[76] Elastomeric
[77] Aggregation
[78] Aggregation

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

جدول ۲- پپتیدهای شبه پلیمری مورد استفاده برای افزایش نیمه‌عمر پروتئین‌های نوترکیب دارویی

پپتید شبه‌پلیمری	ترکیب آمینواسیدی	منبع
SAPA تکرارهای	(SSAHSTPSTPA)n	[۴۰، ۴۱]
پلیمرهای شبه‌ژلاتین[۷۹]	(GXZ)n	[۱۲، ۴۲]
پلیمرهای شبه‌الاستین[۸۰]	(VPGXG)n	[۱۴، ۴۳]
توالی‌های غنی از گلایسین[۸۱]	(GGGGS)n	[۴۴]
توالی ایکس تن[۸۲]	P,E,S,T,A,G	[۴۵]
توالی پاس[۸۳]	P, A, S	[۴۶]

آبدوست[۸۴] استفاده شده است. جهت ایجاد ساختار مارپیچ تصادفی، آمینواسیدهای طوری انتخاب شدند که زنجیره‌های جانبی آن‌ها تمایل پایینی برای واکنش درون‌ملکولی با دیگر آمینواسیدهای در پلی‌پپتید داشته باشند. بنابراین تمام آمینواسیدهای آبگریز، آمینواسیدهای دارای بار در زنجیره جانبی مانند آسپاراژین و گلوتامین به‌دلیل تمایل به تشکیل ساختارهای خودتجمعی[۸۵] و همچنین نقش آن‌ها در ایجاد برخی بیماری‌ها مانند هانگینتون[۸۶] حذف شدند. آمینواسید هیستیدین به‌دلیل توانایی اتصال به فلز و آمینواسیدگلایسین به‌دلیل حلالیت پایین حذف شدند. درنهایت، سه آمینواسید پرولین، آلانین و سرین به‌دلیل خاصیت هیدروفیلی بالا در ترکیب با یکدیگر و با نسبت‌های خاص انتخاب شدند. علاوه‌براین وجود گروه ایمینواسید[۸۷] در آمینواسید پرولین به‌دلیل ایزومریزاسیون سیس-ترانس[۸۸] باعث افزایش درجه آزادی و افزایش آنتروپی[۸۹] در کانفورماسیون اسکلت[۹۰] پروتئین‌های تانخورده[۹۱] می‌شود. در روش پسیلاسیون توالی نوکلئوتیدی متشکل از تکرارهای ۱۰۰-۶۰۰ آمینواسیدی پرولین، آلانین و سرین به پروتئین موردنظر به‌صورت ژنتیکی متصل‌شده و بعد از واردنمودن در وکتور بیانی[۹۲] مناسب، پروتئین موردنظر بدون نیاز به فرآیندهای پایین‌دستی طولانی و دشوار در مقایسه با روش پگیلاسیون بدست می‌آید. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که با اتصال توالی پاس به پروتئین، مدت زمان ماندگاری در پلاسما از ۱۰ الی ۱۰۰ برابر افزایش میابد به‌طوری‌که هر چه قدر طول این توالی بیشتر باشد مدت زمان ماندگاری در خون نیز بیشتر خواهد بود [۵۲] (شکل ۵).

توالی پاس می‌تواند از قسمت انتهای آمینی، انتهای کربوکسیلی و یا هر دو سمت به پروتئین دارویی متصل شود که این امر بر اساس مناطق درگیر در برهمکنش با گیرنده تعیین می‌گردد [۴۶]. از دیگر مزایای این توالی تکراری می‌توان به فقدان خاصیت ایمنی‌زایی، عدم‌تغییر قابل‌ملاحظه در نقطه ایزوالکتریک نانوبادی، عدم‌تجمع در کلیه و مقاوم‌بودن این توالی نسبت به پروتئازهای پلاسما اشاره کرد [۴۶]. ثبت اختراع این فناوری در سال ۲۰۱۱ تحت مالکیت شرکت XL-protein GmbH انجام شده و اکنون برای پروتئین‌های درمانی مختلف در فازهای پیش‌بالینی تحت بررسی می‌باشند. در دو مطالعه‌ای که در آزمایشگاه گروه ما بروی نانوبادی‌ها انجام شد، میزان بهبود خواص فارماکوکینتیک نانوبادی علیه فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی با استفاده از روش پسیلاسیون بررسی

[79] Gelatin-like polymers
[80] Elastin-like polymers
[81] Glycine Rich Homo Amino acids (HAP)
[82] X-TEN
[83] PAS sequence
[84] Hydrophilic alpha-L- amino acids
[85] Self-assembly
[86] Huntington's disease
[87] Imino-acid groups
[88] Cis -trans isomerization
[89] Entropy
[90] Back-bone conformation
[91] Unfolded-proteins
[92] Expression vector

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

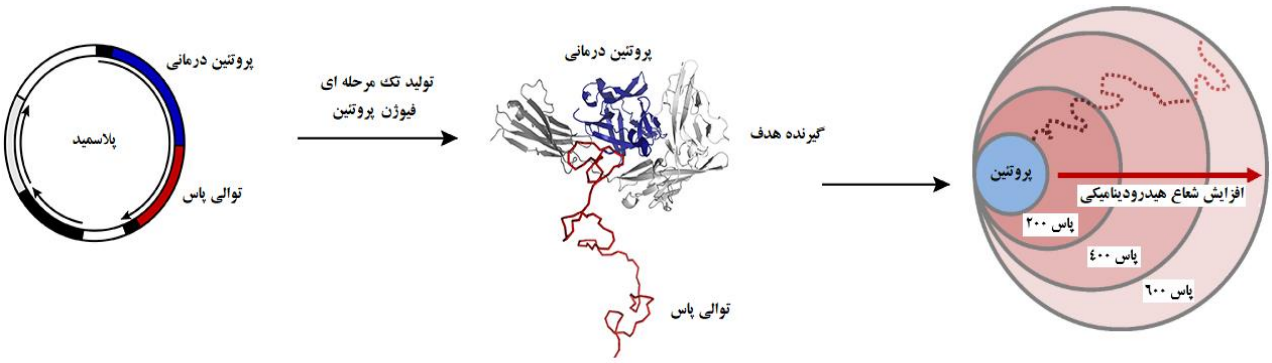
گردید. هر دو مطالعه نشان داد که نیمه عمر سرمی نانوبادی در اثر اتصال توالی پاس شماره یک با تکرار ۲۰۰ تایی و توالی جدید پاس ۲۰۸ حدود ۱۴ برابر افزایش می‌یابد [۱۴، ۷]. علاوه‌براین، نتایج ایزوالکتروفوکوسینگ[93] نشان داد که تغییری در بار نانوبادی و حرکت آن در میدان الکتریکی وجود ندارد. این ویژگی‌ها، یعنی عدم‌تاثیر توالی پاس بر روی بار نانوبادی یکی دیگر از مزایای این پلی‌پپتید می‌باشد [۳۱]. همچنین مطالعات ساختار ثانویه نشان‌دهنده افزایش در ساختار مارپیچ تصادفی در فرم پسیله نانوبادی بود که تاییدکننده انعطاف پذیری توالی پاس و افزایش بیش‌ازحدمعمولِ حجم ماکروملکول در مقایسه با نانوبادی غیرپسیله می‌باشد. نتایج بررسی میل تمایلی به روش رزونانس پلاسمون سطحی[94] نیز نشاندهنده عدم‌تغییر در ثابت اتصال نانوبادی[95] به گیرنده خود بعد از اتصال به توالی پاس بود. این پدیده بسیار قابل‌تامل بوده، زیرا مانع کاهش فعالیت زیستی نانوبادی بعد از اتصال به توالی پپتیدی پاس می‌شود. هر دو مطالعه نشان داد که نانوبادی‌های متصل به توالی پاس شماره یک با تکرار ۲۰۰ تایی و توالی پاس ۲۰۸ می‌توانند به‌طور مساوی و مشابه با پروتئین طبیعی از تکثیر سلول‌های سرطان سینه (MDA-MB-231) که گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی شماره دو[96] را بر روی سطح شان بیان می‌کنند، جلوگیری می‌کنند [۵۴، ۵۳].

تکرار چندتایی از توالی نانوبادی

تکرار دوتایی[97] یا چند تایی (چند ظرفیتی)[98] از توالی نانوبادی، روش دیگری است که ازطریق افزایش حجم هیدرودینامیکی، منجربه افزایش نیمه عمر پلاسمایی می‌شود. این روش شامل اتصال دو یا چند نانوبادی یکسان یا ناهمگون به یکدیگر و یا به یک پروتئین که توانایی تشکیل ساختارهای فراملکولی[99] را دارد ازطریق ژنتیکی انجام می‌پذیرد. این اتصال درنهایت به‌دلیل افزایش حجم هیدرودینامیکی مولکول، سبب افزایش نیمه عمر پلاسمایی نانوبادی مورد نظر می‌گردد. در مطالعه‌ای که در گروه ما انجام شد، بااستفاده‌از روش اتصال دو قطعه نانوبادی ضد فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی، پارامترهای فارماکوکینتیک بررسی گردید. در این مطالعه، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی[100] نشان داد که تکرار دوتایی نانوبادی پایداری ساختاری خوبی در حلال آب دارد. مطالعات فیزیکوشیمیایی افزایش دو برابری در حجم هیدرودینامیکی تکرار دوتایی نانوبادی را در مقایسه با کنترل نشان داد. به‌طورجالب‌توجه، تکرار دوتایی نانوبادی و نانوبادی تنها یک فعالیت یکسان ضدتکثیر وابسته به دز[101] را در سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان[102] نشان دادند. درنهایت، مطالعه فارماکوکینتیک نشان داد که نیمه عمر انتهایی تکرار دوتایی نانوبادی تقریباً ۲ برابر و همراه با کاهش میزان پاکسازی کلیوی پس از تزریق داخل وریدی پروتئین‌ها در موش BALB/c می‌باشد [۲۵]. در مطالعه‌ای که در مجله معتبر Nature در سال ۲۰۲۰ چاپ گردید، آقای ورمیر[103] و همکارانش بااستفاده‌از اتصال چهارظرفیتی یک نانوبادی بر علیه گیرنده ۵ ضدمرگ[104] به غلظت پلاسمایی حداکثر ۵۴ نانوگرم بر میلی لیتر دست یافتند که در طول ۱۲ هفته پایش، غلظت آن در خون بالای ۲۴ نانوگرم در میلی‌لیتر باقی ماند. علاوه‌براین، اتصال این نانوبادی چهارظرفیتی به نانوبادی متصل‌شونده به آلبومین منجربه دستیابی به غلظت پلاسمایی حداکثر ۷/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد [۲۷]. در مطالعه‌ای منحصر بفرد، آقای فان[105] و همکارانش با استفاده از پروتئین فریتین[106] که قادر به تشکیل ساختارهای فراملکولی بود، منجربه افزایش میل تمایلی به آنتی‌ژن H5N1 و همچنین افزایش نیمه عمر پلاسمایی آن به‌طور همزمان گردید. تزریق داخل وریدی غلظت‌های یکسان از پروتئین‌های نشاندار شده با FITC[107] به موش‌های سالم، نیمه عمر انتهایی ۳۳/۵۴ دقیقه را برای نانوبادی و ۳۲۶/۳ دقیقه را برای فنوبادی[108] نشان داد. بررسی داده‌ها حاکی از افزایش تقریبا تقریباً ۱۰ برابری در نیمه عمر پلاسمایی پروتئین دارای ساختار فراملکولی بود [۲۶].

[93] Isoelectric focusing
[94] Surface plasmon resonance (SPR)
[95] Equilibrium constant (KD)
[96] Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)
[97] Dimer
[98] Multivalent
[99] Supramolecular structures
[100] Molecular dynamics simulation
[101] Dose-dependent
[102] Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)
[103] Vermeire
[104] Anti-death receptor 5 nanobody
[105] Fan
[106] Ferritin
[107] Fluorescein isothiocyanate
[108] Fenobody

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ۵- مراحل تولید پروتئین متصل به توالی پاس به‌منظور افزایش زمان ماندگاری پروتئین دارویی در خون. ابتدا توالی پاس به‌صورت ژنتیکی به توالی پروتئین دارویی متصل و در وکتور بیانی کلون می‌گردد. سپس سازه بیانی در سلول پروکاریوتی و یا یوکاریوتی بیان می‌شود. توالی پاس متصل‌شده پس از تزریق دارو در بدن، منجر به افزایش حجم هیدرودینامیکی و درنتیجه منجر به افزایش زمان ماندگاری پروتئین دارویی در خون می‌شود [۴۶].

آینده‌نگری

همانگونه که ذکر شد یکی از مهمترین مشکلات نانوبادی‌ها خواص فارماکوکینتیکی ضعیف به‌ویژه نیمه عمر سرمی پایین آن‌ها بوده که راهکارهایی جهت غلبه بر این محدودیت توسط شرکت‌های داروسازی پیشنهاد شده است. به‌صورت تجاری، شرکت Ablynx با اتصال نانوبادی به آلبومین، شرکت Pfizer با استفاده از فناوری پگیلاسیون، شرکت Amunix با استفاده از فناوری ایکس تن و شرکت XL-protein GmbH بااستفاده‌از فناوری پسیلاسیون درحال‌توسعه پروتئین‌های درمانی جدید با خواص فارماکوکینتیکی بهبودیافته می‌باشند. ازآنجایی‌که نانوبادی ها با نام فناوری NANOBODY® تحت مجوز شرکت Ablynx و هولدینگ Sanofi هستند، این شرکت با همکاری و تامین مالی سایر شرکت‌ها و بااستفاده‌از فناوری‌های ذکرشده مانند اتصال به آلبومین، نانوبادی علیه آلبومین، پگیلاسیون و چندظرفیتی‌کردن، درحال‌توسعه نانوبادی‌های درمانی جدید با خواص فارماکوکینتیکی بهبودیافته در فازهای مختلف مطالعات بالینی می‌باشد. جدول ۳، نانوبادی‌هایی که ازطریق دو مکانیسم بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی و افزایش حجم هیدرودینامیکی وارد فازهای مطالعات بالینی شده و یا تایید گردیده‌اند را به‌طورخلاصه نشان می‌دهد.

همانطورکه در جدول ۳ مشاهده می‌شود، از لحاظ هزینه تولید، فرآیندهای پایین دستی، آزمون‌های کنترل کیفی و همچنین عوارض جانبی احتمالی، استفاده از چندظرفیتی‌کردن و پپتیدهای شبه‌پلیمری افق جدیدی را در افزایش نیمه عمر پلاسمایی نانوبادی‌ها باز کرده‌اند. البته ذکر این نکته ضروری می‌باشد ازآنجایی‌که این توالی‌ها تکراری هستند، نیاز به مهندسی و توسعه میزبان‌های بیانی پروکاریوتی و یوکاریوتی دارای مقادیر بالای اسید ریبونوکلئیک‌های انتقال‌دهنده[۱۰۹] آمینواسیدهای تکراری و همچنین محیط کشت‌های اختصاصی در مقیاس صنعتی ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشگاه علوم پزشکی کاشان و انستیتو پاستور ایران به دلیل حمایت از این مطالعه تشکر می نمایند.

ملاحظات مالی

ندارد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ف.خ.: نگارش مقاله، م.س.: نگارش مقاله، ر.آ.ک.: نگارش، ویرایش و اصلاح مقاله.

[109] Transfer ribonucleic acid (tRNA)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

جدول ۳- فهرست نانوبادی‌هایی که خواص فارماکوکینتیکی آن‌ها ازطریق دو سازوکار بازگردش اندوزومی گیرنده نوزادی و افزایش حجم هیدرودینامیکی بهبود یافته و وارد مراحل مختلف مطالعات بالینی شده و یا تایید گردیده‌اند

اسم ترکیب	بیماری	پروتئین هدف	ساختار نانوبادی	مرحله بالینی	منبع
ALX-0061	آرتریت روماتوئید	گیرنده اینترلوکین ۶	نانوبادی دو ظرفیتی متصل به آلبومین	۲	[۵۵]
ALX-0061	لوپوس اریتماتوسوس سیستمیک	گیرنده اینترلوکین ۶	نانوبادی دو ظرفیتی متصل به آلبومین	۲	[۵۶]
ATN-103	آرتریت روماتوئید	فاکتور نکروز تومور	نانوبادی سه ظرفیتی متصل به آلبومین	۲	[۵۷]
ALX-0761	پسوریازیس	اینترلوکین ۱۷ نوع A و F	نانوبادی دو ویژگی سه ظرفیتی	۲	[۵۸]
ALX-0761	پسوریازیس	اینترلوکین ۱۷ نوع A و F	نانوبادی متصل به آلبومین		
M1095	پسوریازیس	اینترلوکین ۱۷ نوع A و F	نانوبادی دو ویژگی دو ظرفیتی		
Caplacizumab	پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک	فاکتور فون ویلبراند	نانوبادی تک ویژگی دو ظرفیتی	تایید	[۵۹]
ALX-0171	عفونت ویروس سنسیشیال تنفسی	گلیکوپروتئین همجوشی ویروس سنسیشیال تنفسی	نانوبادی تک ویژگی سه ظرفیتی	۲	[۶۰]
ALX-0651	افراد سالم	گیرنده کموکاین C-X-C نوع ۴	نانوبادی دو ویژگی دو ظرفیتی	۱	[۶۱]
BI836880	تومورهای جامد	آنژیوپویتین/ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی	نانوبادی دو ویژگی دو ظرفیتی	۱	[۶۲]
KN046	سرطان ریه غیرسلولی سنگفرشی	لیگاند مرگ برنامه‌ریزی‌شده ۱/ پروتئین مرتبط با لنفوسیت T سیتوتوکسیک ۴	نانوبادی دو ویژگی چهار ظرفیتی	۳	[۶۳]
KN046	کارسینوم کبدی پیشرفته	لیگاند مرگ برنامه‌ریزی‌شده ۱/ پروتئین مرتبط با لنفوسیت T سیتوتوکسیک ۴	نانوبادی دو ویژگی چهار ظرفیتی	۱	[۶۴]
KN035	کارسینوم سلول‌های کبد	لیگاند مرگ برنامه‌ریزی‌شده ۱	نانوبادی تک ویژگی دو ظرفیتی	۱	[۶۵]
M6495	آرتروز علامت‌دار زانو	متالوپپتیداز آدام با ترومبوسپوندین۱ نوع ۱ موتیف ۵	نانوبادی دو ویژگی دو ظرفیتی	۲	[۶۶]
PF-05230905	آرتریت روماتوئید	فاکتور نکروز تومور آلفا	نانوبادی دو ظرفیتی پگیله‌شده	۱	[۶۷]

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

فهرست منابع

[1] Grilo AL, Mantalaris A, The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. ***Trends Biotechnol*** 37 (2019) 9-16.

[2] Jin S, Sun Y, Liang X, Gu X, Ning J, Xu Y, Chen S, Pan L, Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. ***Signal Transduct Target Ther*** 7 (2022) 39.

[3] Pirkalkhoran S, Grabowska WR, Kashkoli HH, Mirhassani R, Guiliano D, Dolphin C, Khalili H, Bioengineering of Antibody Fragments: Challenges and Opportunities. ***Bioengineering*** 10 (2023) 122.

[4] Nelson AL, Antibody fragments: hope and hype. In: MAbs, Taylor & Francis, 2010: 77-83.

[5] Herrington-Symes AP, Farys M, Khalili H, Brocchini S, Antibody fragments: Prolonging circulation half-life special issue-antibody research. ***Adv Biosci Biotechnol*** 4 (2013) 689-698.

[6] Mei Y, Chen Y, Sivaccumar JP, An Z, Xia N, Luo W, Research progress and applications of nanobody in human infectious diseases. ***Front pharmacol*** 13 (2022) 963978.

[7] Asaadi Y, Jouneghani FF, Janani S, Rahbarizadeh F, A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. ***Biomark Res*** 9 (2021) 1-20.

[8] Mendoza MN, Jian M, King MT,Brooks CL, Role of a noncanonical disulfide bond in the stability, affinity, and flexibility of a VHH specific for the Listeria virulence factor InlB. Protein Sci 29(2020) 1004-1017.

[9] Berland L, Kim L, Abousaway O, Mines A, Mishra S, Clark L, Hofman P, Rashidian M, Nanobodies for medical imaging: about ready for prime time? ***Biomolecules*** 11 (2021) 637.

[10] Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I, Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. ***Virol J*** 9 (2012) 9.

[11] Sun S, Ding Z, Yang X, Zhao X, Zhao M, Gao L, Chen Q, Xie S, Liu A, Yin S, Nanobody: a small antibody with big implications for tumor therapeutic strategy. ***Int J Nanomedicine*** 16 (2021) 2337-2356.

[12] Hutanu D, Darie C, Trends in characterization of PEGylated proteins by mass spectrometry. ***Mod Chem Appl*** 2 (2014) 10.4172/2329-6798.1000128.

[13] Kontermann RE, Alternative antibody formats. ***Curr Opin Mol Ther*** 12 (2010) 176-183.

[14] Kontermann R, Therapeutic proteins: strategies to modulate their plasma half-lives. John Wiley & Sons, 2012: 1-70.

[15] Hoefman S, Ottevaere I, Baumeister J, Sargentini-Maier ML, Pre-clinical intravenous serum pharmacokinetics of albumin binding and non-half-life extended Nanobodies®. ***Antibodies*** 4 (2015) 141-156.

[16] Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, Vierboom M, Breedveld E, Poelmans S, Bontinck L, Hemeryck A, The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. ***Arthritis Res Ther*** 17 (2015) 135.

[17] Mandrup OA, Ong SC, Lykkemark S, Dinesen A, Rudnik-Jansen I, Dagnæs-Hansen NF, Andersen JT, Alvarez-Vallina L, Howard KA, Programmable half-life and anti-tumour effects of bispecific T-cell engager-albumin fusions with tuned FcRn affinity. ***Commun Biol*** 4 (2021) 310.

[18] Liu C, Li J, Hu Q, Xu X,Zhang X, Generation of a CD70-Specific Fusion Nanobody with IgG Recruiting Capacity for Tumor Killing. Int J Nanomedicine 18(2023) 3325-3338.

[19] Rotman M, Welling MM, van den Boogaard ML, Moursel LG, van der Graaf LM, van Buchem MA, van der Maarel SM, van der Weerd L, Fusion of hIgG1-Fc to 111In-anti-amyloid single domain antibody fragment VHH-pa2H prolongs blood residential time in APP/PS1 mice but does not increase brain uptake. ***Nucl Med Biol*** 42 (2015) 695-702.

[20] Unverdorben F, Färber-Schwarz A, Richter F, Hutt M,Kontermann RE, Half-life extension of a single-chain diabody by fusion to domain B of staphylococcal protein A. ***Protein Eng Des Sel*** 25 (2012) 81-88.

[21] Pan H, Liu J, Deng W, Xing J, Li Q, Wang Z, Site-specific PEGylation of an anti-CEA/CD3 bispecific antibody improves its antitumor efficacy. ***Int J Nanomedicine*** 13 (2018) 3189-3201.

[22] Vugmeyster Y, Entrican CA, Joyce AP, Lawrence-Henderson RF, Leary BA, Mahoney CS, Patel HK, Raso SW, Olland SH, Hegen M, Pharmacokinetic, biodistribution, and biophysical profiles of TNF nanobodies conjugated to linear or branched poly (ethylene glycol). ***Bioconjug Chem*** 23 (2012) 1452-1462.

[23] Khodabakhsh F, Norouzian D, Vaziri B, Ahangari Cohan R, Sardari S, Mahboudi F, Behdani M, Mansouri K, Mehdizadeh A, Development of a novel nano-sized anti-VEGFA nanobody with enhanced physicochemical and pharmacokinetic properties. ***Artif Cells Nanomed Biotechnol*** 46 (2018) 1402-1414.

[24] Khodabakhsh F, Salimian M, Mehdizadeh A, Khosravy MS, Vafabakhsh A, Karami E, Ahangari Cohan R, New proline, alanine, serine repeat sequence for pharmacokinetic enhancement of anti-VEGF single-domain antibody. ***J Pharmacol Exp Ther*** 375 (2020) 69-75.

[25] Khodabakhsh F, Salimian M, Ziaee P, Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Ahangari Cohan R, Designing and development of a tandem bivalent nanobody against VEGF165. ***Avicenna J Med Biotechnol*** 13 (2021) 58-64.

[26] Fan K, Jiang B, Guan Z, He J, Yang D, Xie N, Nie G, Xie C,Yan X, Fenobody: a ferritin-displayed nanobody with high apparent affinity and half-life extension. Anal Chem 90(2018) 5671-5677.

[27] Vermeire G, De Smidt E, Casteels P, Geukens N, Declerck P,Hollevoet K, DNA-based delivery of anti-DR5 nanobodies improves exposure and anti-tumor efficacy over protein-based administration. Cancer Gene Ther 28(2021) 828-838.

[28] Binder U, Skerra A, Half-life extension of therapeutic proteins via genetic fusion to recombinant PEG mimetics. In: Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives. John Wiley & Sons, 2012: 63-80.

[29] Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, Petkova S, Avanessian L, Choi EY, Shaffer DJ, Eden PA, Anderson CL, The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. ***J Immunol*** 170 (2003) 3528-3533.
[30] Schmidt SR, Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges. 7(3) (2015) 456–460.
[31] Hambach J, Fumey W, Stähler T, Gebhardt AJ, Adam G, Weisel K, Koch-Nolte F,Bannas P, Half-Life Extended Nanobody-Based CD38-Specific Bispecific Killercell Engagers Induce Killing of Multiple Myeloma Cells. Front immunol 13(2022) 838406, 10.3389/fimmu.2022.838406.
[32] Hauser PV, Chang H-M, Yanagawa N, Hamon M, Nanotechnology, nanomedicine, and the kidney. ***Appl Sci*** 11(2021) 7187.
[33] Ahangari Cohan R, Madadkar-Sobhani A, Khanahmad H, Roohvand F, Aghasadeghi MR, Hedayati MH, Barghi Z, Ardestani MS, Inanlou DN, Norouzian D, Design, modeling, expression, and chemoselective PEGylation of a new nanosize cysteine analog of erythropoietin. ***Int J Nanomedicine*** 6 (2011) 1217-1227.
[34] Pasut G, Veronese FM, State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. ***J Control Release*** 161 (2012) 461-472.
[35] Zuma LK, Gasa NL, Makhoba XH, Pooe OJ, Protein PEGylation: Navigating Recombinant Protein Stability, Aggregation, and Bioactivity. ***Biomed Res Int*** 2022 (2022) 8929715.
[36] Khodabakhsh F, Salimian M, Hedayati MH, Ahangari Cohan R, Norouzian D, Challenges and advancements in the pharmacokinetic enhancement of therapeutic proteins. ***Prep Biochem Biotechnol*** 51 (2021) 519-529.
[37] Buscaglia CA, Alfonso J, Campetella O, Frasch AC, Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood. ***Blood*** 93 (1999) 2025-2032.
[38] Affranchino J, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Åslund L, Pettersson U, Frasch AC, Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. ***Mol Biochem Parasitol*** 34 (1989) 221-228.
[39] Buscaglia CA, Campetella O, Leguizamón MS, Frasch AC, The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. ***J Infect Dis*** 177 (1998) 431-436.
[40] Alvarez P, Buscaglia CA, Campetella O, Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences. ***J Biol Chem*** 279 (2004) 3375-3381.
[41] Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I, Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. ***Virol J*** 9 (2012) 1-8.
[42] Kojima Y, Haruta A, Imai T, Otagiri M, Maeda H, Conjugation of Cu, Zn-superoxide dismutase with succinylated gelatin: pharmacological activity and cell-lubricating function. ***Bioconjug Chem*** 4 (1992) 490-498.
[43] Mahmood I, Interspecies pharmacokinetic scaling: Principles and application of allometric scaling. 1st ed. Rockville, MD: Pine House, 2005.
[44] Fagnani R, Halpern S, Hagan M, Altered pharmacokinetic and tumour localization properties of Fab'fragments of a murine monoclonal anti-CEA antibody by covalent modification with low molecular weight dextran. ***Nucl Med Commun*** 16 (1995) 362-369.
[45] Dennis MS, Zhang M, Meng YG, Kadkhodayan M, Kirchhofer D, Combs D, Damico LA, Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. ***J Biol Chem*** 277 (2002) 35035-35043.
[46] Schlapschy M, Binder U, Börger C, Theobald I, Wachinger K, Kisling S, Haller D, Skerra A, PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. ***Protein Eng Des Sel*** 26 (2013) 489-501.
[47] MacEwan SR, Chilkoti A, Elastin-like polypeptides: Biomedical applications of tunable biopolymers. ***Pept Sci*** 94 (2010) 60-77.
[48] Kim W, Chaikof EL, Recombinant elastin-mimetic biomaterials: emerging applications in medicine. ***Adv Drug Deliv Rev*** 62 (2010) 1468-1478.
[49] Betre H, Liu W, Zalutsky MR, Chilkoti A, Kraus VB, Setton LA, A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery. ***J Control Release*** 115 (2006) 175-182.
[50] Schlapschy M, Theobald I, Mack H, Schottelius M, Wester H-J,Skerra A, Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. ***Protein Eng Des Sel*** 20 (2007) 273-284.
[51] Schellenberger V, Wang C-w, Geething NC, Spink BJ, Campbell A, To W, Scholle MD, Yin Y, Yao Y, Bogin O, A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. ***Nat Biotechnol*** 27 (2009) 1186-1190.
[52] Resmi A, Jijo V, Polypeptides: PASylation and XTEN. In: Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol. Woodhead Publishing, 2018: 299-315.
[53] Mendler CT, Friedrich L, Laitinen I, Schlapschy M, Schwaiger M, Wester H-J, Skerra A, High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. In: MAbs. Taylor & Francis, 2015.
[54] Harari D, Kuhn N, Abramovich R, Sasson K, Zozulya AL, Smith P, Schlapschy M, Aharoni R, Köster M, Eilam R, Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis. ***J Biol Chem*** 289 (2014) 29014-29029.
[55] Ablynx, An open-label extension study assessing the long-term efficacy and safety of ALX-0061 in subjects with rheumatoid arthritis. [2019]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02518620.
[56] Ablynx, A phase II study to evaluate safety and efficacy of ALX-0061 in subjects with systemic lupus erythematosus. [2019]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02437890.
[57] Ablynx, Study evaluating long-term safety of ATN-103 in subjects with rheumatoid arthritis. [2016]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT01063803.
[58] Bond Avillion 2 Development LP, A phase 2b study of the efficacy, safety, and tolerability of M1095 (sonelokimab) in subjects with moderate to severe psoriasis. [2021]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03384745.
[59] Sanofi, Follow-up study for patients who completed study ALX0681-C301 (Post-HERCULES). [2022]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02878603.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

[60] Ablynx, Dose ranging study of ALX-0171 in infants hospitalized for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection (respire). [2019]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02979431.
[61] Ablynx, First in man study of ALX-0651, a nanobody inhibiting CXCR4. [2012]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT01374503.
[62] Boehringer Ingelheim, Dose finding study of BI836880 in patients with solid tumors. [2021]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02674152.
[63] Jiangsu Alphamab Biopharmaceuticals Co., Ltd, KN046 in subjects with advanced squamous non-small cell lung cancer. [2021]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04474119.
[64] Jiangsu Alphamab Biopharmaceuticals Co., Ltd, KN046 combined with ningatinib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. [2022]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04601610.
[65] 3D Medicines (Sichuan) Co., Ltd., Phase I study of KN035 in chinese subjects with advanced solid tumors. [2022]. Available from: https://clicicaltrials.gov/study/NCT03101488.
[66] Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Multiple ascending doses (MAD) of Anti-A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (Anti-ADAMTS-5) nanobody in participants with knee osteoarthritis (OA). [2020]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03583346.
[67] Ablynx, A single dose study of the safety and investigational product level measurement in healthy subjects (FIH). [2013]. Available from: https://clinicaltrials.gov/study/NCT01284036.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

Review paper

Nanobodies and methods of increasing their half-lives

Farnaz Khodabakhsh[1], Morteza Salimian[2], Reza Ahangari Cohan[3*]

[1]*Department of Genetics and Advanced Medical Technology, Medical Biotechnology Research Center, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2]*Department of Clinical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran*
[3]*Department of Nanobiotechnology, New Technologies Research Group, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

Received: 1 October 2023 Accepted: 1 November 2023

Abstract

The development of antibody fragments is growing due to problems associated with commercially available antibodies including their large size and expensive and time-consuming production processes. Nanobodies are fragmented antibodies that are found naturally in the serum of the Camelidae family. Nanobodies, as the smallest functional part of antibodies, have many applications in the diagnosis and treatment of various diseases, especially in tumors. However, their small size causes them to be quickly removed from the blood circulation after administration, which restricted their use in the clinics. To solve this issue, various methods have been proposed to increase their plasma half-life, generally using two mechanisms: (1) the endosomal recycling of neonatal Fc receptor and (2) the increase of the hydrodynamic volume. The first mechanism naturally occurs in the body and leads to an increase in the plasma half-life of immunoglobulins and albumin. The chemical conjugation of nanobodies to the synthetic polymers, genetic fusion to polymer-mimetics peptides, and dimerization of the nanobodies increase the plasma half-life of nanobodies via the second mechanism. In this review, first, we will introduce the nanobodies, and in the following, we will discuss various methods that have been developed to increase their plasma half-lives.

Keywords: Pharmacokinetics, Fragmented antibodies, Nanobody, Plasma half-life

Please cite this article as follows:
Khodabakhsh F, Salimian M, Cohan RA, Nanobodies and methods of increasing their half-lives. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 7 (2023) 123-138.

*Corresponding author: cohan.reza@gmail.com (ORCID: 0000-0002-0490-4184)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]