

基于重链抗体构建的单域抗体研究进展

Progress in Single-domain Antibody Derived from Heavy-chain Antibody

崔华清, 王清明*

CUI Hua-Qing and WANG Qing-Ming*

军事医学科学院放射医学研究所基因组学与蛋白质组学研究室, 北京 100850

Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

摘要 在骆驼血清中存在天然的缺失轻链的重链抗体(heavy-chain antibody, HCAb), 克隆重链抗体的可变区构建的只由一个重链可变区组成的单域抗体称为 VHH 抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)。研究发现, VHH 抗体具有易表达、可溶性好、稳定性强等优点。另外, 骆驼的重链抗体与人 VH3 家族抗体同源, 对人 VH3 家族抗体的重链可变区进行类似 VHH 的特征性改造, 可以使这些抗体在保持亲和力、特异性不变或者变化很小的情况下, 优化抗体的其它性质。已有的研究表明 VHH 抗体作为一种小型化的基因工程抗体在基础研究、药物开发等领域有广阔的应用前景。

关键词 单域抗体, VHH 抗体, 重链抗体, 骆驼

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0497-05

Abstract Functional heavy-chain antibodies(HCAbs) lacking light chains occur naturally in camels. The variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody is referred to VHH. The VHH gene family is homologous to human VH subgroup III. The single-domain VHH antibodies are constructed by cloning the variable domains of HCAbs. Compared to human VHs, VHH germline sequences contain some hallmark substitutions in framework region 2, including V37F(Y), C44 E, L45 R, W47G. The substitutions at positions 44, 45, 47 are often used to camelise the human VHs. Being a small binders, VHH antibodies are well expressed, extremely stable and very soluble. Camelised human VHs are proved to exhibit the same qualities as those of VHH antibodies. The single-domain VHH antibodies will be useful in the drug development and basic research.

Key words single-domain antibody, VHH, heavy-chain antibody(HCAb), camel

基因工程抗体的发展方向之一就是抗体的小型化。随着抗体应用范围的扩大, 完整抗体分子的复杂结构并不总是必需的, 抗体的小型化能够改善抗体的某些性能, 小分子抗体具有组织穿透性好, 易表达, 易改造, 体内半衰期短等优点。目前, 小分子抗体主要包括 Fab、Fv、scFv 以及单域抗体。相对来说, 单域抗体由于分子进一步变小, 使得它在应用方面更具优势^[1]。

1 单域抗体研究现状

1989 年, Ward 等^[2]首次制备了仅由 VH 结构域组成的基因工程抗体, 并命名为单域抗体。他们采用表面等离子共振技术测量了单域抗体的亲和力, 并与其相应 Fab 抗体的亲和力进行比较, 发现单域 VH 抗体的亲和力较 Fab 抗体下降了约 250 倍^[3]。对于一般抗体而言, 其重链和轻链可变区对抗原结合的贡献是不同的, VH 发挥主要作用, 单独的 VH 仍然

Received: November 9, 2004; Accepted: March 4, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932202; E-mail: wang6801@sohu.com

具有抗原结合能力,但是 VL 的缺乏将使 VH 对抗原的亲合力降低,并且易于积聚、沉淀。近年来,通过克隆一般抗体的 VH、VL 而构建的单域抗体在亲和力和稳定性等方面有了很大提高,但是这类抗体的工程化改造不具有普遍性。因此,分子较小的单域抗体(VH 或 VL)在应用范围及利用价值方面还是受到人们的怀疑。

2 重链抗体的发现

长期以来我们认为,天然存在的抗体都是由重链和轻链两部分组成。1993 年,Hamers-Casterman 等^[4]报道了在骆驼血清中大量存在的一种天然缺失轻链的抗体,即重链抗体(HCAb, Fig 1)。重链抗体在骆驼的体液免疫中发挥着重要的作用。与一般抗体相比,重链抗体除了缺少轻链之外,它的重链可变区与铰链区之间没有 CH1 区,重链抗体的 VHH 还具有不同于 VH 的特征。这些变化对于发挥重链抗体的功能是必不可少的。研究发现,在哺乳动物中,除人类中的一些重链病患者含有缺失轻链、无法确切界定 VH 与 CH1 的抗体之外,重链抗体目前只发现存在于骆驼和美洲驼中。另外,在一些软骨鱼(如鲨鱼、鳐鱼等)中也发现了类似于骆驼重链抗体的新抗原受体(new antigen receptor, NAR, Fig. 1),它也仅由重链构成^[5,6,7]。重链抗体的发现为基因工程抗体的研究提供了新思路,重链抗体的基因工程改造也逐渐开展起来。

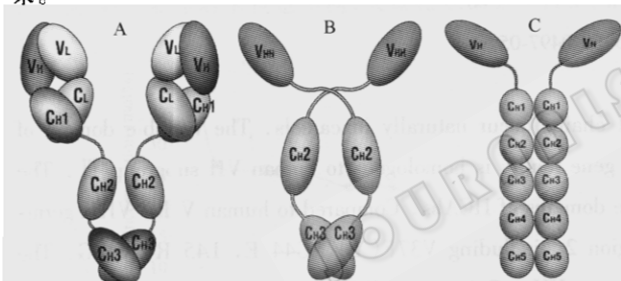


图 1 传统抗体(A)、重链抗体(B)和新抗原受体(C)的结构示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the structures of conventional antibody(A), heavy-chain antibody(B), and new antigen receptor(C)
As shown in this figure, heavy-chain antibodies and NAR antibodies are only composed of heavy-chains and lack the light chains.

3 骆驼重链抗体 VHH 区的结构特征

不论是骆驼的重链抗体还是软骨鱼的新抗原受体,虽然缺失轻链,但是作为抗体其功能是完整的,这说明重链抗体的重链可变区(VHH)单独能够形成完整的抗原结合位点。骆驼的 VHH 基因通过在几个重要功能位点的选择性进化维持了重链抗体的正常功能^[8]。

3.1 VHH 的特征性氨基酸残基

在一般抗体 VH 的 FR2 中, V37, G44, L45 和 W47 这 4 个氨基酸残基参与 VL 的相互作用,而在重链抗体的 VHH 胚系基因序列中,这 4 个氨基酸残基发生了特征性改变,分别突变为 F(Y)37, E44, R45, G47^[9]。这 4 个氨基酸残基的突变使得 VHH 具有高亲水性,从而不必与 VL 形成异二聚体就可以保持稳定的结构。除了这 4 个氨基酸残基的突变之外,在骆驼与美洲驼的 VHH 胚系基因序列中还分别存在其它氨基酸

残基比较保守的突变。

3.2 VHH 的 CDR1 和 CDR3 较长

VHH 的 CDR3 比 VH 的 CDR3 要长,人和小鼠抗体 VH 的 CDR3 大约有 9~12 个氨基酸,而骆驼 VHH 的 CDR3 的氨基酸数目一般为 16~18 个。VHH 的 CDR1 也比一般抗体 VH 的 CDR1 稍长。总体来说, VHH 高变区长度比一般抗体的 VH 高变区要长,高变区的扩大在一定的程度上弥补了轻链缺失而造成的结合力下降的不足,从而使重链抗体具有较强的抗原结合能力^[10]。单域 VHH 抗体包括 3 个高变区, X 射线晶体结构分析表明, VHH 的 CDR1 区、CDR2 区所形成凸环的形状与 VH 的 CDR1 区、CDR2 区基本相似,而 VHH 的 CDR3 区可以形成一个大的暴露的凸环,在这个凸环中存在一个二硫键,使得 CDR3 区形成的凸环比较稳定。由于 VHH 的 CDR3 较长,能够形成更丰富的抗原结合构象。CDR3 区能够形成特殊的大的暴露的凸环,所以大约一半的单域 VHH 抗体能够结合酶的裂隙以及凹穴,所以,从 VHH 抗体中可以容易地找到酶的抑制剂、受体的激动剂或拮抗剂^[10]。需要说明的是, CDR3 区形成的凸环插入蛋白质的凹穴中并不是封闭蛋白活性的唯一机制,还存在其它一些机制^[10,11,12]。

3.3 VHH 可编码形成二硫键(Fig.2)

Nguyen 等^[13]研究骆驼 VHH 胚系基因时发现,大多数 VHH 都存在形成二硫键的结构特征,而在一般抗体的 VH 胚系基因中不存在这种结构特征。VHH 中一般在 CDR3 与 CDR1(或 FR2)之间形成二硫键。这种二硫键的存在能够稳定 CDR3 形成的凸环结构,从而降低其与抗原的结合能^[10]。

3.4 VHH 基因与人 VH3 家族同源

通过对 40 个不同的骆驼与美洲驼的 VHH 胚系基因序列分析发现, VHH 基因是由 VH 家族的亚族 III 进化而来。VHH 的胚系基因表现出丰富的多样性,从而使得重链抗体能够形成大量不同结构形式的与抗原结合的凸环。通过比较人类 VH3 基因序列与骆驼的 VHH 胚系基因序列,人们可以发现二者有高度的同源性^[8,13]。利用这一特点,很多学者^[14]对人源抗体 VH 结构域 FR2 中的一些氨基酸进行 VHH 特征性改造,所得到的骆驼化单域 VH 抗体不仅保持原有的抗体的特异性和亲和力,而且溶解性好、稳定性好^[11,15]。目前看来,对于人源抗体进行 VHH 的特征性改造能够达到预期效果,可以在一定程度上实现通过基因工程技术获得亲和

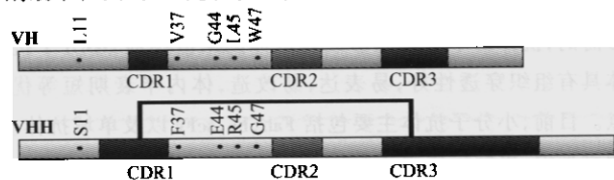


图 2 VH 与 VHH 胚系基因序列的比较

Fig. 2 Schematic representation of the differences between VH and VHH germline sequences

As shown in the figure, the first and third hypervariable regions of the VHH is larger than those of the VH, and they are also linked by a disulfide bond in VHH. Five hallmark amino acid substitutions in FR1 and FR2 are displayed.

力不变的、稳定性好的单域 VH 抗体。

4 单域 VHH 抗体的理化及生物学性质

重链抗体一经发现,它所具有的一些独特特征便引起研究者的注意。基因工程克隆骆驼重链抗体的重链可变区发展出一类单域 VHH 抗体。作为一种小分子抗体,单域 VHH 抗体有很多的优点。

4.1 分子小,结构稳定

单域抗体是目前已知分子最小的抗体。一般来说,scFv 分子量约为 30kD,而单域 VHH 抗体的分子量为 15kD。由于仅由一个结构域组成,不含连接肽序列,并且存在内部二硫键,所以,单域 VHH 抗体的分子结构比较稳定。研究证实^[16,17],将单域 VHH 抗体在 37℃ 放置一周或在高温条件(90℃)下保存单域抗体,它都能保持比较好的生物活性。另外,单域 VHH 抗体在强变性剂的条件下表现出不易变性或者变性后易复性的特点。二硫键对单域 VHH 抗体结构的稳定和生物活性的保持有重要贡献^[10]。

4.2 亲和力较高

虽然单域 VHH 抗体缺少 VL,但是 VHH 自身的一些性质使得单域 VHH 抗体仍然保持了较高的亲和力。研究发现从免疫的单域 VHH 抗体库中分离出来的 VHH 单体具有 nmol/L 级的亲和力,并且特异性好^[18]。一般来说,从免疫的单域 VHH 抗体库中筛选得到的单域 VHH 抗体具有与 scFv 抗体相似或略低的亲和力^[10]。

4.3 对人体的免疫原性弱

目前已有的抗体大都是鼠源的,作用于人体会产生人抗鼠抗体的免疫反应。Reverts^[10]将其制备的单域 VHH 抗体反复注射小鼠后未见有针对这种单域 VHH 抗体的抗体产生。所以单域 VHH 抗体的免疫原性较弱,与人的生物相容性较好。可能是由于骆驼 VHH 基因与人 VH3 家族序列高度同源的原因。

4.4 易表达、易纯化

scFv 多以包涵体形式表达,主要由于其氨基酸序列本身的原因造成^[19]。而 VHH 单独能够形成完整的独立结合抗原的结构域,溶解性较好。因此,VHH 很容易实现可溶性表达。即使以包涵体形式表达,单域 VHH 抗体也很容易复性。在溶液中,单域 VHH 抗体的浓度在达到 10mg/mL 时也不发生聚合。改造 scFv 的氨基酸序列是获得可溶性表达最可靠的方法^[19],那么进行类似 VHH 特征性的改造或许是一种不错的选择。Aires da Silva 等^[20]将兔源 scFv 的 VH 区进行了 VHH 特征性改造,大大地提高了抗体的可溶性表达量。常规条件下,在大肠杆菌中单域抗体的表达量在 5~10mg/L,是单链抗体的表达量的 10 倍^[12]。优化表达条件或在酵母表达体系中,其表达量更高。

5 单域 VHH 抗体的应用

随着人们对单域 VHH 抗体研究的深入,单域 VHH 抗体的应用也越来越广泛。作为一种小分子抗体,单域 VHH 抗体有其独特的应用潜力。

5.1 单域 VHH 抗体在制备体内显影剂方面的应用

在癌症及感染性疾病的诊疗中,快速准确检测到肿瘤以

及感染部位在体内的确切位置是非常重要的。理想的显影剂应该很容易渗入到目标组织中,并能够在其它的非特异性抗原干扰之下与靶抗原高亲和力结合,没有结合的显影剂能够很快被清除,以减少整个机体受到放射性损伤^[10]。单克隆抗体显影剂分子大,组织穿透力差,不易被清除,易发生 HAMA 反应^[21]。而单链抗体显影剂在稳定性、亲和力和表达量方面存在缺陷,且容易聚集在坏死区域,其应用也受到一些限制^[22,23]。Cortez-Retamozo 等^[24]以体积更小的 VHH 作为载体构建的显影剂穿透性好,亲和力高,没有与相应抗原结合的 VHH 抗体能够快速清除,在正常组织中没有发现有显影剂的存在。所以,单域 VHH 抗体是一种很有前景的显影剂载体。

5.2 单域 VHH 抗体用于制备肽类药物

为了使肽类药物能够长时间用于慢性疾病的治疗,人们一直致力于设计制造小分子的特异性肽段,并希望其在免疫系统疾病、癌症、心血管以及神经系统疾病的治疗中发挥巨大作用。单域 VHH 抗体不仅分子小,而且免疫原性较弱,与人的生物相容性较好。单域 VHH 抗体的 CDR3 区可以形成一个凸环,所以,从 VHH 抗体中可以找到酶的抑制剂、受体的激动剂或拮抗剂。非神经系统的淀粉样病变是与编码人溶菌酶基因的点突变有关。Dumoulin 等^[12]针对野生型溶菌酶得到的单域 VHH 抗体在体外可以抑制人溶菌酶 D67H 变异体的聚合。Sheriff 等^[25]认为单域 VHH 抗体在制备肽类药物方面要优于 scFv。

5.3 单域 VHH 抗体用于构建多价及多功能抗体

多价抗体提高了抗体与抗原的结合能力,而多功能抗体可以与多种抗原结合。理想的多价及多功能抗体应该不易聚合,不被蛋白酶所酶解,表达量高,可溶性好,稳定性好。

目前双价以及双功能抗体在免疫治疗以及诊断中有许多实际的应用。以 scFv 构建的双价及双功能抗体含有三个连接肽序列,易发生聚合以及被蛋白酶降解,并且表达量较低。单域 VHH 抗体只有一个结构域,溶解性和稳定性好,是比较理想的多价及多功能抗体的构建单元。Conrath 等^[26]以单域 VHH 抗体构建了双功能抗体,所得到的双功能抗体的表达量高,不易聚合,并且两个单域 VHH 抗体与抗原结合的亲和力基本上都保持不变。Zhang 等^[27]将从天然单域 VHH 抗体库中筛选的单域 VHH 抗体五聚化,极大地提高了其与抗原的亲和力。五聚体的表达量平均在 5mg/L,有的高达 200mg/L。五聚体 VHH 表现出良好的热力学稳定性以及不易被蛋白酶所降解等特性。

5.4 单域 VHH 抗体用于构建免疫融合物^[10]

将单域 VHH 抗体与毒素、酶或其他蛋白相连接,构建免疫融合物。由于只含有一个结构域,所以,通过基因工程手段将单域 VHH 抗体与其他蛋白(毒素、酶等)融合构成的免疫融合物在组织穿透力、清除速度以及稳定性上比其它抗体更具优势。另外,单域 VHH 抗体基本上没有免疫原性,很难激发 T 细胞的免疫反应,可以作为治疗性抗体而长期用药。

5.5 单域 VHH 作为细胞内抗体

目前抗体在疾病的治疗方面仅限于细胞表面靶标,全抗体由于分子结构复杂,在细胞内表达困难,限制了其在细胞内的应用^[28]。以 scFv 作为细胞内抗体存在折叠难、可溶性

差、易于聚合、半衰期短等问题,目前为止只有少数成功的例子^[28,29]。而 VHH 由于其自身的一些优良性质使得细胞内表达的单域 VHH 抗体能够避免相互聚合从而稳定地发挥功能。Aires da Silva 等^[20]将针对 HIV-1 的 Vif 蛋白兔源 scFv 的 VH 区进行了 VHH 特征性改造,发现改造后的抗体在细胞内能有效表达,并具有很好的溶解性。在细胞内表达的 VHH 能够与 Vif 蛋白结合,并能中和 HIV-1 病毒的感染。Anti-Vif VHH 化的抗体有可能成为 HIV-1 基因治疗药物。

5.6 单域 VHH 抗体在亲和纯化方面的应用

单域 VHH 抗体具有非常稳定的理化性质和生物活性,单域 VHH 抗体可以反复变性、复性而并不降低与抗原结合的能力。Verheesen 等^[30]首先将单域 VHH 抗体应用于蛋白质亲和纯化,他们针对一种凝乳蛋白 ISP 来筛选特异性的单域 VHH 抗体,然后用单域 VHH 抗体建立亲和柱,用来纯化 ISP 蛋白。虽然洗脱的条件比较苛刻,但是在重复用了 2000 次后,单域 VHH 抗体仍然没有丧失与抗原的结合活性。由此看来,单域 VHH 抗体在亲和纯化方面有较好的应用前景。

5.7 通过单域 VHH 抗体来发现新药靶点

通过建立肿瘤细胞免疫的单域 VHH 抗体库,筛选肿瘤细胞特异性的单域 VHH 抗体,利用单域 VHH 抗体鉴别其识别的肿瘤细胞表面抗原,从而得到肿瘤治疗靶标。Zhang 等^[31]筛选了针对于 A549 细胞系的单域 VHH 抗体-AFAI,找到 AFAI 特异识别的抗原 CEA6,并认为 CEA6 可以作为一个新的药物靶标。

5.8 单域 VHH 抗体在蛋白质组学研究中的应用

在蛋白质组学研究中会出现大量的目标蛋白,制备针对这些蛋白的抗体成为一个很紧迫的要求。利用杂交瘤技术产生的单克隆抗体由于技术手段本身的限制,远远满足不了当前蛋白质组研究的需要。抗体库的出现为抗体的制备提供了一种新的手段,利用抗体库技术能够实现抗体的规模化制备。由于单域 VHH 抗体在亲和力、溶解性、稳定性以及分子大小方面有良好的性质,构建高容量的天然及合成的单域 VHH 抗体库,规模化筛选针对大量蛋白质的抗体将会是一个很好的发展方向^[35]。

6 问题与展望

由于单域 VHH 抗体来自于骆驼的重链抗体,这就决定了它是一种非人源性抗体,而在用于人类治疗时应首选人源性抗体,所以现在有很多的研究者将精力投入到制备骆驼化的人源单域 VH 抗体。目前,骆驼化的人源单域 VH 抗体的性能远不如骆驼的单域 VHH 抗体。因为单域 VHH 抗体的形成存在一个体内的天然成熟过程。而骆驼化的人源单域 VH 抗体,对于它与 VL 相结合的疏水区的 4 个氨基酸的改变还是不够的,需要进一步的修饰、调整,从而使得骆驼化的人源单域 VH 抗体能够更稳定、更易于折叠以及能够形成更好的抗原结合构象。一旦这些缺点被克服,骆驼化的人源单域 VH 抗体能够具备与单域 VHH 抗体相似的性质^[11]。除了对于现有的人源抗体进行骆驼化的改造,还有部分学者^[32,33]通过构建半合成的骆驼化的人源单域 VH 抗体库,通过体外筛选直接获得目的抗体。我们也对此进行了尝试,我们选取文献报道的一株 VH3 家族的人单克隆抗体,对其 VH 区进行类

似 VHH 的特征性改造后,以它作为框架将其 CDR3 区随机化,并且选取了一个合适的 C 末端框架,从而构建了一个库容为 3×10^8 的合成 VHH 抗体库。我们希望能够从这个抗体库中筛选出一些重要蛋白质的单域抗体,并能够为蛋白质组学的研究提供一些新型抗体。

重链抗体的发现对于人们深入了解抗体的抗原识别机制具有重要意义。基于重链抗体发展出来的单域 VHH 抗体具有许多优良品质。尽管单域 VHH 抗体的性能在某些方面相对于全抗体或其它的基因工程抗体来说有一定的差距,但是我们相信,作为一种小分子抗体,单域 VHH 抗体会在实际应用中大有作为。

致谢 本文插图由军事医学科学院放射医学研究所任春磊绘制。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Dong ZW (董志伟), Wang Y (王瑛). *Antibody Engineering* (2nd). Beijing: Beijing Medical University Press, 2002
- [2] Ward ES, Gussow D, Griffiths AD *et al.* Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *E. coli*. *Nature*, 1989, **341**:544-546
- [3] Borrebaeck Carl AK, Malmberg AC, Furebring C *et al.* Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interactions: relation between structural domain and antigen binding. *Biotechnology (NY)*, 1992, **10**(6):697-698
- [4] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, **363**(3):446-448
- [5] Greenberg AS, Avila D, Hughes M *et al.* A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995, **374**:168-173
- [6] Rast JP, Amemiya CT, Litman RT *et al.* Distinct patterns of IgH structure and organization in a divergent lineage of chondrichthyan fishes. *Immunogenetics*, 1998, **47**:234-245
- [7] Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF *et al.* Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science*, 2004, **305**(17):1770-1773
- [8] Su C, Nguyen VK, Nei M. Adaptive evolution of variable region genes encoding an unusual type of immunoglobulin in camelids. *Mol Biol Evol*, 2002, **19**(3):205-215
- [9] Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L *et al.* Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*, 1997, **4**:1121-1131
- [10] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *Mol Biotechnol*, 2001, **74**:277-302
- [11] Riechmann L, Muyldermans S. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Journal of Immunological Methods*, 1999, **231**:25-38
- [12] Dumoulin M, Last AM, Desmyter A *et al.* A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature*, 2003, **424**(14):783-788
- [13] Nguyen VK, Hamers R, Wyns L *et al.* Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanism enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*, 2000, **19**(5):921-931

- [14] Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S *et al.* Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J Biol Chem*, 2001, **276** (28): 26285 - 26290
- [15] Davies J, Riechmann L. Single antibody domains as small recognition units; design and in vitro antigen selection of camelized human VH domain with improved protein stability. *Protein Eng*, 1996, **9** (6): 531 - 537
- [16] Ghahroudi MA, Desmyter A, Wyns L *et al.* Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*, 1997, **414**: 521 - 526
- [17] Van der Linden RHJ, Frenken L, de Geus B *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1431**: 37 - 46
- [18] Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit*, 1999, **12**: 1 - 10
- [19] Yuan QA (袁清安), Yu WY (俞炜源), Huang CF (黄翠芬). Construction and expression of a hepatocellular carcinoma specific rodent and its humanized single-chain Fv fragments in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16** (1): 86 - 90
- [20] Aires da Silva F, Santa-Marta M, Freitas-Vieira A *et al.* Camelized rabbit-derived VH single-domain intrabodies against HIV-1 strongly neutralize HIV-1 infectivity. *J Mol Biol*, 2004, **340**: 525 - 542
- [21] Hudson PJ. Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**: 395 - 402
- [22] Hudson PJ. Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*, 1999, **11**: 548 - 557
- [23] Whitlow M, Bell BA, Feng SL *et al.* An improved linker for scFv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng*, 1993, **6**: 989 - 993
- [24] Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G *et al.* Efficient tumor targeting by single-domain antibody of camel. *Int J Cancer*, 2002, **98**(3): 456 - 462
- [25] Sheriff S, Constantine KL. Redefining the minimal antigen-binding fragment. *Nat Struct Biol*, 1996, **3**: 733 - 736
- [26] Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L *et al.* Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem*, 2001, **276**(10): 7346 - 7350
- [27] Zhang J, Li Q, Nguyen TD *et al.* A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents. *J Mol Biol*, 2004, **341**: 161 - 169
- [28] Cattaneo A, Biocca S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**: 115 - 120
- [29] Tanaka T, Rabbits TH. Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J*, 2003, **22**: 1025 - 1035
- [30] Verheesen P, ten Haaf MR, Lindner N *et al.* Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, **1624**: 21 - 28
- [31] Zhang J, Tanha J, Hirama T *et al.* Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: A novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J Mol Biol*, 2004, **335**: 49 - 56
- [32] Tanha J, Xu P, Chen Z *et al.* Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *J Biol Chem*, 2001, **276** (27): 24774 - 24780
- [33] Davies J, Riechmann L. Antibody VH domain as small recognition units. *Bio Technology*, 1995, **13**: 475 - 479