

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-14-22  
УДК 571.27

## НАНОАНТИТЕЛА: СТРОЕНИЕ, ПОЛУЧЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР)

А. В. Шаталова<sup>1\*</sup>, А. С. Якубова<sup>1</sup>, В. В. Палимпсестов<sup>2</sup>, И. Б. Есмагамбетов<sup>3</sup>

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 115093, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет», 119991, Россия, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1/1

3 – ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

\*Контактное лицо: Шаталова Анна. E-mail: shatalova.anna.v@gmail.com

Статья получена: 28.03.2018. Статья принята к печати: 18.01.2019

### Резюме

**Введение.** Однодоменные антитела (наноантитела) в отличие от классических иммуноглобулинов, представлены одним варибельным доменом тяжелоцепочечного антитела. По сравнению с классическими IgG, наноантитела обладают такими качествами, как: высокая биологическая доступность, способность взаимодействовать с труднодоступными эпитопами, высокая растворимость, термостабильность, возможность получения в бактериальных системах экспрессии.

**Текст.** Цель статьи в описании структурных и функциональных свойств наноантител, а также их эффективного применения.

**Заключение.** Области применения наноантител очень обширны: лабораторные исследования, диагностика и терапия онкологических, инфекционных, гематологических, воспалительных, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. В зависимости от целей применения, наноантитела легко модифицировать, присоединив другое наноантитело, необходимую молекулу или радиоактивную метку. Наноантитела обладают огромным потенциалом для применения в диагностике, терапии и медицине.

**Ключевые слова:** наноантитела, однодоменные антитела, VHH.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Шаталова А. В., Якубова А. С., Палимпсестов В. В., Есмагамбетов И. Б. Наноантитела: строение, получение, применение. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(1): 14–22.

## NANOBODIES: STRUCTURE, MANUFACTURING, APPLICATION (REVIEW)

A. V. Shatalova<sup>1\*</sup>, A. S. Yakubova<sup>1</sup>, V. V. Palimpsestov<sup>2</sup>, I. B. Esmagambetov<sup>3</sup>

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Moscow Pedagogical State University, 1/1, M. Pirogovskaya str., Moscow, 119991, Russia

3 – Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

\*Corresponding author: Anna V. Shatalova. E-mail: shatalova.anna.v@gmail.com

Received: 28.03.2018. Accepted: 18.01.2019

### Abstract

**Introduction.** Single-domain antibodies (nanobodies) are composed of the heavy-chain variable domain only. Compared to conventional immunoglobulins G (IgG) nanobodies have such qualities as: high bioavailability, ability to bind epitopes that are difficult to reach, high solubility and thermal stability, etc. Nanobodies can be easily manufactured in microorganisms (*E. coli*) to significantly save on cost.

**Text.** Goal of the paper consists of the description of structural and functional properties of nanobodies and its effective application.

**Conclusion.** Nanobodies can be used in many fields of medicine and biotechnology such as research, diagnostics and therapy of oncology, infectious, hematological, inflammatory, autoimmune and neurological diseases. They can also be easily modified using another nanobody, molecules or radioactive mark as necessary. Nanobodies have huge potential for applications in diagnostics, therapy and medicine.

**Keywords:** nanobodies, single domain antibodies, VHH.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Shatalova A. V., Yakubova A. S., Palimpsestov V. V., Esmagambetov I. B. Nanobodies: structure, manufacturing, application. *Drug development & registration.* 2019; 8(1): 14–22.

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, иммуноглобулины класса G (IgG) играют большую роль в формировании иммунного ответа организма. В процессе эволюции у некоторых представителей хордовых параллельно с обычными IgG появились неканонические тяжелоцепочечные иммуноглобулины. В процессе изучения этих антител установили, что их варибельный домен может функционировать изолированно и имеет высокий биотехнологический потенциал. Такую структуру назвали однодоменным антителом или наноантителом.

На сегодняшний день, большая часть лекарств биологической природы основана на антителах. Антитела

также широко применяют в исследовательской работе и диагностике. Обычно используют моноклональные антитела, однако они имеют высокую себестоимость и могут вызывать нежелательный иммунный ответ. Альтернативой им могут стать наноантитела, обладающие такими качествами как: высокая специфичность и аффинность, высокая растворимость и стабильность.

### Общая характеристика антител

Антитела (Ig) – это белковые антигенраспознающие молекулы, вырабатываемые плазматическими клетками в ответ на проникновение в организм чужеродных антигенов [3].

Мономер антитела состоит из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (H) и двух легких цепей (L). H- и L-цепи расположены симметрично и соединены дисульфидными мостиками, локализованными ближе к C-концу легкой цепи. Тяжелые цепи в свою очередь также соединены разным количеством дисульфидных связей.

Тяжелые и легкие цепи состоят из гомологичных участков – доменов, каждый из которых состоит примерно из 110 аминокислотных остатков. В состав легкой цепи входит два домена: переменный и константный ( $V_L$ ,  $C_L$ ), а в состав тяжелой – от 4 до 5 доменов: переменный и константные ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и т.д.) [3]. Между  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$  располагается небольшой участок с большим содержанием пролина – шарнирный участок. Он обладает гибкостью и способностью связывать комплемент [2] (рисунок 1).

Антигенсвязывающий участок сформирован переменными доменами легкой и тяжелой цепи. Переменные домены содержат 3 выступающих гиперпеременных участка (CDR – complementarity determining regions), а между ними находятся 4 каркасных участка (FR – framework regions). Положение гиперпеременных участков варьируется в зависимости от легкой или тяжелой цепи.

Классическое антитело имеет Fab- (fragment antigen binding) и Fc (fragment crystallizable region)-фрагменты. В состав Fab-фрагмента входят переменные последовательности ( $V_L$  и  $V_H$ ) и константные домены ( $C_L$  и  $C_{H1}$ ) антитела. Данный фрагмент отвечает за распознавание и связывание чужеродной молекулы антигена. В состав Fc-фрагмента входят оставшиеся константные домены. Необходимость Fc-фрагмента заключается в выполнении им таких эффекторных функций, как активация системы комплемента, антителозависимая клеточная цитотоксичность и привлечение фагоцитов [3].

В зависимости от структуры H-цепей в организме большинства млекопитающих имеется 5 классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE [3].

В иммунной защите организма участвуют все классы иммуноглобулинов, но особая роль в длительном гуморальном иммунитете против чужеродных антигенов отведена иммуноглобулинам класса G.

### Общая структура наноантител

Структура классического IgG включает в себя две тяжелых и две легких цепи, однако существуют также неканонические – тяжелоцепочечные антитела, лишенные легких цепей. Наличие таких антител у людей носит название болезни «тяжелых цепей», приводящей к многочисленным патологиям [39]. Однако у некоторых животных тяжелоцепочечные антитела функционируют наравне с классическими и играют значительную роль в иммунитете.

В 1993 году бельгийскими учеными Брюссельского свободного университета во главе с Хамерс-Кастерман было совершено важное открытие [17, 46]: в кро-

ви представителей семейства Верблюдовых (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedaries*, *Lama guanacoe*, *Lama glama*, *Vicugna vicugna*, *Vicugna pacos*) [27] наряду с классическими антителами были обнаружены антитела с упрощенной структурой [18] (рисунок 1).

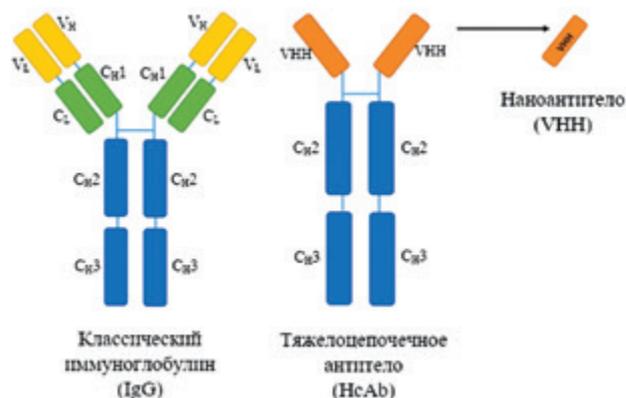


Рисунок 1. Схематическое строение классического IgG, тяжелоцепочечного IgG и наноантитела

Figure 1. Schematic structure of classical IgG, heavy chain IgG and nanoantibodies

Обнаруженные неканонические антитела были по своей структуре приближены к IgG, но в отличие от классического иммуноглобулина имели лишь укороченную тяжелую цепь H, состоящую из одного переменного VHH домена и двух константных доменов (VHH- $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ). Интересно, что неканоническое антитело, несмотря на отсутствие  $V_L$ , сохраняет свою функциональность.

Появление такого феномена, как отсутствие  $C_{H1}$  домена в структуре тяжелой цепи IgG возможно является следствием точечной мутации в гене, кодирующей тяжелой цепь H [44].

Открытым антителам было дано название «тяжелоцепочечные антитела» HcAb (heavy chain-only antibodies). HcAb и классические антитела комплексно дополняют друг друга, так как неканоническая структура тяжелоцепочечных антител помогает им связываться с более широким спектром эпитопов [42].

Количество HcAb в сыворотке представителей Верблюдовых может варьироваться в зависимости от вида животного: у верблюдов концентрация HcAb может достигать 75%, в то время как у лам в сыворотке содержится не более чем 45% тяжелоцепочечных антител [8, 29, 35]. Наличие достаточно большой концентрации неканонических антител в сыворотке животных доказывает существенную роль тяжелоцепочечных антител в гуморальном иммунитете представителей семейства Верблюдовых.

В 1995 году Эндрю Гринберг и команда ученых обнаружили в сыворотке хрящевых рыб (*Ginglymostoma cirratum*, *Orectolobus maculatus*, *Hydrolagus barbouri*) по-

хожие тяжелоцепочечные антитела Ig-NAR [21, 38]. Эти антитела, в отличие от верблюжьих, состояли из пяти константных доменов и одного переменного – V-NAR [31]. Переменные домены тяжелоцепочечных антител хрящевых рыб (V-NAR) и представителей Верблюдовых (VHH) достигают аналогичных размеров 2,5 нм в диаметре и 4,2 нм в длину и обладают схожими свойствами.

Наличие у хрящевых рыб и Верблюдовых одноцепочечных антител по мнению ученых обусловлено конвергентной эволюцией на молекулярном уровне [32].

Вследствие относительно безопасной и легкой работы с представителями Верблюдовых в отличие от хрящевых рыб, в научном мире получило большую популярность изучение тяжелоцепочечных антител HcAb.

В течение более глубоких исследований, в сыроворотке Верблюдовых обнаружили три изоформа иммуноглобулина G: IgG1, IgG2, IgG3. В то время как IgG1 представляет собой классическое антитело массой 150 кДа, оставшиеся два изоформы имеют вид укороченных тяжелоцепочечных антител массой 90 кДа [42]. Они отличаются длиной шарнирного участка – у IgG2 он намного длиннее, чем у IgG3 и может выступать в роли C<sub>H</sub>1 домена [18, 27].

Способность VHH функционировать в отсутствие двух доменов V<sub>L</sub> и C<sub>H</sub>1 в 1997 году подтолкнула ученых к созданию методами генной инженерии первых самостоятельных рекомбинантных молекул VHH [15].

Позже биофармацевтическая компания Ablynx, акцентируя внимание на небольших размерах, дала изолированным переменным доменам тяжелоцепочечных верблюжьих антител коммерческое название «наноантитела» (рисунок 1) [26].

В литературе также часто встречается другое название отдельно функционирующего переменного домена тяжелоцепочечного антитела VHH – «однодоменное антитело».

Интерес ученых к наноантителам поддерживается до сих пор, так как они являются выгодным и эффективным инструментом в медицине, терапии и диагностике. Если сравнить между собой классические антитела и наноантитела, то можно выделить ряд преимуществ:

1. Небольшие размеры (15 кДа), способствующие проникновению в клетки и ткани.
2. Гибкость гиперпеременных участков, способствующих достижению ранее недоступных эпитопов.
3. Высокая растворимость за счет изменения аминокислотного состава.
4. Термостабильность [45].
5. Устойчивость к экстремальным pH [10].
6. Низкая иммуногенность из-за высокой гомологии VHH и VH [43].
7. Соизмеримые высокие специфичность и аффинность [45].

8. Белок кодируется одним геном длиной 380 нуклеотидных пар [21].
9. Легкая дополнительная модификация для повышения терапевтического и диагностического потенциала [41].
10. Экономически выгодное производство в бактериальных системах [34].

Перечисленные преимущества оправдывают быстрорастущий интерес к наноантителам как к перспективному средству профилактики, диагностики и лечения различных заболеваний.

### Структурно-функциональные особенности наноантител

По данным секвенирования генетические последовательности переменных участков классических антител VH и VHH похожи на 80–85% [43], но есть некоторые отличия в гиперпеременных петлях и каркасном участке FR2.

По аналогии с переменными доменами VH тяжелых цепей классических иммуноглобулинов G в составе VHH также выделяют 4 каркасных (FR) и 3 гиперпеременных (CDR) участка. Молекула наноантитела имеет бета-складчатую структуру: два β-листа сформированы соответственно 4 и 5 β-нитями.

Каркасные участки VH и VHH во многом похожи, но существенное отличие в аминокислотном составе второго каркасного участка (FR2) VHH способствовало образованию уникальной структуры неканонических антител.

Вследствие замены гидрофобных аминокислот на гидрофильные или более маленькие аминокислоты [20, 24] переменная последовательность тяжелоцепочечных антител потеряла возможность связываться с переменной последовательностью легкой цепи. Данная замена в аминокислотном составе VHH способствовала появлению гомодимеров антител, обладающих более высокой растворимостью.

Однодоменные антитела, по сравнению с переменным доменом классических антител, также имеют существенное отличие в строении антигенсвязывающих участков. Гиперпеременные петли H1 и H3 в молекуле VHH имеют большую длину, по сравнению с классическими. Кроме того, петля H3 способна образовывать выпуклые [11], пальцеобразные расширения, которые в 60–80% отвечают за взаимодействие с конформационно недоступными для классических антител эпитопами [26, 42]. Вытянутая форма молекулы VHH и выпуклая форма паратопа привели к формированию антигенсвязывающей поверхности по размерам (600–800 Å<sup>2</sup>) почти идентичной «платформе» классических антител [28].

В свою очередь удлинение гиперпеременных участков привело к повышению пластичности молекулы VHH, нарушая прочность образующихся комплексов антиген-антитело. Как обнаружилось в дальнейших

исследованиях, для дополнительной стабилизации в составе молекулы VHH находятся дополнительные остатки цистеина, между которыми образуется дисульфидная связь. Наличие одного дисульфидного мостика и отсутствие агрегации из-за наличия гидрофильных аминокислот способствует рефолдингу молекулы, позволяя ей восстанавливать свою активность после воздействия неблагоприятных факторов (высокая температура, экстремальный pH) [19].

Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что полезные свойства наноантител напрямую связаны с их уникальными структурно-функциональными особенностями. Из-за их свойств выгодно использовать наноантитела в широком спектре областей, что требует их наработки в промышленных масштабах. Для эффективного получения рекомбинантных молекул наноантител применяется особая технология с использованием биотехнологических методов.

### Конструирование и продукция рекомбинантных наноантител

Для получения наноантител используют тяжелоцепочечные антитела HcAb семейства Верблюдовых. Процедура включает в себя иммунизацию животного с последующим клонированием генетической последовательности VHH из клеток лимфоцитарного ряда в фагмидный вектор с целью отбора методом фагового дисплея клонов наноантител, обладающих высокой аффинностью (рисунок 2) [13, 33].

Метод фагового дисплея – это технология отбора из больших библиотек специфичных рекомбинантных белков, экспрессируемых в составе поверхностного

белка бактериофагов [1, 9]. В данном методе используется фаговый вектор M13. Весь спектр последовательностей антиген-узнающих молекул клонируется в N-конец последовательности белка оболочки бактериофага pIII в составе фагмиды [1]. Фаговая частица обычно имеет 3–5 копий белка pIII, отвечающих за инфекционную активность (N-конец) и окончание сборки фаговой частицы (C-конец). Если к N-концу присоединить белковую молекулу VHH, то функциональность белка pIII не нарушится. После трансформации фагмиды, несущей ген наноантитела, в бактерии штамма *E. coli* TG1, необходимо инфицировать бактерии фагом-помощником, содержащего необходимые гены для сборки бактериофага M13. Для повышения выхода рекомбинантных бактериофагов в технологии могут применяться различные бактериофаги-помощники. Полученные библиотеки фаговых частиц используют для трех раундов селекции с целью отбора клонов, обладающих наиболее специфичными наноантителами на поверхности белка pIII.

Сначала альпака иммунизируют целевым антигеном 5 или 6 раз с интервалом в неделю с целью индукции гуморального иммунитета и наработки классических и тяжелоцепочечных антител [23]. После последней иммунизации у животного отбирают кровь из яремной вены и из очищенных клеток лимфоцитарного ряда выделяют тотальную РНК, несущую генетическую последовательность всего разнообразия антител: классических и тяжелоцепочечных. Выделенная тотальная РНК используется для синтеза кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции с использованием poli-T праймеров. После получения

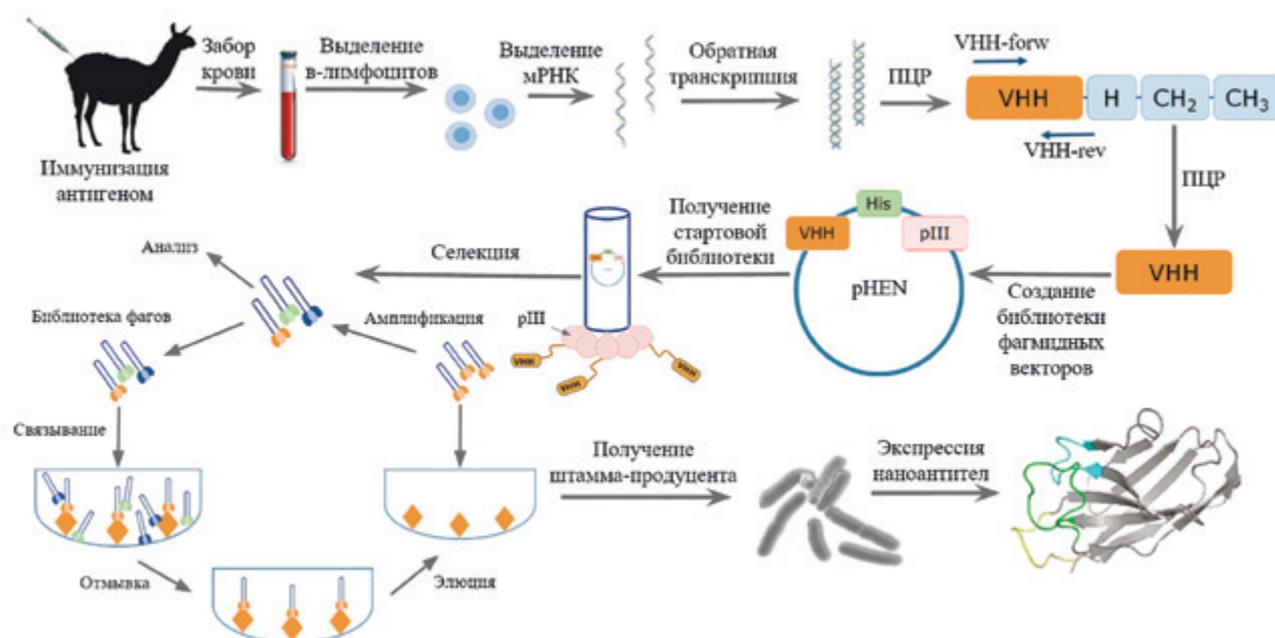


Рисунок 2. Схематическое изображение получения наноантител с применением метода фагового дисплея

Figure 2. Schematic representation of the production of nanoantibodies using the phage display method

кДНК проводится первый раунд ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих последовательность нуклеотидов, которые кодируют вариабельные домены всех изотипов IgG. Полученные ампликоны разделяют с помощью метода гель-электрофореза по молекулярной массе: 850 п.н. для амплифицированного участка  $V_H-C_H1$  классических антител и 620 п.н. для участка VHH-Hinge тяжелоцепочечных антител, у которых отсутствует  $C_H1$  домен. Затем ДНК-последовательности массой 620 п.н. элюируют из агарозного геля и на их матрице ставят второй раунд ПЦР. Во втором раунде используются специальные праймеры, фланкирующие каркасные участки (FR1 и FR4), а также содержащие некомплементарные участки матричной цепи, кодирующие сайты рестрикции [4]. По завершению двух раундов ПЦР получают нуклеотидные последовательности наноантител, имеющие с двух концов сайты рестрикции. Полученную библиотеку лигируют в фагидные вектора [30]. В конечном итоге полученные фагидные вектора используются в создании стартовой библиотеки бактериофагов и в трех раундах фагового дисплея для получения высокоспецифичных наноантител. Обогащение библиотеки высокоспецифичными фагами проверяют методом Поликлональный фаг ИФА (Иммуноферментный анализ). Бактериофаги, показавшие положительный результат в методе Поликлональный фаг ИФА используются для определения аминокислотной последовательности наноантител, прикрепленных к pIII белкам.

Для продукции однодоменных антител, наиболее предпочтительными являются бактериальные клетки *E. coli*, позволяющие быстро наработать продукт в больших объемах [7, 16]. Наноантитела лишены Fc-фрагмента и не нуждаются в посттрансляционных модификациях; они легко экспрессируются в периплазматическое пространство бактерий, где окислительная среда образует дисульфидные связи [36]. Так как генетическую последовательность наноантител лигируют в плазмиды, содержащие полигистидиновую последовательность, то очистку синтезированных наноантител осуществляют методом металл-аффинной хроматографии с использованием никелевых или кобальтовых сорбентов.

### Модификация и применение наноантител

На фармацевтическом рынке доля лекарств, имеющих биологическую природу, составляет свыше 20% всего объема продаж [25]. И большая часть таких препаратов представлена моноклональными антителами. Моноклональные антитела широко используют в исследованиях, диагностике и терапии заболеваний, но они характеризуются дорогостоящим производством. Кроме того, моноклональные антитела имеют большой размер (150 кДа), что ограничивает их проникновение в ткани и усложняет попадание в опухоли [37].

По сравнению с моноклональными антителами, наноантитела обладают маленьким размером (15 кДа), благодаря чему лучше проникают и равномерно распределяются в тканях организма. Однако, небольшие размеры приводят к быстрому выведению наноантител из кровотока. Для решения этой проблемы и продления периода полувыведения, наноантитела сшивают с растворимыми молекулами, например, белком плазмы крови (альбумин) [22].

В терапевтических и исследовательских целях наноантитела легко модифицировать, присоединив другое наноантитело, необходимую молекулу или радиоактивную метку. Чаще всего используют би- или трехвалентные наноантитела, обладающие большей эффективностью, чем моновалентные.

В настоящее время области применения наноантител очень обширны: лабораторные исследования, диагностика и терапия онкологических, нейродегенеративных, инфекционных, гематологических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

### Применение наноантител в исследованиях и диагностике

В исследованиях, для визуализации белков и клеточных процессов используют, например, хромоантитела – наноантитела с присоединенным флуоресцентным белком.

Использование наноантител в радиоизотопных методах позволяет легко, неинвазивно исследовать биологические процессы, проводить диагностику и оценивать течение заболеваний.

Наноантитела быстро и специфически связываются с мишенью, поэтому для снижения радиационной нагрузки на организм и быстрой визуализации результата используют короткоживущие радиоизотопы ( $^{68}\text{Ga}$  и  $^{18}\text{F}$ ).

В онкологии для неинвазивного доклинического скрининга и мониторинга разработаны наноантитела, специфичные к таким мишеням, как HGF (hepatocyte growth factor), CA IX (carbonic anhydrase IX), CEA (carcinoembryonic antigen), PSMA (prostate-specific membrane antigen), EGFR (epidermal growth factor receptor), гиперэкспрессия которых может свидетельствовать о наличии опухоли. Например, для скрининга некоторых видов рака молочной железы получены моновалентные наноантитела 2Rs15d, специфичные к белку-маркеру HER 2 (human epidermal growth factor receptor 2), конъюгированные с радиоактивной меткой ( $^{68}\text{Ga}$  и  $^{18}\text{F}$ ) [40].

Широкое распространение получили наноантитела в диагностике вирусных, бактериальных и грибковых инфекций. На основе наноантител разработаны чувствительные и эффективные системы ИФА, например, для обнаружения вируса гриппа штаммов H3N2 и H5N1 [41].

### **Наноантитела как системы доставки**

Наноантитела можно использовать в качестве транспортных средств для доставки лекарственных средств или токсинов к клеткам-мишеням. Направленная доставка снижает токсичность препарата для организма и повышает терапевтический эффект.

Перспективным в целевой доставке является использование наноантител в комплексе с наноразмерными носителями лекарственных средств. В качестве носителей крупных доз лекарственных средств можно использовать липосомы или мицеллы. Таким образом можно снизить частоту введения препарата и его иммуногенность, а также продлить время циркуляции комплекса в кровотоке.

Наиболее эффективным является использование более стабильных и вместилищных полимерсом. В качестве примера можно привести комплекс полимерсомы и наноантитела, специфичного к трансмембранному белку PlexinD1 сосудистой сети опухоли [12, 47].

Для направленной доставки лекарственных веществ в комплексе с наноантителами также используют внеклеточные везикулы. Они быстрее поглощаются клеткой, однако имеют короткий период полувыведения. Одним из примеров является комплекс наноантитела, специфичного к рецептору эпидермального фактора роста EGFR и внеклеточной везикулы, проинкубированный с PEG (polyethylene glycol) – мицеллами [41].

### **Противораковая терапия**

Преимущества наноантител делают их весьма перспективными в качестве диагностических и терапевтических препаратов в противораковой терапии. Небольшие размеры позволяют им легко проникать в ткани опухоли и связываться с труднодоступными эпитопами. Несмотря на низкую иммуногенность, наноантитела можно использовать лишь в качестве дополнительного препарата к основной терапии из-за отсутствия Fc-фрагмента, выполняющего эффекторные функции.

В зависимости от строения, наноантитела могут связываться с различными мишенями, и по-разному воздействовать на опухолевые клетки. Например, наноантитело, связываясь со специфическим опухолевым рецептором может контролировать рост и пролиферацию клеток, а также индуцировать апоптоз. Как пример, можно рассмотреть наноантитела к рецептору эпидермального фактора роста HER 1 (human epidermal growth factor receptor 1), успешно ингибирующие рост солидных опухолей как *in vitro*, так и *in vivo* [41].

В качестве примера, к перспективным мишеням для наноантител в противораковой терапии можно отнести активатор плазминогена урокиназного типа, играющий роль в адгезии, миграции и инвазии метастазов; хемокины, стимулирующие ангиогенез; метасто-

тический фактор карбоангидраза IX; рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A (vascular endothelial growth factor – A). Связавшись с данными мишенями, наноантитела способны приостановить рост и миграцию опухолевых клеток [41].

Кроме того, в противораковой терапии и диагностике можно использовать модифицированные наноантитела, конъюгированные с наноразмерными носителями, содержащими лекарственные вещества; меченые радионуклидами или сшитые с наночастицами.

### **Наноантитела в адресной радионуклидной терапии и фотодинамической терапии**

Радиоиммунотерапия, сочетающая лучевую терапию с иммунотерапией, является перспективной стратегией лечения раковых заболеваний. Наноантитела, конъюгированные с радиоактивным веществом, позволяют выборочно уничтожать раковые клетки. В качестве радиоактивного вещества чаще всего используют  $\beta$ -излучающие радиоизотопы:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ . За счет своих небольших размеров наноантитела легко проникают в опухоли, и накапливаются в них, оказывая меньшее токсическое влияние на здоровые ткани. Однако, они могут накапливаться в почках, приводя к нежелательному радиационному повреждению [40].

Фотодинамическая терапия заключается в индукции гибели клеток за счет активации фотосенсибилизатора под воздействием света. Примером могут служить наноантитела, конъюгированные с наночастицами золота. При лазерном облучении наночастицы нагреваются и повреждают раковые клетки. Такая терапия считается минимально токсичной и инвазивной [41].

### **Наноантитела для борьбы с инфекционными заболеваниями**

Терапия инфекционных заболеваний бактериальной или вирусной природы – еще одна из областей применения наноантител.

В терапии бактериальных заболеваний используют, например, наноантитела, взаимодействующие с поверхностными белками микроорганизмов, препятствуя тем самым их адгезии на клетки-мишени. Некоторые пентамеры наноантител используют для связывания со жгутиками бактерий и ограничения их подвижности.

Перспективным является конструирование наноантител, предотвращающих секрецию токсинов или факторов вирулентности бактериальных клеток [41].

При вирусных заболеваниях используют наноантитела, предотвращающие адсорбцию вируса, его проникновение и депротенинизацию. Использование мультимеризованных наноантител, специфичных к разным эпитомам, усиливает их нейтрализующее действие. Например, ALX-0171 – тривалентное наноантитело,

специфичное к поверхностному белку респираторно-синцитиального вируса. Связываясь с белком, наноантитела блокируют слияние вируса с клеткой [14].

### **Наноантитела в терапии воспалительных и аутоиммунных заболеваний**

Одним из перспективных направлений в терапии воспалительных заболеваний является использование иммуноцитоклинов. Широко известны противовоспалительные свойства некоторых цитокинов, однако свойственная им токсичность затрудняет их применение. Конъюгирование менее активных форм цитокинов с наноантителами решает эту проблему.

Другой подход в терапии воспалительных заболеваний – это регулирование функций Т-клеток. Например, было получено мультивалентное наноантитело, которое селективно связывается с ионным каналом Kv1.3 (potassium voltage-gated channel), являющимся ключевым в активации Т-клеток. В эксперименте *in vitro*, наноантитело мощно блокировало канал, стимулируя Т-клеточный ответ. Результат был подтвержден на модели крыс с гиперчувствительностью замедленного типа. Подобное наноантитело может стать перспективным лечением для ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний [5].

Одним из ключевых факторов воспалительного процесса является фактор некроза опухоли (ФНО). Поэтому к нему были разработаны специфичные наноантитела, выступившие в качестве эффективных супрессоров воспаления в эксперименте на мышах.

В некоторых воспалительных процессах важную роль играет интерлейкин 6 (ИЛ-6). Для регуляции этих процессов, получили бивалентные наноантитела ALX-0061, обладающие специфичностью к рецептору ИЛ-6 [6]. В данный момент препарат прошел вторую фазу клинических испытаний (clinical trial identifier: NCT02437890, 08.05.2015).

В терапии аутоиммунных заболеваний для удаления аутоиммунных иммуноглобулинов плазмаферезом используют специфичные наноантитела. Кроме того, наноантитела к иммуноглобулинам G используют в качестве лиганда при гемодиализе у пациентов с системной красной волчанкой.

В настоящее время в области лечения аутоиммунных заболеваний перспективна терапия, направленная на фактор некроза опухоли. Поэтому было разработано гуманизированное тривалентное наноантитело ATN-103, которое высокоафинно связывается с ФНО. Результаты исследований на мышиных моделях с полиартритом показали, что ATN-103 может снизить клинические проявления заболевания [41].

### **Наноантитела против гематологических заболеваний**

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура – заболевание, связанное с нарушением свертываемости крови. В настоящее время нет прове-

ренного терапевтического средства для лечения пурпуры. Компания «Ablynx» разработала каплацизумаб – бивалентное моноспецифичное наноантитело, специфичное к домену A1 фактора фон Виллебранда. Каплацизумаб обещает стать первым препаратом поддерживающей терапии в лечении пурпуры [41]. В 2017 году препарат прошел третью стадию клинических испытаний (Clinical trial identifier: NCT02553317, 17.09.2015).

### **Наноантитела как нейтрализующие или детоксицирующие агенты**

В медицине широко распространено применение противоядий на основе моноклональных антител. Наноантитела можно использовать в качестве эффективной дополнительной терапии для нейтрализации токсинов и ядов. Например, были получены наноантитела к ядам скорпионов (*Androctonus australis*, *Hemiscorpius lepturus*) и настоящих кобр. Другой мишенью для получения нейтрализующих наноантител являются бактериальные токсины или белки. В том числе, были получены наноантитела к липополисахаридам грамотрицательных бактерий (*Neisseria meningitidis*), холерному токсину, токсину *Clostridium Difficile*, токсину *Shigella dysenteriae*, токсину *Bacillus anthracis* и ботулотоксинам А и Е [41].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Благодаря своей структуре и свойствам наноантитела способны эффективно связываться с ранее недоступными для классических антител антигенами, предотвращать взаимодействие рецепторов с лигандами или же доставлять к целевым клеткам вещества, выполняющие различные функции. Это обуславливает широкий спектр применения наноантител в исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний.

Для исследований и диагностики большим преимуществом наноантител является их экономическое выгодное получение в бактериальных системах.

В терапии различных заболеваний преимуществом является их низкая иммуногенность, связанная с отсутствием Fc-фрагмента. Существенным недостатком наноантител является их быстрый период выведения из организма. Одним из способов решения данной проблемы является создание мультимеризованных наноантител, образующих комплексы с растворимыми белками, например, альбумином. Преимущества наноантител вызывают все больший интерес к разработке терапевтических препаратов на их основе.

На данный момент на различных стадиях клинических испытаний находятся несколько терапевтических препаратов, из которых наиболее перспективным является препарат каплацизумаб. В его состав входит бивалентное наноантитело, предназначенное для терапии приобретенной тромботической тромбоцитопенической пурпуры или синдрома Мошковица. Тре-

тя стадия клинических испытаний данного препарата была завершена в сентябре 2017 года.

В данный момент ведутся исследовательские работы по изучению наноантител на базах исследовательских лабораторий, а также крупных фармацевтических фирм, таким как Sanofi и Merck.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вятчин А. С., Тиллиб С. В. Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антигенсвязывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител. *Биотехнология*. 2008; 4: 22–27.
2. Манько В. М., Девришов Д. А. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы: Учебник. М: Издательство «Агровет». 2011; 752 с.
3. Ярилин. А. А. Иммунология: Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010; 752 с.
4. Abbady A. Q. et al. Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a Brucella-immunised camel. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 142: 49–56.
5. Delanote V. et al. Ablynx. 2014. Challenging and intractable targets. Poster: Characterization of Anti-Kv1.3 Nanobodies and activity in Inflammatory model systems. Available at: <http://www.ablynx.com/technology-innovation/nanobodies-competitive-features/> (accessed 20.03.18).
6. Ablynx. 2015. Press Releases: Ablynx Initiates Phase II SLE Study With Its Anti-IL-6R Nanobody, Partnered With Abbvie. Available at: <http://www.ablynx.com/news/press-releases/?year=2015&lang=en> (accessed 22.03.18)
7. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(4): 501–519.
8. Blanc M.R. et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type  $\gamma$ -globulins from camelid sera. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2009;54(4): 207–212.
9. Brissett R., Neil I. Goldsteine. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 383: 203–213.
10. Chakravarty R. et al. Nanobody: The «Magic Bullet» for Molecular Imaging? *Theranostics*. 2014; 4(4): 386–398.
11. De Genst E. et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103(12): 4586–4591.
12. Debets M.F. et al. Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting. *Macromolecular Bioscience*. 2013; 13: 938–945.
13. Desmyter A. et al. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015; 32: 1 – 8.
14. Detalle L. et al. Generation and characterisation of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 60: 6–13.
15. Ellen R. Goldman et al. Enhancing Stability of Camelid and Shark Single Domain Antibodies: An Overview. *Front Immunol*. 2017; 8: 865.
16. Estell D. et al. Adapting industry practices for the rapid, large-scale manufacture of pharmaceutical proteins. *The Bridge*. 2006; 36(3):39–44.
17. Gonzalez-Sapienza G. et al. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front Immunol*. 2017; 8: 977.
18. Hamers-Casterman C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–448.
19. Harmsen M. M., De Haard H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 77(1): 13–22.
20. Harmsen M.M. et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol*. 2000; 37(10): 579–590.
21. Hassanzadeh-Ghassabeh G. et al. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8(6): 1013–1026.
22. Hu Y., Liu C., Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1442.
23. Lauwereys M., Ghahroudi M. A. et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*. 1998; 17: 3512–3520.
24. Maass D. R. et al. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods*. 2007; 324: 13–25.
25. Mullard A. 2014 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015; 14: 77–81.
26. Muyldermans S. et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2009; 128: 178–183.
27. Muyldernans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu.Rev.Biochem*. 2013. V.; 82: 17.1–17.23.
28. Nguen V. K. et al. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*. 2000; 19(5): 921–930.
29. Nguyen V. K. et al. The Specific Variable Domain of Camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol*. 1998; 275(3): 413–418.
30. Nguyen V. K., Desmyter A., Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol*. 2001; 79: 261–296.
31. Nuttall S. D. et al. Isolation of a new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol. Immunol*. 2001; 38(4): 313–326.
32. Oriol Sunyer J. Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen. *Infect Disord Drug Targets*. 2012; 12(3): 200–212.
33. Pardon E. A. et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protocols*. 2014; 9(3): 674–693.
34. Pleiner T., Bates M. Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *Elife*. 2015; 4.
35. R. van der Linden et al. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods*. 2000; 240(1-2); 185–195.
36. Rahbarzadeh F. et al. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Immunol*. 2006; 43(5): 426–435.
37. Ryman J. T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics and System Pharmacology*. 2017; 6(9): 576–588.
38. Saerens D. et al. Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors (Basel)*. 2008; 8(8): 4669–4686.
39. Seligmann M. et al. Heavy chain diseases: current findings and concepts. *Immunological Rev*. 1979; 48: 145–167.
40. Sharkey R. M., Goldenberg D. M. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3: 349–370.
41. Steeland S. et al. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016; 21(7): 1076–1113.
42. Tilib S. V. «Camel Nanoantibody» is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy. *Molecular Biology*. 2011; 45(1): 66–73.
43. Van Heeke G. et al. Nanobodies as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2017; 169: 47–56.
44. Woolven B. P. et al. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*. 1999; 50(1-2): 98–101.
45. Yan J. et al. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library. *J. Nanobiotechnology*. 2015; 6: 13–33.
46. Yardehnavi N. et al. A camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against *Hemiscorpius lepturus* envenomation. *Faseb J*. 2014; 28(9): 4004–4014.
47. Zou T. et al. Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *Journal of Biotechnology*. 2015; 214: 147–155.

## REFERENCES

1. Vjatchanin A. S., Tillib S. V. Modifications of the phage display procedure to increase the efficiency of selection of antigen-binding domains of specific single-chain camel antibodies. *Biotechnology*. 2008; 4: 22–27 (In Russ.).
2. Man'ko V. M., Devrshov D. A. Veterinary immunology. Fundamentals: Textbook. M: Publishing «Agrovet». 2011; 752 p. (In Russ.).
3. Yarilin. A. A. Immunology: Textbook. M.: GEOTAR-Media. 2010; 752 p. (In Russ.).
4. Abbady A. Q. et al. Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a Brucella-immunised camel. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 142: 49–56.
5. Delanote V. et al. Ablynx. 2014. Challenging and intractable targets. Poster: Characterization of Anti-Kv1.3 Nanobodies and activity in Inflammatory model systems. Available at: <http://www.ablynx.com/technology-innovation/nanobodies-competitive-features/> (accessed 20.03.18).
6. Ablynx. 2015. Press Releases: Ablynx Initiates Phase II SLE Study With Its Anti-IL-6R Nanobody, Partnered With Abbvie. Available at: <http://www.ablynx.com/news/press-releases/?year=2015&lang=en> (accessed 22.03.18)
7. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(4): 501–519.
8. Blanc M.R. et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type  $\gamma$ -globulins from camelid sera. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2009;54(4): 207–212.
9. Brissett R., Neil I. Goldsteine. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 383: 203–213.
10. Chakravarty R. et al. Nanobody: The «Magic Bullet» for Molecular Imaging? *Theranostics*. 2014; 4(4): 386–398.
11. De Genst E. et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103(12): 4586–4591.
12. Debets M.F. et al. Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting. *Macromolecular Bioscience*. 2013; 13: 938–945.
13. Desmyter A. et al. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015; 32: 1 – 8.
14. Detalle L. et al. Generation and characterisation of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 60: 6–13.
15. **Ellen R. Goldman et al.** Enhancing Stability of Camelid and Shark Single Domain Antibodies: An Overview. *Front Immunol*. 2017; 8: 865.
16. Estell D. et al. Adapting industry practices for the rapid, large-scale manufacture of pharmaceutical proteins. *The Bridge*. 2006; 36(3):39–44.
17. Gonzalez-Sapienza G. et al. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front Immunol*. 2017; 8: 977.
18. Hamers-Casterman C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–448.
19. Harmsen M. M., De Haard H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 77(1): 13–22.
20. Harmsen M.M. et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol*. 2000; 37(10): 579–590.
21. Hassanzadeh-Ghassabeh G. et al. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8(6): 1013–1026.
22. Hu Y., Liu C., Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1442.
23. Lauwereys M., Ghahroudi M. A. et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavychain antibodies. *EMBO J*. 1998; 17: 3512–3520.
24. Maass D. R. et al. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods*. 2007; 324: 13–25.
25. Mullard A. 2014 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015; 14: 77–81.
26. Muyldermans S. et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2009; 128: 178–183.
27. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu.Rev.Biochem*. 2013. V.; 82: 17.1–17.23.
28. Nguen V. K. et al. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*. 2000; 19(5): 921–930.
29. Nguyen V. K. et al. The Specific Variable Domain of Camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol*. 1998; 275(3): 413–418.
30. Nguyen V. K., Desmyter A., Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol*. 2001; 79: 261–296.
31. Nuttall S. D. et al. Isolation of a new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol. Immunol*. 2001; 38(4): 313–326.
32. Oriol Sunyer J. Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen. *Infect Disord Drug Targets*. 2012; 12(3): 200–212.
33. Pardon E. A. et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protocols*. 2014; 9(3): 674–693.
34. Pleiner T., Bates M. Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *Elife*. 2015; 4.
35. R. van der Linden et al. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods*. 2000; 240(1-2); 185–195.
36. Rahbarizadeh F. et al. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Immunol*. 2006; 43(5): 426–435.
37. Ryman J. T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics and System Pharmacology*. 2017; 6(9): 576–588.
38. Saerens D. et al. Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors (Basel)*. 2008; 8(8): 4669–4686.
39. Seligmann M. et al. Heavy chain diseases: current findings and concepts. *Immunological Rev*. 1979; 48: 145–167.
40. Sharkey R. M., Goldenberg D. M. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3: 349–370.
41. Steeland S. et al. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016; 21(7): 1076–1113.
42. Tilib S. V. «Camel Nanoantibody» is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy. *Molecular Biology*. 2011; 45(1): 66–73.
43. Van Heeke G. et al. Nanobodies as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2017; 169: 47–56.
44. Woolven B. P. et al. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*. 1999; 50(1-2): 98–101.
45. Yan J. et al. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library. *J. Nanobiotechnology*. 2015; 6: 13–33.
46. Yardehnavi N. et al. A camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against Hemiscorpius lepturus envenomation. *Faseb J*. 2014; 28(9): 4004–4014.
47. Zou T. et al. Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *Journal of Biotechnology*. 2015; 214: 147–155.