

УДК 57.083: 571.27: 579.69

“ВЕРБЛЮЖЬИ НАНОАНТИТЕЛА” – ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

© 2011 г. С. В. Тиллиб*

Институт биологии гена Российской академии наук, 119334 Москва

Поступила в редакцию и принята к печати 16.08.2010 г.

Представлен краткий обзор бурно развивающейся области молекулярной иммунобиотехнологии, основанной на получении и использовании “верблюжьих наноантител” (или “нанотел”). Так называют однодоменные антиген-узнающие переменные фрагменты особых антител, присутствующих (наряду с обычными антителами) в норме у представителей сем. Camelidae (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Ряд уникальных особенностей наноантител, выгодно отличающих их от классических антител и их производных, а также наличие эффективной технологии их получения, предполагают большой потенциал использования наноантител в иммунобиотехнологии и медицине.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, однодоменные антитела, верблюжьих антитела, VHH, нанотело, наноантитело, фаговый дисплей.

“CAMEL NANOANTIBODY” IS AN EFFICIENT TOOL FOR RESEARCH, DIAGNOSTICS AND THERAPY, by S. V. Tillib* (Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow 119334, Russia; *e-mail: tillib@genebiology.ru). This short review provides an introduction to the rapidly developing field of generation and utilization of “camel nanoantibodies” (or “nanobodies”). The term “nanoantibody” or “nanobody” was given to single-domain variable fragments of special type of antibodies that naturally exist (in addition to classical types of antibodies) in blood of Camelidae family animals and in some chondrichthyan fishes. The existence of very efficient technology of nanobody generation and some very useful characteristic features promise a big potential for their use in immunobiotechnology and medicine.

Keywords: recombinant antibodies, single-domain antibodies, camel antibodies, VHH, nanobody, nanoantibody, phage display.

ВВЕДЕНИЕ

Антитела, или иммуноглобулины (Ig), – это растворимые гликопротеины крови и тканевой жидкости, играющие центральную роль в системе гуморального иммунитета у позвоночных. Антитела синтезируются В-лимфоцитами в ответ на чужеродные биологические и химические вещества (антигены) самой разнообразной структуры с целью их нейтрализации. Благодаря высокой специфичности и высокой аффинности связывания с определенным антигеном, а также возможности возникновения антител к практически неограниченному репертуару антигенов, антитела и их производные являются од-

ними из наиболее важных реагентов для использования в фундаментальных, прикладных и медицинских исследованиях.

Классические антитела [1, 2] представляют собой крупные (~150 кДа – IgG) мультимерные белки, объединяющие две идентичные тяжелые Н-цепи (которые, в свою очередь, состоят из переменного VH-, трех константных CH1-, CH2-, CH3-доменов и шарнирного участка между CH1- и CH2-доменами) и две идентичные легкие L-цепи (состоящих из переменного, VL-, и константного, CL-доменов). Четырехцепочечная молекула объединена посредством нековалентных и ковалентных (дисульфид-

Принятые сокращения: VH и VL – переменный (V) домен тяжелой (H) и легкой (L) цепи иммуноглобулина; CH и CL – константный (C) домен соответственно тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина; HCAb – антитела, состоящие из димера только одной укороченной (без CH1-домена) тяжелой цепи иммуноглобулина; VHH (“нанотело”, “однодоменное антитело”, “наноантитело”) – переменный домен HCAb, формирующий антиген-узнающий участок; Fab (Fragment antigen binding) – антиген-связывающий фрагмент; Fc (Fragment crystallizable) – фрагмент антитела, состоящий из константных доменов (CH2 и CH3); VNAR (Variable domain of the shark new antigen receptor) – переменный домен HCAb хрящевых рыб; CDR (Complementarity Determining Regions) – определяющий комплементарность гиперпеременный участок переменного домена антитела; FR (Framework Region) – консервативный каркасный участок переменного домена антитела.

* Эл. почта: tillib@genebiology.ru

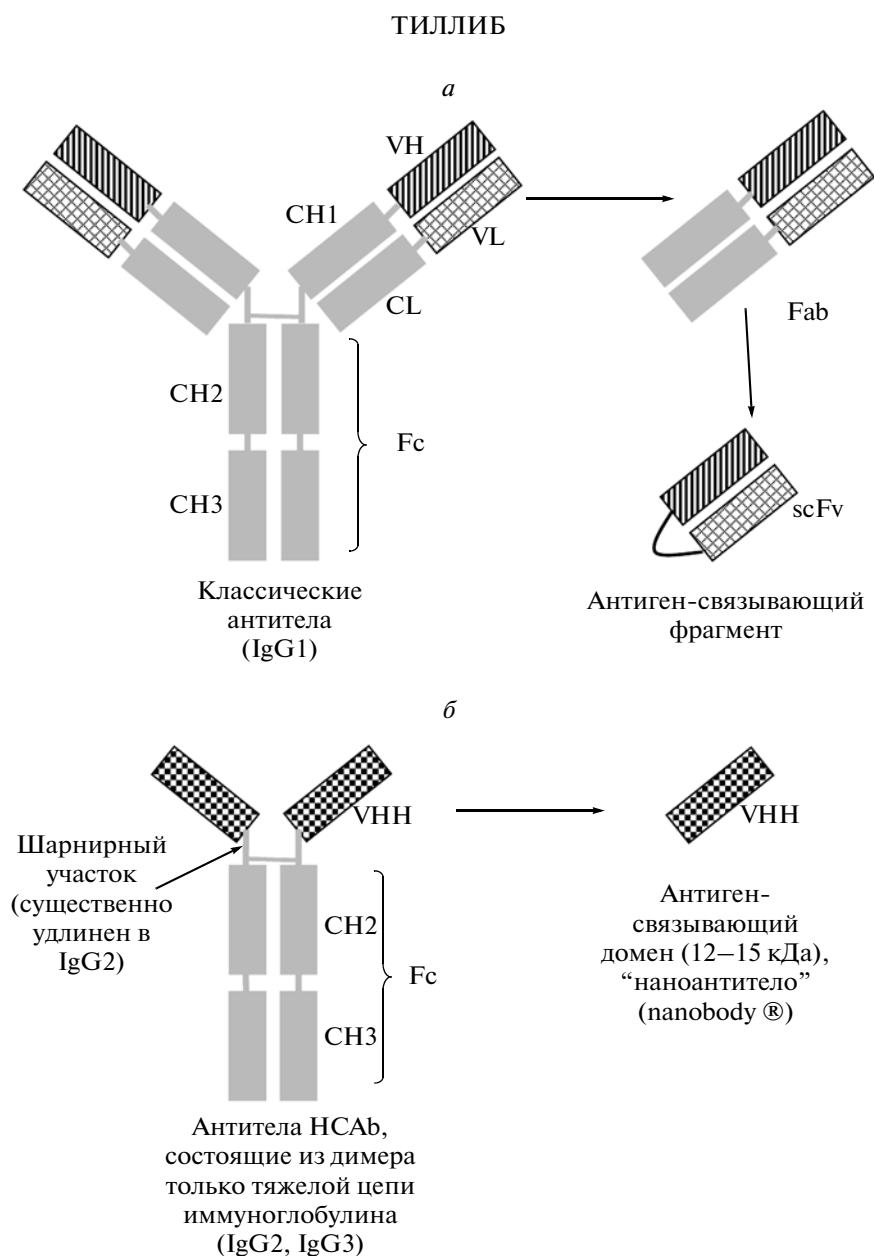


Рис. 1. Схематическое изображение обнаруживаемых у верблюдовых традиционных антител (*a*) и антител, состоящих только из тяжелых цепей (*б*). Показаны также антиген-связывающие фрагменты этих антител.

ных) связей между цепями (рис. 1*a*). При помощи протеазы папаина антитела можно расщепить на два фрагмента: Fab (Fragment antigen binding, антиген-связывающий фрагмент) и Fc (Fragment crystallizable, фрагмент, способный к кристаллизации). Соответственно одна область молекулы антител (Fab) определяет ее антигенную специфичность, а другая (Fc) осуществляет эффекторные функции, которые направлены на элиминацию антигена [3, 4]. Между CH1- и CH2-доменами H-цепи находится шарнирная область (“hinge region”), от которой зависит подвижность Fab-фрагмента. Папаин разрушает иммуноглобулин как раз в шарнирной области, выше межцепочечных дисульфидных связей. CH2-домен

является местом присоединения углеводов и связывания комплемента. CH3-домен взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клеток, принимающих участие в иммунологических реакциях. Правильная комбинация переменного района тяжелой цепи (VH) и переменного района легкой цепи (VL) формирует участок связывания антигена, в то время как константные домены антител непосредственно не участвуют в узнавании антигена. Мини-производной производной антиген-связывающего фрагмента классических антител является одноцепочечная конструкция, в которой переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены линкерной последовательностью (scFv).

В 1993 г. группой бельгийских ученых опубликовано важное открытие: кроме классических антител, в крови представителей сем. Camelidae (верблюды, ламы, викунии) обнаруживаются в значительном количестве особые неканонические антитела с упрощенной структурой [5]. Они (“heavy-chain antibody”, HCAb, рис. 1б) состоят из димера только одной укороченной (без СН1-домена) тяжелой цепи, а легкая цепь отсутствует. Антиген-узнающий участок HCAb формируется лишь одним переменным доменом (VНН), который непосредственно связан через шарнирный район с Fc-доменом. Позднее подобные неканонические одноцепочечные антитела обнаружены также у некоторых видов акул и родственных им хрящевых рыб – “химер” [6–8]. Антиген-узнающий переменный домен этих антител обозначили как VNAR (в отличие от VНН у представителей Верблюдовых). Часто вместо VНН и VNAR используют термин “nanobody” (нанотело), “однодоменное антитело”, “мини-антитело” или “наноантитело”.

Нуклеотидную последовательность гена наноантитела можно эффективно клонировать и экспрессировать в бактериях и дрожжах. Получаемое в виде мономера однодоменное наноантитело (с размерами ~2.5 нм в диаметре и ~4 нм в высоту, 12–15 кДа) – наименьший из известных на сегодня белков, обладающих свойством специфически связывать антиген. Наиболее популярное в англоязычной литературе название “nanobody” исходно коммерческое, данное бельгийской фармакологической компанией “Ablynx”, которая в настоящее время является основным разработчиком новых лекарств на основе получаемых однодоменных антител из верблюдов и лам. В России получением и исследованием таких однодоменных мини-антител (“наноантител”) двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* в течение семи лет занимается наша группа в Институте биологии гена РАН. В данном обзоре в краткой форме представлена информация об особенностях этих миниатюрных антиген-связывающих молекул (с акцентом на наноантитела из верблюда), а также о технологии их получения и возможностях использования.

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ВЕРБЛЮЖЬИ АНТИТЕЛА (HCAb), СОСТОЯЩИЕ ИЗ ДИМЕРА ТОЛЬКО ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ИММУНОГЛОБУЛИНА

Неканонические антитела (HCAb), состоящие из димера только тяжелой цепи иммуноглобулина, впервые обнаружены при электрофоретическом анализе иммуноглобулинов в сыворотке крови различных представителей семейства верблюдовых [5]. На рис. 2 приведены наши данные анализа иммуно-

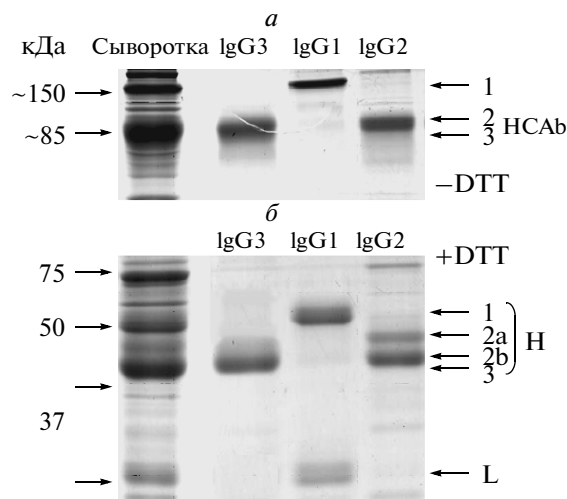


Рис. 2. Электрофоретический анализ иммуноглобулинов (IgG) в сыворотке крови двугорбого верблюда (после осаждения белков сульфатом аммония), а также во фракциях иммуноглобулинов, полученных путем дифференциальной аффинной хроматографии на колонках с белок-G- и белок-A-сефарозой: а – в невосстанавливающих условиях (–DTT); б – в восстанавливающих условиях (+DTT). Стрелками справа указаны зоны миграции целых IgG или их тяжелых (H) и легких (L) цепей (номер соответствует подклассу).

глобулинов (IgG) из сыворотки крови двугорбого верблюда. Электрофорез белков (по Лэммли) проводили или в не восстанавливающих условиях (без добавления дитиотриэтола сохраняется целостность антитела, рис. 2а), или в восстанавливающих условиях (рис. 2б), при которых в результате разрушения дисульфидных связей цепи иммуноглобулинов разделяются и движутся согласно их массе. В крайней левой дорожке нанесен препарат белков сыворотки, предварительно подвергнутой преципитации с сульфатом аммония (для уменьшения доли сывороточного альбумина). В последующих трех дорожках нанесены препараты трех подклассов иммуноглобулинов верблюда, получаемые путем дифференциальной аффинной хроматографии на колонках с белок-G- и белок-A-сефарозой, как описано ранее [5]. Видно, что помимо классических антител (IgG1, ~150 кДа) в сыворотке верблюда содержится большое количество (более 60% всех IgG) неканонических антител (HCAb, IgG2 и IgG3, ~80–90 кДа). IgG2 и IgG3, как видно на рис. 2б, не содержат легких цепей иммуноглобулина и их тяжелые цепи имеют меньший размер (примерно 40–47 кДа), чем тяжелые цепи канонических антител IgG1 (примерно 52–55 кДа). Такая же картина характерна и для других верблюдовых. Относительная доля HCAb варьирует от примерно 15–25% (всех IgG) у лам и викуний до примерно 60–80% у верблюдов.

Как предполагают, неканонические антитела (НСАб), по крайней мере, в случае верблюдовых, — результат относительно недавней эволюции генов канонических антител. Два константных домена тяжелых цепей, CH2 и CH3, в случае НСАб и классических антител высококонсервативны. Домена, соответствующего первому константному CH1-домену классических антител, нет в составе НСАб. По-видимому, этот домен удаляется в процессе РНК-сплайсинга, измененного вследствие точечной мутации, нарушающей сигнал сплайсинга на 3'-конце экзона CH1 в генах $C\gamma$, предназначенных для НСАб [9, 10].

Геном одногорбого верблюда (дромедера, или дромедача) содержит кластер из примерно пятидесяти VH- и сорока VHH-зародышевых генов, вслед за которыми располагаются множественные гены D-сегментов, J-сегментов и гены константных участков (C μ , C γ , C ϵ , C α). Очевидно, что некоторые из C γ -генов предназначены для формирования НСАб (мутация приводит к потере CH1-домена), в то время как остальные — для формирования классических антител (с сохраняемым CH1-доменом) [9, 11]. Одни и те же гены сегментов D и J могут быть реарранжированы (случайным образом объединены) как с одним из VH-, так и с одним из VHH-генов. Это указывает на то, что гены VH и VHH находятся в одном и том же локусе [11, 12].

Организация переменных доменов неканонических антител (VHH) и переменных доменов (VH) классических антител (у человека VH-домены подкласса IgG3 имеют особо выраженную гомологию с VH и VHH верблюдовых) весьма сходна. В обоих случаях V-домены состоят из четырех консервативных каркасных участков (FR — Framework Regions), которые окружают три гипервариабельных участка, определяющих комплементарность, CDR (Complementarity Determining Regions). В обоих случаях формируется типичная для V-домена иммуноглобулина пространственная структура из двух β -слоев, один из которых состоит из четырех аминокислотных цепочек и второй — из пяти [13, 14]. В этой структуре все три гипервариабельных участка кластеризуются с одной стороны V-домена (где они участвуют в узнавании антигена) и располагаются в петлях, соединяющих β -структуры. Однако имеются и важные отличия, связанные с функционированием VHH в формате одного домена. Так, гипервариабельные участки CDR1 и CDR3 VHH заметно увеличены. Часто в гипервариабельных участках VHH обнаруживаются цистеиновые остатки сразу в двух участках (чаще всего — в CDR1 и CDR3, реже — в CDR2 и CDR3). При исследовании кристаллических структур VHH показано, что эти цистеиновые остатки формируют дисульфидные связи, и это до-

полнительно стабилизирует структуру петель данного антитела [13, 15]. Наиболее явный и воспроизводимый отличительный признак VHH — четыре замены гидрофобных аминокислотных остатков на гидрофильные во втором каркасном участке (Val37Phe, Gly44Glu, Leu45Arg, Trp47Gly, согласно нумерации Кабат (Kabat) и соавт. [16]). Этот каркасный участок у VH-домена высококонсервативен, обогащен гидрофобными аминокислотными остатками и особо важен при образовании связи с переменным доменом VL легкой цепи. VHH-домен в этом плане сильно отличается: указанные замены гидрофобных аминокислот на гидрофильные делают невозможной ассоциацию VHH и VL. Эти замены также объясняют обычно высокую растворимость VHH (наноантитела) при его получении в виде рекомбинантного белка [17].

Репертуары возможных паратопов (антиген-связывающих структур антитела) НСАб и классических антител, по-видимому, могут заметно отличаться. Так как эти два типа антител сосуществуют в одном организме, то можно предполагать, что они не конкурируют, а взаимно дополняют друг друга. Действительно, не раз отмечалось, что оба типа могут возникать параллельно, взаимоисключаясь или в разных соотношениях, по отношению к разным эпитопам антигенного материала при иммунизации одного и того же животного. При Вестерн-блот-анализе мы часто наблюдали дифференциальный характер узнавания фракционированных антигенов этими двумя типами антител, выделенными из одной иммунной сыворотки. Несмотря на предполагаемое меньшее разнообразие возможных паратопов у однодоменных антител по сравнению с классическими двухдоменными антителами, работы многих авторов убедительно продемонстрировали, что НСАб могут быть получены против самых разнообразных эпитопов весьма широкого спектра антигенов [18–20]. Очевидно, этому способствуют заметно увеличенные гипервариабельные участки CDR1 и CDR3. Следует также отметить удивительно большое (в сравнении с V-доменами классических антител) число соматических гипермутаций в VHH, накапливающихся, по-видимому, в процессе аффинного созревания антител в ходе иммунизации [21, 22].

Рентгеноструктурный анализ показал, что антиген-связывающие петлевые участки VHH способны образовывать необычные для классических V-доменов структуры [11, 17, 23]. Если в случае VH- и VL-доменов классических антител все шесть выпетленных гипервариабельных участков вносят более или менее одинаковый вклад в связывание антигена, то в случае VHH обычно для формирования паратопа наиболее важен CDR3-участок. Показано, что

CDR3-участок в V_HH (но не в V_H или V_L) может образовывать необычные длинные пальцеобразные выступающие структуры, которые могут входить в щели, выемки антигена, могут, в частности, узнавать активные центры ферментов [15, 24]. Малыми размерами антиген-связывающего участка (V_HH) и его способностью формировать необычные выступающие паратопы объясняют возможность получения HCAb, способных узнавать недоступные для классических антител эпитопы, например, при генерировании антител, являющихся эффективными ингибиторами ферментов [25].

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОАНТИТЕЛ С ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Один из наиболее популярных подходов к получению рекомбинантных антиген-узнающих фрагментов антител – модифицированный метод фагового дисплея, основанный на отборе из больших библиотек клонированных в фагмидном векторе ДНК-последовательностей (кодирующих рекомбинантные белки, экспрессирующиеся в составе поверхностного белка нитчатых фагов) клонов, кодирующих белки (антитела), способные специфически связывать определенный лиганд (антиген) [26–28]. Обычно вместо больших целых молекул антител для экспонирования на поверхности фага используют гибридные рекомбинантные одноцепочечные белки (scFv), представляющие собой случайные комбинации переменных доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов (кодирующие их последовательности клонируются независимо друг от друга и затем объединяются случайным образом), соединенные короткой линкерной последовательностью. Такая химерная молекула, если правильно сочетаются домены, способна сохранять специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных районов и введение линкерного пептида. Одна из проблем традиционных рекомбинантных технологий – необходимость работы с очень большими по числу клонов библиотеками ДНК рекомбинантных антител, в которых должны быть представлены все возможные комбинации последовательностей двух случайных переменных доменов (тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов). Помимо этой проблемы, здесь также возникают и проблема формирования правильной относительной конформации этих двух доменов, и проблема растворимости индивидуальных переменных доменов, которые часто имеют тенденцию к агрегации.

Упомянутые проблемы в значительной мере преодолеваются при использовании технологии фагового дисплея для клонирования репертуара генов

однодоменных антиген-узнающих V_HH-доменов (наноантител) неканонических антител HCAb [5, 17, 25, 29, 30]. Практически каждый клон в получаемой библиотеке будет кодировать функциональный V_HH-домен, который обладает определенной антиген-узнающей специфичностью, соответствующей одному из антител иммунизированного животного. В этом случае достаточно использовать относительно небольшие исходные библиотеки (из 10⁶ клонов) для эффективного отбора клонов нужных наноантител. Получаемое “на выходе” наноантитело, в отличие от переменных доменов классических антител, как правило, хорошо растворимо, устойчиво к значительным колебаниям температуры и pH, а также может быть экономично наработано в больших количествах в бактериях или дрожжах.

Любопытно отметить другой перспективный, но пока еще менее надежный, чем метод фагового дисплея, подход-метод рибосомного дисплея, который, в частности, успешно использован для получения гаптен-специфических наноантител [31]. При этом подходе используется специально адаптированная библиотека ДНК-последовательностей наноантител, которые кодируют соответствующие мРНК, не содержащие стоп-кодона в составе их 3'-концевого спейсерного участка. В результате последовательных этапов транскрипции и трансляции *in vitro* наноантитела остаются связанными с рибосомой и кодирующей их матричной РНК. Эти комплексы из трех компонентов и используют для селекционного отбора (на основе специфического связывания с иммобилизованным антигеном). Из отобранных комплексов выделяют мРНК, проводят обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию, в результате чего получают специфически обогащенные библиотеки последовательностей наноантител.

Хотя в качестве источника наноантител можно – помимо иммунных библиотек – использовать неиммунные (“наивные”) и синтетические библиотеки, именно в случае иммунных библиотек чаще удается получить высокоаффинные наноантитела [18].

Итак, наиболее эффективная процедура получения наноантител включает следующие три этапа.

Во-первых, это индукция образования антител (HCAb) при иммунизации животного (из сем. верблюдовых). Обычно проводят пять повторяющихся подкожных инъекций антигена, смешанного с адьювантом Фрейнда, в течение 2–2.5 мес. (процедура подобна той, что используется при иммунизации кролика или козы).

Во-вторых, осуществляют клонирование всего репертуара генов наноантител из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного животного. Обычно для этого достаточно 100 мл крови. Проводят ряд последовательных биохимических и моле-

кулярно-биологических процедур — выделения из фракции белых клеток крови полиаденилированных РНК, синтеза кДНК, двухстадийной ПЦР со специфическими праймерами, рестрикции и очистки библиотеки последовательностей генов наноконтрагентов, встраивания этих последовательностей в фагмидный вектор.

Наконец, проводится базирующаяся на методе фагового дисплея процедура селекции наноконтрагентов с заданной специфичностью [17, 29, 30, 32]. Недавно нами предложена модификация процедуры селекции, повышающая ее эффективность и заключающаяся в параллельном использовании как традиционного (M13KO7), так и модифицированного (с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII) фагов-помощников [33, 34]. Предложен метод параллельного рестрикционного анализа (фингерпринтирования) отбираемых последовательностей генов наноконтрагентов, НМР-анализ, позволяющий лучше контролировать процесс селекции [34]. Наши данные указывают на то, что обогащение специфическими наноконтрагентами в процессе многостадийной процедуры “паннинга” (амплификации и селекции) фаг-дисплейных библиотек происходит неравномерно. Некоторые клоны можно отобрать после первого раунда селекции и потерять при следующих раундах. Другие клоны удавалось отобрать только после трех раундов. Важен правильный и оптимальный дизайн процедуры селекции и мониторинга, чтобы суметь отобрать искомого наноконтрагента с наибольшей аффинностью, хорошей растворимостью и лучшим экспрессионным выходом.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОАНТИТЕЛ

Характерные особенности наноконтрагента, определяющие большой потенциал их использования для самых разнообразных практических приложений в иммунобиотехнологии, следующие.

1) Высокоэффективный способ генерирования и селекции наноконтрагента.

2) Малый размер наноконтрагента, способствующий их лучшей проницаемости внутрь клеток и тканей.

3) Благоприятные структурные особенности: способность образовывать необычные для классических антител паратопы, позволяющие связываться с углублениями и активными центрами белков; наноконтрагента могут быть использованы для выявления “скрытых” эпитопов или эпитопов, которые не могут быть распознаваемы существенно более крупными обычными антителами.

4) Высокая растворимость и стабильность в широком диапазоне температур и кислотности среды.

5) Высокий экспрессионный выход, экономичность наработки в больших количествах. Обычно наноконтрагента первоначально нарабатывают в периплазме бактерий *E. coli* (с выходом 1–10 мг из 1 л культуры). Имеется возможность их наработки в дрожжах, растениях и клетках млекопитающих [35].

6) Простота всевозможных генноинженерных манипуляций, адаптаций для конкретных задач, возможность создания мультиспецифичных и многофункциональных производных.

7) Низкая иммуногенность; возможность экономично “гуманизировать” антитела без заметной потери их специфической активности [36].

Многочисленные примеры использования наноконтрагента приводятся в недавних обзорах [18, 19]. Здесь же мы упомянем лишь некоторые из них. Наноконтрагента можно использовать в качестве ингибиторов ферментов [15, 25, 32, 37, 38], аффинных лигандов [39], внутриклеточных антител (“intrabody”) [40–43], в детектирующих антиген устройствах, биосенсорах [44–46], для изучения белок-белковых взаимодействий [47, 48].

Разработан новый метод слежения за антигеном в живой клетке [42]. Он основан на введении в клетку экспрессионной конструкции, в которой последовательность гена наноконтрагента к эндогенному клеточному белку (как, например, к ламину или цитокератину) соединена в одной рамке считывания с последовательностью гена флуоресцентного белка (RFP). В трансформированных такой конструкцией клетках экспрессируются флуоресцирующие и, в то же время, специфически узнающие соответствующий антиген белки. При микроскопировании живой клетки появляется возможность проследить динамические изменения антигенов на всех этапах клеточного цикла [42].

Наноконтрагента имеют большой потенциал использования в качестве антиинфекционных агентов, для инактивации токсинов, для борьбы с вирусными и бактериальными инфекциями [19].

Значительное число исследований посвящено получению наноконтрагента для диагностики и лечения раковых заболеваний. В одном из них использовали конъюгат наноконтрагента, узнающего раковый эмбриональный антиген, и фермента β -лактамазы [49]. Этот конъюгат с помощью фермента способен превращать пролекарство (производное цефалоспоринона) в активный препарат (фенилендиамин), способный убивать быстрорастущие клетки. Целью работы было проверить на мышиной модели аденокарциномы человека возможность направленного (с помощью наноконтрагента, которое узнает клетки, экспрессирующие раковый эмбриональный антиген) специфического воздействия активируемого лекарства именно на раковые клетки. Для этого вначале в

мышь внутривенно вводили конъюгат наноантигела, который вскоре после инъекции локализовался преимущественно в опухоли (и почках). Затем (через 24 ч) вводили пролекарство. В результате такой трехкратной (1 раз в неделю) обработки наблюдали ярко выраженный терапевтический эффект [49]. Еще в одной работе показано, что однодоменные наноантигела, узнающие рецептор эпидермального фактора роста, могут эффективно конкурировать за связывание с этим фактором и, как следствие, могут ингибировать рост зависящих от этого связывания опухолевых клеток [50].

Имеется ряд примеров использования наноантигел для диагностики и лечения других заболеваний человека или модельных заболеваний у животных. Так, в мышинной модели ревматоидного артрита наноантигела, полученные против воспалительного цитокина – фактора некроза опухолей (TNF), дают заметный терапевтический эффект, который оказался даже сильнее, чем эффект применения моноклонального антитела (обычного типа), которое используется для лечения ревматоидного артрита [51]. При развитии болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона обычно наблюдаются нарушения, связанные с агрегацией белков. Наноантигела могут препятствовать такой агрегации и даже способствовать растворению уже существующих агрегатов [43, 52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы наблюдается все возрастающий интерес к получению и использованию специфических наноантигел и их производных в широком спектре приложений (для исследований, диагностики и терапии). Эта технология должна рассматриваться как дополняющая, а не замещающая, другие подходы, основанные на использовании традиционных моноклональных антител и их фрагментов. Использование наноантигел особенно перспективно для получения антител к некоторым эпитопам, обычно не узнаваемым классическими антителами. Когда нужно экономично наработать большое количество антитела, когда требуется использование одноцепочечной конструкции, кодирующей хорошо растворимый и стабильный антиген-узнающий белок, тогда использование наноантигела особенно целесообразно. Для решения конкретной задачи получение первичных наноантигел – лишь начальный этап работы. Далее требуется дополнительная работа по их анализу и адаптации, при этом положительный результат вовсе не гарантирован. О больших перспективах использования наноантигел можно судить по увеличению числа публикаций о них, а также по очевидно растущей заинтересованности в этой технологии многих крупных международных фарма-

цевтических компаний. Наноантигела, безусловно, – многообещающий инструмент исследований и основа для получения новых лекарственных препаратов.

Работа получила финансовую поддержку Программы фундаментальных исследований Президиума РАН №27 “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов” (3.1.2.) и Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-01395-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Porter R.R. 1973. Structural studies of immunoglobulins. *Science*. **180**, 713–716.
2. Padlan E.A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169–217.
3. Dwek R.A., Sutton B.J., Perkins S.J., Rademacher T.W. 1984. Structure–function relationships in immunoglobulins. *Biochem. Soc. Symp.* **49**, 123–136.
4. Burton D.R. 1985. Immunoglobulin G: functional sites. *Mol. Immunol.* **22**, 161–206.
5. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Bajyana Songa E., Bendahman N., Hamers R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. **363**, 446–448.
6. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., Mckinney E.C., Flajnik M.F. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. **374**, 168–173.
7. Rast J.P., Amemiya C.T., Litman R.T., Strong S.J., Litman G.W. 1998. Distinct patterns of IgH structure and organization in divergent lineage of chondrichthyan fishes. *Immunogenetics*. **47**, 234–245.
8. Nuttall S.D., Krishnan U.V., Hattarki M., De Gori R., Irving R.A., Hudson P.J. 2001. Isolation of a new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol. Immunol.* **38**, 313–326.
9. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S. 1999. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy–chain antibodies. *Mol. Immunol.* **36**, 515–524.
10. Woolven B.P., Frenken L., van der Logt P., Nicholls P.J. 1999. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy–chain antibody formation. *Immunogenetics*. **50**, 98–101.
11. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S. 2000. Camel heavy–chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen–binding repertoire. *EMBO J.* **19**, 921–931.
12. De Genst E., Saerens D., Muyldermans S., Conrath K. 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Develop. Comp. Immunol.* **30**, 187–198.
13. Muyldermans S., Cambillau C., Wyns L. 2001. Recognition of antigens by single–domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *TIBS*. **26**, 230–235.

14. Padlan E.A. 1996. X-Ray crystallography of antibodies. *Adv. Protein Chem.* **49**, 57–133.
15. De Genst E., Silence K., Decanniere K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S. 2006. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 4586–4591.
16. Kabat E., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C. 1991. Sequence of proteins of immunological interest. *US Public Health Services*. NIH, Bethesda, MD, Publication no. 91–3242.
17. Nguyen V.K., Desmyter A., Muyldermans S. 2001. Functional heavy-chain antibodies in camelidae. *Adv. Immunol.* **79**, 261–296.
18. Ghassabeh G.H., Muyldermans S., Saerens D. 2010. Nanobodies, single-domain antigen-binding fragments of camelid heavy-chain antibodies. In: *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Eds Shire S.J. et al. N.Y.: Springer, 29–48.
19. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., et al. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 157–174.
20. Muyldermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C., et al. 2009. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128**(1–3), 178–183.
21. de Genst E., Handelberg F., van Meirhaeghe A., Vinck S., Loris R., Wyns L., Muyldermans S. 2004. Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody. *J. Biol. Chem.* **279**, 53593–53601.
22. de Genst E., Silence K., Decanniere K., Loris R., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. 2005. Strong *in vivo* maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires. *J. Biol. Chem.* **280**, 14114–14121.
23. Decanniere K., Muyldermans S., Wyns L. 2000. Canonical antigen binding loop structures : more structures, more canonical classes? *J. Mol. Biol.* **300**, 83–91.
24. Desmyter A., Transue T.R., Ghahroudi M., Dao-Thi M.-H., Poortmans F., Hamers R., Muyldermans S., Wyns L. 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nature Struct. Biol.* **3**, 8003–8011.
25. Lauwereys M., Ghahroudi M., Desmyter A., Kinne J., Holzer W., De Genst E., Wyns L., Muyldermans S. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. 1998. *EMBO J.* **17**, 3512–3520.
26. Brissette R., Goldstein N.I. 2007. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods Mol. Biol.* **383**, 203–213.
27. Sidhu S.S., Koide S. 2007. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 481–487.
28. Hoogenboom H.R. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1105–1116.
29. Ghahroudi M.A., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* **414**, 521–526.
30. Saerens D., Kinne J., Bosmans E., Wernery U., Muyldermans S., Conrath K. 2004. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J. Biol. Chem.* **279**, 51965–51972.
31. Yau K.Y., Groves M.A., Li S., Sheedly C., Lee H., Tanha J., MacKenzie C.R., Jermutus L., Hall J.C. 2003. Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library. *J. Immunol. Methods.* **281**, 161–175.
32. Conrath K.E., Lauwereys M., Galleni M., Matagne A., Frere J.M., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. 2001. Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in Camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2807–2812.
33. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. 2008. Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антиген-связывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител. *Биотехнология.* **4**, 32–34.
34. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. 2010. Фингерпринтный анализ селекции “наноантител” методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. *Acta Naturae.* **2**, 3(6), 100–108.
35. Harmsen M.M., Haad H.J. 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**(1), 13–22.
36. Vincke C., Loris R., Saerens D., Martinez-Rodriguez S., Muyldermans S., Conrath K. 2009. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J. Biol. Chem.* **284**(5), 3273–3284.
37. Martin F., Volpari C., Steinkuhler C., Dimasi N., Brunetti M., Biasiol G., Altamura S., Cortese R., De Francesco R., Sollazzo M. 1997. Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease. *Protein Eng.* **10**, 607–614.
38. Koch-Nolte F., Reyelt J., Schlossow B., Schwarz N., Scheuplein F., Rothenburg S., Haag F., Alzogaray V., Cauerhff A., Goldbaum F.A. 2007. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 *in vivo*. *FASEB J.* **21**, 3490–3498.
39. Klooster R., Maassen B.T.H., Stam J.C., Hermans P.W., ten Haaf M.R., Detmers F.J.M., de Haard H.J., Post J.A., Verrips C.T. 2007. Improved anti-IgG and HAS affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology. *J. Immunol. Meth.* **324**, 1–12.
40. Jobling S.A., Jarman C., Teh M.M., Holmberg N., Blake C., Verhoeyen M.E. 2003. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nature Biotechnol.* **21**, 77–80.
41. Gueorguieva D., Li S., Walsh N., Mukerji A., Tanha J., Pandey S. 2006. Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J.* **20**, 2636–2638.
42. Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M.C., Leonhardt L. 2006. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature Methods.* **3**, 887–889.

43. Verheesen P., de Kluijver A., van Koningsbruggen S., de Brij M., de Haard H., van Ommen C.J.B., van der Maarel S.M., Verrips T. 2006. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear poly(A)-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 105–111.
44. Pleschberger M., Saerens D., Weigert S., Sleytr U.B., Muyldermans S., Sara M., Egelseer E.M. 2004. An S-layer heavy chain camel antibody fusion protein for generation of a nanopatterned sensing layer to detect the prostate-specific antigen by surface plasmon resonance technology. *Bioconjug. Chem.* **15**, 664–671.
45. Huang L., Reekmans G., Saerens D., Friedt J.M., Frederix F., Francis L., Muyldermans S., Campitelly A., van Hoof C. 2005. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 483–490.
46. Saerens D., Frederix F., Reekmans G., Conrath K., Jans K., Brys L., Huang L., Bosmans E., Maes G., Borghs G., Muyldermans S. 2005. Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. *Anal. Chem.* **77**, 7547–7555.
47. Huang Y., Verheesen P., Roussis A., et al. 2005. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phagedisplay. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 721–730.
48. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. 2008. Новый подход к исследованию клеточных компонентов, ассоциированных с определенным белком. *Докл. РАН.* **421**, 826–829.
49. Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P.D., Wernery U., de Baetselier P., Muyldermans S., Revets H. 2004. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.* **64**, 2853–2857.
50. Roovers R.C., Laeremans T., Huang L., de Taeye S., Verkleij A.J., Revets H., de Haard H.J., van Bergen en Henegouwen P.M.P. 2007. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumor growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 303–317.
51. Coppieters K., Dreier T., Silence K., de Haard H., Lauwereys M., Casteels P., Beirnaert E., Jonckheere H., van de Wiele C., Staelens L., et al. 2006. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 1856–1866.
52. Dumoulin M., Last A.M., Desmyter A., Decanniere K., Canet D., Larsson G., Spencer A., Archer D.B., Sasse J., et al. 2003. A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils human lysozyme. *Nature.* **424**, 783–788.