

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА И БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ИХ ОСНОВЕ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

Горшкова Е.Н.¹, Василенко Е.А.¹, Тиллиб С.В.², Астраханцева И.В.¹

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

² ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

Резюме. Около 20 лет назад у представителей семейства *Camelidae* в сыворотке крови были обнаружены особые неканонические антитела, состоящие только из укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких. За узнавание антигена у этих необычных антител отвечает только один вариабельный домен. Рекомбинантный белок, являющийся аналогом или производным такого антиген-узнающего вариабельного домена, получил название «однодоменное антитело» (sdAb), или «нанотело» (nanobody), иногда также его называют «наноантитело». С тех пор однодоменные антитела (наноантитела) и их производные нашли широкое применение во многих областях биологии и медицины, открыли новые перспективы для решения таких значимых проблем, как диагностика и терапия рака, инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также нейтрализация ядов и токсинов. Этот обзор посвящен современным исследованиям с применением наноантител, а также освещает перспективы их использования для создания новых диагностических и терапевтических препаратов.

Ключевые слова: однодоменные антитела, верблюжьи антитела, наноантитела, VHH, биспецифические антитела, биоинженерные препараты

SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND BIOENGINEERING DRUGS ON THEIR BASIS: NEW OPPORTUNITIES FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Gorshkova E.N.^a, Vasilenko E.A.^a, Tillib S.V.^b, Astrakhantseva I.V.^a

^a N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Almost 20 years ago, a unique class of antibodies devoid of L chains was discovered in *Camelidae* blood serum. Only one variable domain is responsible for antigen recognition in these unusual antibodies. A recombinant protein, which is analogue to such antigen-recognizing variable domain was called the single domain antibody (sdAb), “nanobody” or “nanoantibody”. The single-domain antibodies and their derivatives have been widely used in the field of biology, toxicology and medicine offering new opportunities for diagnosis and treatment of cancer, autoimmune diseases, infectious diseases, and for toxin neutralization. This review focuses on latest researches in the field and concerns some prospectives for creation of nanoantibody-based diagnostic and therapeutic drugs.

Keywords: single-domain antibodies, camel antibodies, nanoantibodies, VHH, bi-specific antibodies, bioengineered drugs

Адрес для переписки:

Горшкова Екатерина Николаевна
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
имени Н.И. Лобачевского»
603950, Россия, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.
Тел.: 8 (831) 419-90-64.
E-mail: e.n.gorshkova@gmail.com

Address for correspondence:

Gorshkova Ekaterina N.
N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Gagarin ave, 23.
Phone: 7 (831) 419-90-64.
E-mail: e.n.gorshkova@gmail.com

Образец цитирования:

Е.Н. Горшкова, Е.А. Василенко, С.В. Тиллиб,
И.В. Астраханцева «Однодоменные антитела
и биоинженерные препараты на их основе: новые
возможности для диагностики и терапии» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 505-520.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-505-520

© Горшкова Е.Н. и соавт., 2016

For citation:

E.N. Gorshkova, E.A. Vasilenko, S.V. Tillib,
I.V. Astrakhantseva “Single domain antibodies and
bioengineering drugs on their basis: new opportunities for
diagnostics and therapy”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 6,
pp. 505-520. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-505-520

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-505-520>

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ и Министерства образования и науки РФ (грант № 14.Z50.31.0008) и гранта РФФИ № 16-34-00561 мол_а, а также при частичной поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00081).

Введение

Рекомбинантные антитела широко используются в разных областях биотехнологии и медицины как инструмент для детекции и очистки биомолекул, для диагностики и терапии заболеваний. Разработка и применение терапевтических моноклональных антител относится к наиболее успешной и быстро растущей отрасли биомедицинских технологий. Однако их применение имеет некоторые ограничения, такие как высокая стоимость производства, хранения и поддержания клеток-продуцентов. Относительно большой размер классического антитела может препятствовать проникновению антитела в твердые ткани, а наличие константного домена приводит к повышению неспецифического фона при диагностических исследованиях. В связи с этим создание на основе иммуноглобулинов рекомбинантных молекул, в которых отсутствовали бы домены, не вовлеченные непосредственно в связывание антигена, является актуальной задачей. Большой прорыв в этой области связан с обнаружением у представителей семейства Верблюдовые (*Camelidae*) особых неканонических антител упрощенной структуры и созданием на основе их антиген-узнающих переменных доменов рекомбинантных производных, или однодоменных антител (также называемых наноантителами, или «nanobodies») [55]. Как и канонические антитела, наноантитела способны эффективно и избирательно связываться с широким спектром специфических антигенов. Небольшой размер (12-15 кДа) и другие структурные особенности наноантител в ряде случаев могут обеспечивать им преимущество в практических приложениях по сравнению с полноразмерными антителами, например, приводить к их лучшему проникновению в ткани, к меньшей неспецифической сорбции, к способности узнавать необычные, «скрытые» для классических антител конформационные эпитопы [31, 53]. Наноантитела хорошо связывают целевые молекулы при внутривенном введении, а не связавшиеся молекулы быстро выводятся через почки. Эти свойства позволяют рассматривать наноантитела и их производные в качестве перспективных инструментов для диагностики и терапии [4, 84, 115]. На сегодняшний день наноантитела используются как зонды для молекулярной визуализации, на их основе разрабатываются лекарственные средства, характеризующиеся быстрым и высокоспецифичным

молекулярным взаимодействием с ограниченным сроком действия во времени, такие как антикоагулянты или нейтрализаторы токсинов [64, 113]. Кроме того, небольшой размер наноантител позволяет создавать длительно циркулирующие в организме многомерные комплексы для терапии хронических заболеваний [65, 115, 120]. Таким образом, наноантитела и комплексы на их основе на данный момент представляют собой перспективный инструмент, который позволит в будущем эффективно решать диагностические и терапевтические задачи.

1. Особенности строения наноантител

До открытия наноантител наименьшим фрагментом природного происхождения, сохраняющим антиген-связывающую специфичность полноразмерного антитела, был синтетический продукт, состоящий из N-концевого переменного домена H-цепи (VH) и N-концевого переменного домена L-цепи (VL), соединенных коротким пептидным линкером (ScFv, молекулярная масса 30 кДа). Однако в 1993 г. группой бельгийских ученых было сообщено, что представители семейства *Camelidae*, помимо классических (рис. 1A), обладают уникальным классом антител («heavy-chain antibody», HCAb), представляющих собой димер укороченной на один домен (CH1) тяжелой цепи и при этом полностью лишенных L-цепей (рис. 1B) [55]. Подобные функциональные антитела позднее также были обнаружены у акул (*Orectolobus maculatus*, *Ginglymostoma cirratum*) и представителей семейства химеровых (*Chimaeridae*). У хрящевых рыб антитела (Ig-NAR) обладают гомодимерными H-цепями, каждая из которых состоит из одного переменного антиген-связывающего домена и пяти константных доменов (рис. 1B) [44]. Подробное исследование молекулярной организации антител верблюдов и хрящевых рыб показало, что антитела H2-типа распознают свой антиген одним единственным доменом: VH или V-NAR соответственно. Кристаллическую структуру VH можно описать формой вытянутого шара нанометрового размера (около 4,2 нм в длину и 2,5 нм в диаметре) (рис. 1Г) [30], поэтому соответствующее VH-домену однодоменное антитело получило название «nanobody» (нанотело), или «наноантитело» [4].

Подобно человеческому VH-домену VH-домен верблюда состоит из трех определяющих комплементарность гиперпеременных участков (CDR), разделенных четырьмя более консервативными каркасными (framework) областями (FR1-4), в совокупности образующими пространственную структуру из двух β-складчатых слоев. CDR-участки расположены внутри петель, соединяющих структурные элементы β-складчатого слоя и кластеризуются на одной стороне переменного домена, образуя паратоп [85].

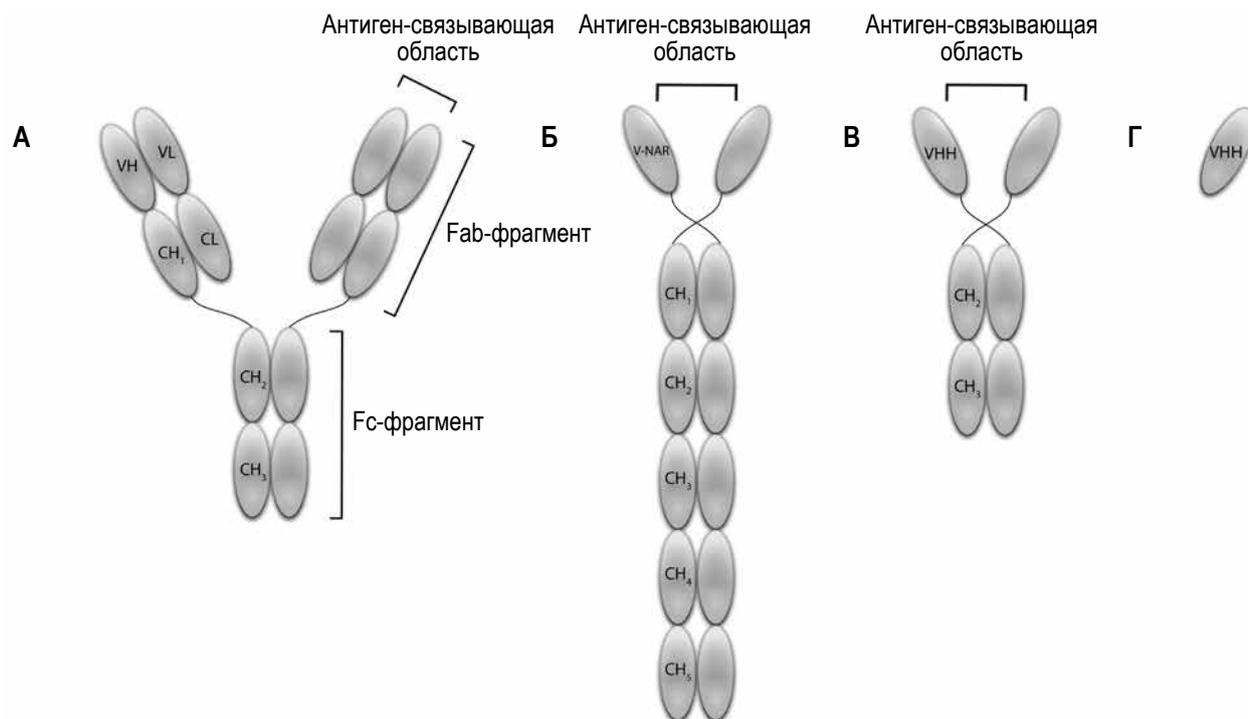


Рисунок 1. Схематическое изображение антител человека (А), хрящевых рыб (Б), представителей семейства *Camelidae* (В) и наноантител (Г)

Несмотря на схожесть структуры VH и VHH доменов, последний имеет ряд отличительных особенностей, в частности повышенную растворимость за счет замены гидрофобных аминокислот на более гидрофильные [56, 85] во втором каркасном участке и особое конформационное разнообразие, обеспечиваемое большей общей аминокислотной вариабельностью и заметным удлинением длины гипервариабельных участков CDR1 и CDR3, а также частым наличием дополнительных стабилизирующих пространственную структуру Cys-Cys-связей между гипервариабельными участками [23]. Такая структурная и пространственная организация антиген-связывающей петли VHH обеспечивает более эффективное взаимодействие с глубокими участками (щелями и бороздами) на поверхности антигена (например, с каталитическим центром ферментов), по сравнению с паратопами ScFv [31], что, в частности, позволяет модулировать функции мишени [59].

Наноантитела отличаются повышенной стабильностью и низкой склонностью к агрегации, могут храниться в течение нескольких месяцев при 4 °С и выдерживают нагревание до 60–80 °С, после чего сохраняют полную антиген-связывающую активность [85]. Наноантитела также устойчивы к денатурирующим условиям: высоким концентрациям мочевины и гуанидина [39] и, кроме того, обладают способностью к эффективной ренатурации («рефолдингу») [43]. Стабильность и специфичность связывания наноантител определяются преимущественно свойствами

аминокислот CDR3-последовательности [40], участвующей в образовании контактов с антигеном, и замена аминокислот в этой области может привести к существенной потере сродства к антигену [14]. Следствием небольшого размера наноантител является их быстрое выведение из организма через почки. В среднем время полужизни мономерных наноантител *in vivo* не превышает 2 ч, что намного короче времени полужизни моноклональных антител (мАт). Короткое время жизни идеально подходит для различных целей, включая мобилизацию стволовых клеток, нейтрализацию и выведение токсина, а также получение особо четких (с уменьшенным неспецифическим фоном) изображений *in vivo* [83]. С другой стороны, создание многомерных конструкций, ПЭГилирование или пришивка специальных белков (сывороточного альбумина) позволяет увеличить время полужизни наноантител до нескольких недель, что может быть необходимо при создании терапевтических агентов для лечения хронических заболеваний [124].

С целью генерирования антиген-специфических наноантител чаще всего в начале проводят иммунизацию представителей семейства Верблюдовые, обычно ламу, альпаку или одnogорбого верблюда, реже для иммунизации используют двугорбого верблюда [5]. После иммунизации проводят ПЦР-клонирование всего репертуара кодирующих последовательностей наноантител на базе выделенной РНК из лимфоцитов иммунизированного животного, после чего из полученной библиотеки последовательностей

методом фагового дисплея отбирают клоны наноантител с требуемой специфичностью.

Наноантитела не требуют посттрансляционных модификаций, поэтому они могут быть относительно просто синтезированы в самых различных экспрессионных системах. Чаще всего для аналитических целей их получают в специальных штаммах *E. coli* в виде растворимых и неагрегирующих рекомбинантных белков [9]. Высокий уровень продукции наноантител был также показан для дрожжевых систем, таких как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* [46]. Одним из альтернативных источников получения наноантител могут быть и трансгенные растения [95]. Было показано, что наноантитела, полученные в генномодифицированных растениях, имеют высокую биологическую активность [21].

2. Наноантитела как диагностические препараты

Эффективное и специфичное таргетирование в сочетании с быстрым выведением несвязавшегося белка из крови и тканей — отличительные черты наноантител, которые делают их идеальными маркерами для визуализации биологических процессов *in vivo* без повреждения органов и тканей исследуемого организма (биоимиджинг) [94]. Физико-химические свойства и небольшие размеры наноантител приводят к чрезвычайно быстрому распределению молекул по органам и тканям [47, 121].

При адаптации наноантитела для визуализации могут вводиться модификации в его аминокислотный состав, не нарушающие эффективность связывания. Например, было показано, что лизин в антиген-связывающих петлях наноантитела порой негативно влияет на эффективность взаимодействия с мишенью и может быть заменен на близкий по свойствам аминокислотный остаток, а введение определенных дополнительных аминокислот в каркасные области иногда может обеспечить улучшенную специфичность маркировки [47].

Наноантитела могут быть слиты с различными маркерами, используемыми для визуализации, такими как короткоживущие ПЭТ-радиоизотопы [48], флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) [54, 109], микропузырьки [38], флуоресцентные белки [78, 99, 118]. Это позволяет использовать их в ядерной томографии (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием радионуклидов), оптической томографии и для ультразвуковой визуализации с использованием микропузырьков.

Комплекс наноантитела, связанного с радиоактивным технецием ^{99m}Tc -7C12, был описан как перспективный зонд для неинвазивной радиоиммунной детекции рака, так как имел вы-

сокую степень поглощения опухолью, низкую аккумуляцию в печени, а также быстрое выведение из крови [47]. Меченые ^{99m}Tc наноантитела против паратоп М-белка, экспрессируемого 5T2-клетками множественной миеломы, были использованы для контроля прогрессирования заболевания неинвазивным путем при минимальных остаточных признаках заболевания [27]. Аналогичные комплексы ^{99m}Tc с наноантителами против маннозного рецептора макрофагов были использованы для мониторинга и количественной оценки воспаления суставов в коллаген-индуцированном артрите [93]. Наноантитела в качестве таргетных молекул были также использованы для неинвазивного доклинического скрининга молекул HER2 [92], фактора роста гепатоцитов (HGF) [124], простата-специфического мембранного антигена (PSMA) [42] с целью диагностики рака молочной железы, рака предстательной железы, а также для мониторинга терапии рака с помощью ОФЭКТ и ПЭТ [34]. Благодаря способности наноантител быстро и специфически связываться с антигенами, а также благодаря быстрому выведению несвязавшихся наноантител из крови, при использовании короткоживущих ПЭТ-радиоизотопов, шитых с наноантителами, значительно снижается нежелательная излучательная нагрузка на пациента [32].

Многофотонная микроскопия с использованием нанозондов, состоящих из квантовых точек, функционализированных наноантителами, была успешно использована для визуализации карциноэмбрионального антигена [54] и HER2 при раке легких и молочной железы [96].

Ультразвуковой имиджинг («imaging», визуализация) с использованием микропузырьков, соединенных стрептавидин-биотиновой связкой с наноантителами, специфичными к молекулам адгезии сосудистого эндотелия-1 (VCAM-1), позволил отслеживать изменение интенсивности отраженного сигнала в опухоли спустя 10 мин после введения [38].

Визуализация в ближней инфракрасной области (БИК) была успешно внедрена для получения изображений при наведении в хирургии. Так, наноантитела против рецептора эпидермального фактора роста, конъюгированные с IRDye 800CW, позволили при хирургическом вмешательстве в режиме реального времени визуализировать опухоли во время резекции ортотопического рака языка и шейных метастазов в лимфатических узлах [118]. С помощью этой же методики были получены изображения распределения в организме миелоидных клеток, что может быть полезным для диагностики иммунных и воспалительных реакций при онкологических или аутоиммунных заболеваниях [97].

Наноантитела, слитые с флуоресцентной меткой («chromobody»), могут быть использо-

ваны для визуализации внутриклеточных процессов [86, 99]. С помощью этого подхода исследователям удается достигать нанометрового пространственного разрешения с минимальной погрешностью при анализе живых клеток [34]. Использование наноантител в этом случае дает большое преимущество, поскольку обеспечивает максимальную точность при определении локализации единичных молекул ввиду много меньшего размера наноантител по сравнению с классическими антителами [60, 90]. Уже доказано, что «chromobodies» способны обнаруживать антигены в хроматине, репликационных комплексах, цитоскелете, и их использование позволяет визуализировать динамические изменения во время клеточного цикла в реальном времени [99]. А поликатионная реструктуризация поверхности наноантител позволяет облегчать их проникновение во внутриклеточное пространство [15].

Наноантитела, слитые с флуоресцентным белком, могут служить хорошим инструментом для формирования изображения при изучении динамики и функций внутриклеточных белков [74, 82]. Например, активность и эффективность флуоресцентного наноантитела против поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1) была подтверждена в экспериментах *in vitro*, что позволяет рассматривать их в качестве уникального и универсального инструмента для фундаментальных и прикладных исследований биологии PARP1 и репарации ДНК [16].

Также было показано, что с помощью флуоресцентных наноантител, способных связываться с виментином – белком промежуточных филаментов тканей мезодермального происхождения, можно отслеживать такие сложные процессы, как эпителиально-мезенхимальный переход, что впоследствии может сыграть важную роль в диагностике онкологических заболеваний [78]. Наноантитела, экспрессируемые непосредственно в исследуемой клетке, могут распознавать и отслеживать антигены в различных клеточных компартментах. Было создано «chromobody» против ядерной ламины, которое может применяться для визуализации ядерной оболочки в живых клетках, что позволяет их использовать, например, для изучения апоптоза [99]. Для исследований клеточного цикла была создана клеточная линия HeLa-CCC, в которой происходит экспрессия внутриклеточного функционального однодоменного антитела против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), слитого с красным флуоресцентным белком TagRFP (так называемое PCNA-chromobody). PCNA-chromobody опознает и описывает распределение эндогенного PCNA, не нарушая его функций. В последнее время данный подход был успешно применен в анализе клеточного цикла как на

уровне отдельной клетки, так и на организменном уровне [17, 88, 104].

Были разработаны наноантитела, которые имеют молекулярную массу 14,7 кДа и обладают сравнительно высокой аффинностью к TNF человека, при этом не влияют на биологическую активность этого цитокина. Полученные наноантитела могут стать платформой для создания многомерных конструкций, которые могут служить TNF-связывающим модулем для создания биоинженерных флуоресцентных сенсоров TNF, а также в качестве ингибиторов системных TNF-эффектов, работающих по принципу удержания TNF в месте его синтеза [3].

Относительная простота экспрессии однодоменных антител в различных системах по сравнению с рекомбинантными антителами делает наноантитела перспективными и экономически выгодными претендентами на использование в тест-системах для *in vitro* диагностики.

Были получены наноантитела, способные взаимодействовать с фактором роста эндотелия сосудов VEGF-A₁₆₅, который входит в число биомаркеров патологических состояний человека. Была показана возможность применения таких наноантител для количественной детекции VEGF A₁₆₅ с помощью иммуоферментного анализа, а также для блокировки биологической активности VEGF-A₁₆₅. Полученные результаты послужили основой для создания диагностикума для количественного определения VEGF-A₁₆₅, а также разработки на основе наноантител препарата для блокировки VEGF-A₁₆₅-зависимого патологического неоангиогенеза [6]. Также было показано, что наноантитела способны связываться с ионами меди, что открывает новые возможности для развития окислительно-восстановительных систем детекции на основе белков, таких как твердотельное электрохимическое зондирование [108]. Легкость манипулирования способна сделать их идеальными кандидатами на роль элементов распознавания в биосенсорных платформах. Кроме того, небольшой размер наноантител может послужить большим преимуществом при создании диагностических систем с высокой степенью чувствительности при минимальном объеме образца [106].

Было показано, что наноантитела могут проникать и через гематоэнцефалический барьер, предположительно путем трансцитоза [7, 100]. Кроме этого, благодаря своему строению (маленькому размеру и высокой пластичности) наноантитела могут распознавать эпитопы, которые не являются иммуногенами для классических моноклональных антител [31, 36, 37]. Так, было описано, что наноантитела распознают олигомерные формы бета-амилоида, что может позволить использовать их в диагностике болезни Альцгеймера [76].

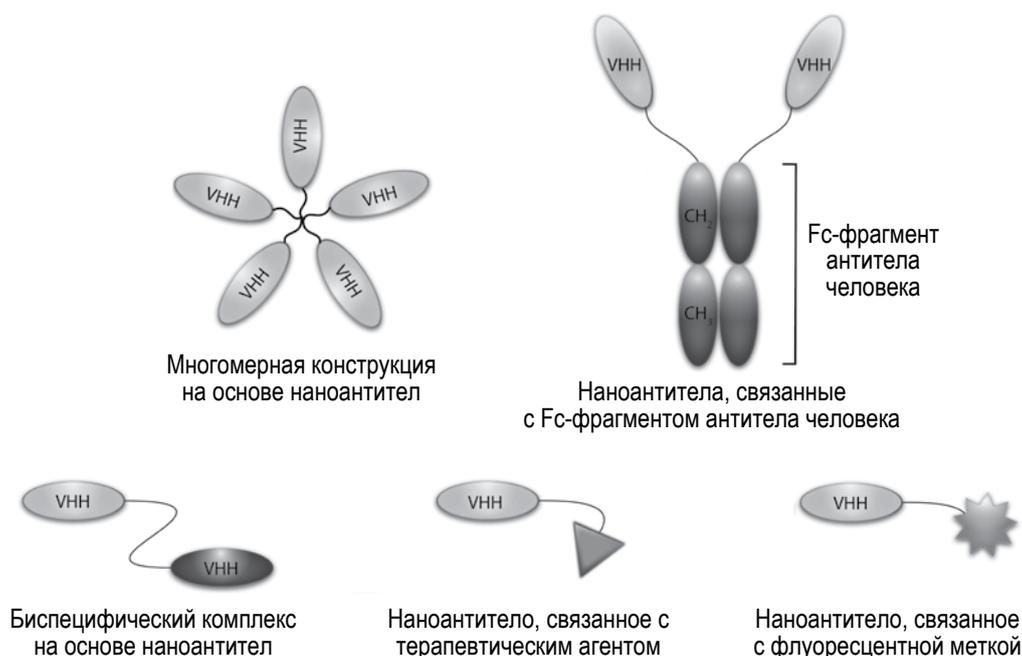


Рисунок 2. Варианты терапевтических конструкций, созданных на основе наноантител

3. Применение наноантител в терапии

Появление устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов потребовало разработки новых стратегий лечения, например, использование антител, которые, в отличие от антибиотиков, могут распознавать широкий спектр антигенов, нейтрализовать факторы вирулентности, помогающие иммунной системе хозяина взаимодействовать с микроорганизмом, а также предотвращать рецидивы заболевания [66]. Кроме того, антитела используются в лечении вирусных инфекций [103, 122] и для нейтрализации токсинов [63, 64, 126]. Появление цитокин-нейтрализующих антител совершило переворот в терапии ревматоидного артрита, псориаза и других хронических воспалительных заболеваний [1]. Таргетная терапия онкологических процессов с использованием моноклональных антител также активно прогрессирует в течение последних 30 лет [49].

Способность наноантител преодолевать гемато-энцефалический барьер [100], их устойчивость к протеолитической деградации в желудочно-кишечном тракте [58], возможность ингаляционного введения являются значимыми преимуществами использования наноантител в качестве терапевтических агентов [119]. Важным фактором технологического использования наноантител является низкая себестоимость процесса, высокий выход продукта и разнообразие продуцирующих штаммов: ими могут быть грамположительные бактерии *L. Paracasei* (используют для производства сыра) [68], грамотрицательные бактерии и низшие эукариоты, такие как *S. cerevisiae* [122]. Кроме того, одно-

доменная структура наноантител позволяет формировать поливалентные или мультиспецифические конструкторы, которые могут служить удобным инструментом для создания модифицированных и многофункциональных агентов. Небольшой размер генных фрагментов наноантител (около 400 п.н.) облегчает последующие молекулярные манипуляции для создания различных поливалентных комплексов [102], которые дают многократное увеличение avidности по сравнению с исходными одновалентными структурами [79]. Бивалентные наноантитела могут быть соединены линкером [22] или связаны с Fc-фрагментом классического антитела, который может вызывать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность. Для продукции таких комплексов могут использоваться различные экспрессионные системы [29, 33]. Многообразие комплексов на основе наноантител представлено на рисунке 2.

Мультимеризация позволяет продлить время жизни наноантител в организме, что является важным при использовании их как терапевтических агентов для лечения хронических заболеваний. С этой целью в том числе используется восстановление генно-инженерных наноантител до полноразмерной формы путем добавления Fc-области, что продлевает время пребывания наноантител в кровотоке за счет увеличения размера молекулы [63]. Используется также сшивка наноантител с сывороточным альбумином. Было показано, что время выведения из организма таких антител увеличивается во много раз, и данная тенденция не является видоспецифичной [65].

3.1. Наноантитела для терапии бактериальных и вирусных инфекций

Одним из видов патогенных микроорганизмов, которые могут служить мишенью для терапевтических наноантител, являются бактерии *Mycoplasma hominis*, участвующие в развитии не только воспалительных заболеваний органов малого таза, но и в последующей онкологической трансформации (например, рака простаты). Специфическое наноантитело аMh против *M. hominis* было слито с Fc-фрагментом IgG для улучшения проникновения в слизистые оболочки половых путей, что оказало не только лечебное, но и профилактическое воздействие в мышинной модели генитальной инфекции *M. hominis* [18]. В этой работе также была продемонстрирована возможность эффективной доставки и последующей внутриклеточной экспрессии генов наноантител с помощью вектора на основе модифицированного аденовируса.

Наноантитела против рекомбинантного белка UreC специфически связывают мишень и ингибируют активность уреазы, что может быть использовано для борьбы с *Helicobacter pylori*, вызывающей развитие гастрита, дуоденита и других заболеваний [10]. Применение антибиотиков не только уничтожает полезную микрофлору кишечника, но и является одной из главных причин развития тяжелых инфекционных заболеваний, таких как псевдомембранозный колит, возбудителем которого является *Clostridium difficile*. SLP-специфические наноантитела из ламы, направленные на специфическое узнавание поверхностных белков *C. difficile*, продемонстрировали ингибирующий эффект в отношении жизнедеятельности этих бактерий [71].

Поливалентные наноантитела, состоящие из VHH-доменов, могут стать мощным инструментом для терапии резистентных вирусных инфекций, обусловленных высокой вариабельностью вируса, в том числе ВИЧ, вирусов гриппа, гепатита В и некоторых других [12, 67].

Создание двух- или трехвалентного наноантитела против высокопатогенного вируса гриппа H5N1 путем слияния генетической последовательности нескольких H5-специфических моновалентных наноантител, разделенных глицин-сериновым линкером, значительно увеличивало их нейтрализующую активность [69]. Для увеличения противовирусной активности наноантител может быть использовано форматирование, включающее в себя добавление особого типа биспиральных последовательностей — изолейциновых молний. Было показано, что внутрибрюшинное или интраназальное введение полученных после такой модификации наноантител за 2 ч до или через 24 ч после вирусного заражения способно специфически защищать мышей от летальной инфекции вирусом гриппа H5N2 [111].

В качестве альтернативы классической вакцины для защиты от вируса бешенства также могут служить наноантитела. Примером могут послужить наноантитела лам, иммунизированных инактивированной антирабической вакциной Merieux HCDV (генотип 1). При этом мультимеризация этих моновалентных наноантител способна многократно (на 3–4 порядка) увеличивать их нейтрализующие свойства [67].

Наноантитела могут использоваться также для нейтрализации пикорнавирусов, таких как вирус полиомиелита [110] и вирус ящура [57].

Одной из потенциально перспективных альтернатив терапии ротавирусов может быть пероральное использование *S. cerevisiae*, продуцирующих нейтрализующие наноантитела. Такой подход продемонстрирован в мышинной модели ротавирусной инфекции [116]. Использование для той же цели лактобактерий позволяет усилить противовирусный эффект *in vivo*, по-видимому, за счет продукции ими лактата [87].

Одной из наиболее острых задач остается разработка эффективной терапии ВИЧ-инфекции. Мультимеризация белка Rev необходима для экспорта мРНК ВИЧ в цитоплазму, где происходит репликация вируса, что делает этот белок перспективной терапевтической мишенью. Было получено наноантитело Nb190, которое способно ингибировать белок-белковое взаимодействие, не только затрудняя мультимеризацию Rev, но также способствуя разборке уже существующих мультимеров. В итоге было показано, что экспрессия Nb190 в цитоплазме способна дозозависимо ингибировать продукцию ВИЧ [123]. В 2007 году Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA), а также Европейской комиссией был утвержден препарат Maraviroc (Selzentry, или Celsentri) — антагонист рецептора CCR5 — белка, способствующего проникновению ВИЧ в клетку. Этот препарат претовращает взаимодействие белка gp120 ВИЧ с этим корецептором. Однако ВИЧ может задействовать и другие корецепторы, такие как CXCL12/CXCR4 [84], что предполагает использование их антагонистов для блокировки вируса. Наноантитела, селективно связывающие человеческий CXCR4, эффективно ингибировали репликацию ВИЧ *in vitro*, а также дозозависимо индуцировали мобилизацию стволовых клеток *in vivo* у макаков [70]. За счет взаимодействия с сайтом связывания CD4, эти наноантитела способны нейтрализовать передачу вируса от макрофагов Т-клеткам. При этом наноантитело VHHJ3, восстановленное до полноразмерного Fc, обладало большей нейтрализующей активностью по сравнению с его укороченной формой [80].

Инфицирование вирусом герпеса HSV-2 увеличивает риск заражения ВИЧ [45]. Использо-

вание наноантитела к гликопротеину D (gD2), экспрессируемому на поверхности вириона и обеспечивающего его проникновение в клетки, для профилактики и лечения HSV-2 проиллюстрировано на примере животных моделей заболевания [20]. Наноантитела, связывающие gD2 с помощью R33 домена, не нейтрализовали вирус, однако объединение R33 с цитотоксическим доменом эндотоксина A из *Pseudomonas aeruginosa* позволяло эффективно уничтожать инфицированные вирусом клетки [51]. Были также разработаны наноантитела против филовирсов, например, вируса Марбурга – возбудителя геморрагической лихорадки, они описаны в работе Sherwood и соавт. [105].

Вторую фазу клинических испытаний на данный момент проходят терапевтические наноантитела ALX-0171 (Ablynx) против респираторно-синцитиальновирусной инфекции у детей раннего возраста, которые представляет собой трехвалентное наноантитело, ингибирующее репликацию респираторно-синцитиального вируса путем связывания F-белка на его поверхности и тем самым предотвращая проникновение вируса в клетки [91].

Существует и ряд других возможных применений для наноантител и конструкторов на их основе. Например, возможно создание поливалентных наноантител, распознающих различные эпитопы, что может стать мощным инструментом для терапии резистентных вирусных инфекций [122]. Возможно использование нейтрализующих свойств наноантител и в биотехнологическом производстве, где наноантитела могут выступать в качестве агентов, предотвращающих связывание бактериофагов с их рецепторами, экспрессируемыми на поверхности молочнокислых бактерий. Было показано, что наноантитела против хвостового белка фага TP901-1, обеспечивающего его адгезию на поверхности лактококковых бактерий, полностью нейтрализуют инфекционную активность фага даже после 15 пассажей [35].

3.2. Наноантитела для нейтрализации ядов и токсинов

Антитела замечательны в их способности инактивировать даже самые мощные токсины растений, животных и микробные токсины, в том числе ботулизма, столбняка, дифтерии, сибирской язвы. Как уже упоминалось выше, небольшой размер наноантител, по сравнению с классическими антителами, позволяет создавать многомерные конструкции и эффективно экспрессировать наноантитела в различных системах. Благодаря этим свойствам, а также способности наноантител узнавать особые конформационные эпитопы, например, такие, как активные центры ферментов, использование наноантител может обеспечить более эффективную нейтрализацию токсинов.

Так, биспецифическая конструкция (NbF12-10), содержащая наноантитела NbAahIF12 и NbAahII10, способные эффективно нейтрализовать яд скорпиона *Androctonus Australis*, проявляла гораздо более высокий уровень защиты по сравнению с классической Fab'-терапией [28]. Введение NbF12-10 грызунам *in vivo* не только эффективно предотвращало гемодинамические нарушения, индуцированные летальной дозой яда, но также восстанавливало сердечный ритм и нормализовало кровяное давление у животных [64].

Путем иммунизации одногорбого верблюда ядом скорпиона *Hemiscorpius lepturus* были получены функциональные рекомбинантные наноантитела F7Nb против геминекролизна – самого известного гемолитического и дермoneкротического токсина. Исследования F7Nb *in vivo* показали ингибирование гемолитической активности у всех подопытных животных [63].

Гетеродимеры наноантител в отличие от гомодимеров способны защищать мышей от летальной дозы рицина, несмотря на одинаковую аффинность к рициновому голотоксину и схожие значения концентраций полумаксимального ингибирования (IC50), полученные в ходе цитотоксического теста *in vitro*. Это связано со способностью гетеродимеров провоцировать агрегацию токсина в растворе, что облегчает их связывание в комплекс токсин-антитело на поверхности клеток [61].

Обычно борьба с ботулиническим токсином подразумевает внутривенную инъекцию антисыворотки или моноклональных антител, однако в случаях интоксикации детей через пищеварительный тракт усугубляющим фактором является низкий уровень нормальной микрофлоры, в связи с чем возникает необходимость искать более эффективные терапевтические агенты. В качестве таких агентов могут выступать хлоропласты зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, продуцирующие VHN мозолоногах, способный связывать ботулинический нейротоксин серотипа A *in vitro* и защищать первичные нейроны крыс *in vivo*. В экспериментах было показано, что пероральное введение таких зеленых водорослей позволяет эффективно нейтрализовать влияние токсина в желудке и тонком кишечнике [11].

Были получены наноантитела, направленные на нейтрализацию компонентов токсинов бактерии *Clostridium difficile*, которая служит основной причиной антибиотик-ассоциированной диареи у госпитализированных пациентов. Гипервирулентные штаммы этого микроорганизма, служащие причиной наиболее высокого уровня смертности, дополнительно производят бинарный токсин CDT (*Clostridium difficile* трансфераза), состоящий из ферментативной субъединицы CdtA, и связывающуюся с рецептором субъединицу CdtB, против которых и были получены

наноантитела. Эти наноантитела могут быть использованы в качестве инструментов для исследований, диагностики и терапии *Clostridium difficile*-ассоциированных заболеваний [114].

3.3. Наноантитела для терапии онкологических заболеваний

Основной стратегией для таргетной терапии онкологических заболеваний является возможность выявлять факторы роста, транскрипционные факторы или рецепторы, экспрессия которых отличается на раковых клетках и их «нормальных» аналогах. Терапевтические антитела способны специфически нацеленно нарушать молекулярные пути, лежащие в основе туморогенеза [50].

Наибольшее распространение на сегодняшний день получило использование противоопухолевых наноантител, связывающихся с различными опухолеассоциированными антигенами [26]. Мишенью для таких наноантител, например, может служить карциноэмбриональный антиген (КЭА), который экспрессируется на опухолевых клетках. Противоопухолевая эффективность была показана в случае анти-КЭА наноантител, слитых с бета-лактамазой, которая в норме не экспрессируется в организме. Входящая в состав препарата бета-лактамаза при связывании наноантитела с КЭА трансформируется из нетоксичной в токсичную форму, тем самым убивая опухолевые клетки [25].

Мишенью для противоопухолевой терапии могут быть трансмембранные белки на поверхности опухолевых клеток. К ним относятся рецепторы фактора роста, такие как EGFR1 и EGFR2 (HER1 и HER2 соответственно), VEGFR2, C-Met и CXCR7 [72]. Наноантитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) были разработаны Roovers и др. посредством отбора фагового дисплея в сочетании с конкурентным элюированием с EGF или цетуксимабом, с целью выбрать антагонистические анти-EGFR наноантитела (в числе которых наноантитела IA1 или EGa1) [98]. Некоторые наноантитела против HER2 были отобраны с помощью фагового дисплея на иммобилизованных молекулах HER2 или на клетках, обладающих высоким уровнем экспрессии HER2 [73]. Биспецифические антитела HER2-S-Fab, способные специфически связываться с рецептором эпидермального фактора роста человека (HER2) с помощью Fab-фрагмента препарата моноклонального антитела Трастузумаб и с помощью наноантитела VNH, связывающиеся с CD16-антигеном на поверхности иммунных клеток, продемонстрировали высокую противоопухолевую активность против клеток с HER2-гиперэкспрессией за счет NK-клеточного лизиса [77].

Было также получено наноантитело против рецептора сосудистого эндотелиального фактора

роста 2 (VEGFR2), повышенный уровень которого продемонстрирован для многих видов опухолей [13].

Разработаны наноантитела, блокирующие работу рецептора c-Met, который активируется под действием фактора роста гепатоцитов (HGF) и участвует в клеточной пролиферации при таких заболеваниях, как рак толстой кишки, рак груди, рак яичников, а также при гемобластозах. Было показано, что анти-c-Met-наноантитело способно связываться с HGF, тем самым ингибируя активацию c-Met, пролиферацию и миграцию клеток *in vitro* [52].

Помимо указанных выше, были также получены наноантитела против активирующего ряда сигнальных путей хемокинового рецептора CXCR7, гиперэкспрессия которого наблюдается при раке молочной железы и раке легких [81].

Кроме того, в качестве перспективных агентов в противоопухолевой терапии могут выступать наноантитела против гликопротеинов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, например, против MUC-1, гиперэкспрессия которого характерна для рака прямой кишки и рака груди [101].

Для терапии онкологических процессов также были разработаны высокоселективные наноантитела, связывающие и блокирующие активность костных морфогенетических белков разных типов, которые участвуют как в физиологических, так и патологических процессах, в том числе канцерогенезе и опухолевой прогрессии [19].

Была показана возможность создания и использования мишень-специфических носителей на основе рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН), содержащих на поверхности направляющее наноантитело. РПАН конструировались на основе генома аденовируса человека серотипа 5 с модифицированным геном капсидного белка pIX (Ad5-EGFP-pIX-ER). Такие РПАН способны с высокой аффинностью связывать на своей поверхности соответственно модифицированные наноантитела, специфически узнающие раково-эмбриональный антиген. Было показано, что Ad5-EGFP-pIX-ER, несущий на поверхности aCEA-RE, способен в 3 раза более эффективно проникать в опухолевые клетки, чем немодифицированные РПАН и препарат Ad5-EGFP-pIX-ER без адсорбции наноантител на поверхности капсида [2].

Свою эффективность продемонстрировали конъюгаты наноантител для целевого воздействия фотосенсибилизаторов на опухоли [8, 107, 117]. Например, были разработаны комплексы, состоящие из наноантитела, направленного на рецептор EGFR, и фотосенсибилизатора (IRDye700DX). Они позволяют идентифицировать клеточные линии с различными уровнями экспрессии EGFR, а также специфически инду-

цировать гибель EGFR-экспрессирующих клеток в наномолярных концентрациях [62]. Кроме того, такой подход позволяет не только проводить терапию онкологического заболевания, но и комбинировать данный процесс с имиджингом опухолевых тканей.

Одним из перспективных направлений противоопухолевой терапии на основе наноантител можно назвать применение комплексов с использованием радиоактивных изотопов (^{99m}Tc , ^{89}Zr , ^{177}Lu). Такие комплексы обладают рядом преимуществ, связанных с особенностями самих наноантител. Например, они обладают быстрой диффузией и активной кинетикой клиренса в организме. Кроме того, они способны эффективно и направленно связываться с мишенями, исключая неспецифическое связывание [27].

3.4. Наноантитела для терапии аутоиммунных заболеваний

Дорогостоящие антицитокиновые препараты, используемые при терапии аутоиммунных заболеваний, могут быть заменены более эффективными и экономически выгодными терапевтическими препаратами на основе наноантител [85]. На сегодняшний день целый ряд препаратов и их прототипов проявили себя в качестве эффективных агентов для иммунотерапии.

TNF-блокирующие наноантитела были выделены из лам, иммунизированных с помощью мышинового и человеческого TNF. Путем слияния анти-TNF наноантител были получены двухвалентные комплексы с повышенной avidностью и более эффективной TNF-нейтрализующей активностью. Данные комплексы более эффективно блокировали TNF по сравнению с коммерческими блокаторами на основе классических моноклональных антител (инфликсимаб и адалимумаб) [24].

Разработаны терапевтические наноантитела против ревматоидного артрита (Vobarilizumab [ALX-0061], Ozoralizumab [ATN-103]), псориаза (ALX-0761) и системной красной волчанки (ALX-0061). Все они на данный момент проходят разные стадии клинических испытаний. ALX-0061, содержащий анти-IL-6R наноантитело, обладает сильным сродством к растворимому IL-6R и блокирует передачу сигнала IL-6 [120]. Эффективность и прочность связывания с IL-6, а также терапевтических эффектов данного препарата были подтверждены *in vivo* на приматах. Терапевтический эффект озорализумаба (ozoralizumab) основан на нейтрализации TNF [75]. Препарат ALX-0761 проявляет нейтрализующую активность в отношении IL-17 и представляет собой трехвалентное антитело, специфически связывающееся с IL-17A, IL-17F и человеческим сывороточным альбумином [112]. Пролонгированное действие всех этих препаратов обеспечивается за счет связи с сыво-

роточным альбумином. Такой подход к обеспечению продолжительной циркуляции активных веществ в крови очень характерен для препаратов на основе цитокиновых антител для лечения аутоиммунных заболеваний, поскольку данные заболевания зачастую представляют собой хронический воспалительный процесс [120].

Еще одним возможным вариантом антицитокиновой терапии аутоиммунных заболеваний может являться блокировка TNF из определенных клеточных источников. В работе Efimov et al. была оценена возможность ингибирования TNF миелоид-специфичными ингибиторами (MYSTI) – биспецифическими антителами, созданными на основе наноантител. Они способны связываться с молекулой F4/80 на поверхности миелоидных клеток, одновременно связывая и блокируя биологическую активность человеческого TNF. Эффективность полученных ингибиторов была показана как на культуре макрофагов, полученных из гуманизированных по TNF мышей, так и на самих животных в модели острой LPS/D-галактозамин-индуцированной гепатотоксичности [41].

Были разработаны наноантитела против компонентов системы свертывания крови и склонных к агрегации белков, вовлеченных в процессы развития амилоидных заболеваний. Эти однодоменные антитела, полученные из иммунизированной ламы, имеют способность специфически связывать активированную форму фактора фон Виллебранда (vWF) – ключевого компонента каскада свертывания крови, опосредующего прикрепление тромбоцитов к стенке сосудистого эндотелия. Эти наноантитела могут найти применение в определении уровня активированного фактора Виллебранда в образцах сыворотки [125]. Аналогичные vWF-специфические наноантитела (caplacizumab) уже прошли II фазу клинических испытаний в качестве антитромботического препарата, показав дозозависимое полное ингибирование vWF [89].

Заключение

В данном обзоре в краткой форме изложены разнообразные примеры диагностического и терапевтического использования однодоменных антител (наноантител). Благодаря их структурным особенностям, малому размеру, возможности эффективно конъюгировать с различными молекулами, а также использовать для создания многокомпонентных и многовалентных конструкций, наноантитела, очевидно, представляют собой очень перспективный формат антиген-связывающих молекул. Возможность легко объединять и комбинировать наноантитела с различными специфичностями связывания может быть использована для создания высоко-

селективных и высокоактивных кандидатов на роль лекарственных средств с очень привлекательными фармакологическими характеристиками. Такая стратегия позволяет улучшать свойства этих молекул: увеличивать время выведения из организма, усиливать связь с лигандом или с применением флуоресцентных, магнитных или радиоактивных меток, совмещать терапию с диагностикой. Увеличение количества исследований в данном направлении и наличие пре-

паратов, проходящих клинические испытания, свидетельствуют об их больших перспективах для применения в науке и медицине.

Благодарности

Авторы благодарят С.А. Недоспасова за помощь в подборе материалов для обзора и ценные комментарии и Л.А. Истомина за помощь в подготовке иллюстраций.

Список литературы / References

1. Астраханцева И.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Современная антицитокиновая терапия аутоиммунных заболеваний // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1607-1618. [Astrakhantseva I.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Modern anti-cytokine therapy of autoimmune diseases. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1308-1321. (In Russ.)]
2. Гарас М.Н., Тиллиб С.В., Зубкова О.В., Рогожин В.Н., Иванова Т.И., Васильев Л.А. Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно связываться с наноантителами // Acta Naturae (русскоязычная версия), 2014. Т. 2, № 6. С. 102-113. [Garas M.N., Tillib S.V., Zubkova O.V., Rogozhin V.N., Ivanova T.I., Vasilev I.A., Logunov D.Yu., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Esmagambetov I.B., Gribova I.Yu., Bandelyuk A.S., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Construction of a pix-modified adenovirus vector able to effectively bind to nanoantibodies for targeting. *Acta Naturae (russkoyazychnaya versiya) = Acta Naturae*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 95-105. (In Russ.)]
3. Ефимов Г.А., Хлопчатникова З.В., Сазыкин А.Ю., Друцкая М.С., Круглов А.А., Шилов Е.С., Кучмий А.А., Недоспасов С.А., Тиллиб С. В. Получение и характеристика нового рекомбинантного однодоменного антитела, специфически связывающегося с TNF человека // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6, № 4. С. 337-345. [Efimov G.A., Khlopchatnikova Z.V., Sazikin A.Yu., Drutskaya M.S., Shilov E.S., Kuchmiy A.A., Nedospasov S.A., Tillib S.B. Isolation and characteristics of a new recombinant single domain antibody that specifically binds to human TNF. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunology Journal*, Vol. 6, no. 4, pp. 337-345. (In Russ.)]
4. Тиллиб С.В. «Верблюжья наноантитела» – эффективный инструмент для исследований, диагностики и терапии // Молекулярная биология, 2011. Т. 45, № 1. С. 77-85. [Tillib S.V. «Camel nanoantibody» is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2011, Vol. 45, no. 1, pp. 66-73. (In Russ.)]
5. Тиллиб С.В., Вячанин А.С., Муилдерманс С. Молекулярный анализ структуры особых антител *Camelus bactrianus*, состоящих только из тяжелых цепей // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1382-1390. Tillib S.V., Vyatchanin A.S., Muyltermans S. Molecular analysis of heavy chain-only antibodies of *Camelus bactrianus*. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12. pp. 1382-1390. (In Russ.)]
6. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Лысюк Е.Ю., Ларин С.С., Кибардин А.В., Коробко Е.В., Вихрева П.Н., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Коробко И.В. Наноантитела для детекции и блокирования биологической активности фактора роста эндотелия сосудов A165 человека // Биохимия, 2012. Т. 77, № 6. С. 659-665. [Tillib S.V., Ivanova T.I., Lyssuk E.Yu., Larin S.S., Kibardin A.V., Korobko E.V., Vikhrev P.N., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Korobko I.V. Nanoantibodies for detection and blocking of bioactivity of human vascular endothelial growth factor A165. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2012, Vol. 7, no. 6, pp. 659-665. (In Russ.)]
7. Abulrob A., Sprong H., van Bergen En Henegouwen P., Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem.*, 2005, Vol. 95, pp. 1201-1214.
8. Abu-Yousif A.O., Moor A.C.E., Zheng X., Savellano M.D., Yu W., Selbo P.K., Hasan T. Epidermal growth factor receptor-targeted photosensitizer selectively inhibits EGFR signaling and induces targeted phototoxicity in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.*, 2012, Vol. 321, pp. 120-127.
9. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005, Vol. 24, pp. 501-519.
10. Ardekani L.S., Gargari S.L.M., Rasooli I., Bazl M.R., Mohammadi M., Ebrahimzadeh W., Bakherad H., Zare H. A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *Int. J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 17, pp. e723-e728.
11. Barrera D.J., Rosenberg J.N., Chiu J.G., Chang Y.-N., Debatis M., Ngoi S.-M., Chang J.T., Shoemaker C.B., Oyler G.A., Mayfield S.P. Algal chloroplast produced camelid V_HH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnol. J.*, 2015, Vol. 73, pp. 389-400.
12. Beekwilder J., van Houwelingen A., van Beckhoven J., Speksnijder A. Stable recombinant alpaca antibodies for detection of Tulip virus X. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2008, Vol. 121, pp. 477-485.
13. Behdani M., Zeinali S., Khanahmad H., Karimipour M., Asadzadeh N., Azadmanesh K., Khabiri A., Schoonoghe S., Habibi Anbouhi M., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Muyltermans S. Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. *Mol. Immunol. Elsevier Ltd*, 2012, Vol. 50, pp. 35-41.
14. Bond C.J., Marsters J.C., Sidhu S.S. Contributions of CDR3 to VHH domain stability and the design of monobody scaffolds for naive antibody libraries. *J. Mol. Biol.*, 2003, Vol. 332, pp. 643-655.
15. Bruce V.J., Lopez-Islas M., McNaughton B.R. Resurfaced cell-penetrating nanobodies: A potentially general scaffold for intracellularly targeted protein discovery. *Protein Sci.*, 2016, Vol. 25, no. 6, pp. 1129-1137.

16. Buchfellner A., Yurlova L., Nüske S., Scholz A.M., Bogner J., Ruf B., Zolghadr K., Drexler S.E., Drexler G.A., Girst S., Greubel, Reindl C., Siebenwirth J., Romer C., Friedl T., Friedl A.A., Rothbauer U. A new nanobody-based biosensor to study endogenous PARP1 *In vitro* and in live human cells. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, p. e0151041.
17. Burgess A., Lorca T., Castro A. Quantitative live imaging of endogenous DNA replication in mammalian cells. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, pp. e45726.
18. Burmistrova D.A., Tillib S.V., Shcheblyakov D., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Zubkova O.V., Ivanova T.I., Tukhvatulin A.I., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Genetic passive immunization with adenoviral vector expressing chimeric nanobody-Fc molecules as therapy for genital infection caused by *Mycoplasma hominis*. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, pp. e0150958.
19. Calpe S., Wagner K., El Khattabi M., Rutten L., Zimmerlin C., Dolk E., Verrips C.T., Medema J.P., Spits H., Krishnadath K.K. Effective inhibition of bone morphogenetic protein function by highly specific llama-derived antibodies. *Mol. Cancer Ther.*, 2015, Vol. 14, pp. 2527-2540.
20. Chen J., Davé S.K., Simmons A. Prevention of genital herpes in a guinea pig model using a glycoprotein D-specific single chain antibody as a microbicide. *Viol. J.*, 2004, Vol. 1, p. 11.
21. Conrad U., Plagmann I., Malchow S., Sack M., Floss D.M., Kruglov A.A., Nedospasov S.A., Rose-John S., Scheller J. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 22-31.
22. Conrath K.E., Lauwereys M., Galleni M., Matagne A., Frère J.M., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, Vol. 45, no. 10, pp. 2807-2812.
23. Conrath K.E., Wernery U., Muyldermans S., Nguyen V.K. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, Vol. 27, no. 2, pp. 87-103.
24. Coppieters K., Dreier T., Silence K., de Haard H., Lauwereys M., Casteels P., Beirnaert E., Jonckheere H., van de Wiele C., Staelens L., Hostens J., Revets H., Remaut E., Elewaut D., Rottiers P. Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, no. 6, pp. 1856-1866.
25. Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P., Wernery U., de Baetselier P. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, pp. 2853-2857.
26. Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh Gh.G., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., De Baetselier P., Revets H. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer*, 2002, Vol. 98, no. 3, pp. 456-462.
27. D'Huyvetter M., Xavier C., Cavelliers V., Lahoutte T., Muyldermans S., Devoogdt N. Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2014, Vol. 11, no. 12, pp. 1939-1954.
28. Darvish M., Behdani M., Shokrgozar M.A., Pooshang-Bagheri K., Shahbazzadeh D. Development of protective agent against *Hottentotta saulcyi* venom using camelid single-domain antibody. *Mol. Immunol. Elsevier Ltd*, 2015, Vol. 68, no. 2, pp. 412-420.
29. de Buck S., Nolf J., de Meyer T., Viridi V., de Wilde K., van Lerberge E., van Droogenbroeck B., Depicker A. Fusion of an Fc chain to a VHH boosts the accumulation levels in arabidopsis seeds. *Plant Biotechnol. J.*, 2013, Vol. 11, no. 8, pp. 1006-1016.
30. de Genst E., Saerens D., Muyldermans S., Conrath K. Antibody repertoire development in camelids. *Dev. Comp. Immunol.*, 2006, Vol. 30, no. 1-2, pp. 187-198.
31. de Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S., Wyns L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, Vol. 103, no. 12, pp. 4586-4591.
32. de Groeve K., Deschacht N., de Koninck C., Cavelliers V., Lahoutte T., Devoogdt N., Muyldermans S., de Baetselier P., Raes G. Nanobodies as tools for *in vivo* imaging of specific immune cell types. *J. Nucl. Med.*, 2010, Vol. 51, no. 5, pp. 782-789.
33. de Meyer T., Laukens B., Nolf J., van Lerberge E., de Rycke, R. de Beuckelaer A., de Buck S., Callewaert N., Depicker A. Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*. *Plant Biotechnol. J.*, 2015, Vol. 13, no. 7, pp. 938-947.
34. de Meyer T., Muyldermans S., Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol. Elsevier Ltd*, 2014, Vol. 32, no. 5, pp. 263-270.
35. Desmyter A., Farenc C., Mahony J., Spinelli S., Bebeacqua C., Blangy S. Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *PNAS*, 2013, Vol. 110, pp. E1371-E1379.
36. Desmyter A., Spinelli S., Payan F., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S., Cambillau C. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic β -amylase: Inhibition and versatility of binding topology. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 26, pp. 23645-23650.
37. Desmyter A., Transue T. R., Ghahroudi M. A., Thi M. H., Poortmans F., Hamers R., Muyldermans S., Wyns L. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, Vol. 3, no. 9, pp. 803-811.
38. Ding X., Boney-montoya J., Owen B.M., Bookout A.L., Coate C., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. Nanobody-coupled microbubbles as novel molecular tracer. *J. Control Release*, 2012, Vol. 158, no. 2, pp. 346-353.
39. Dolk E., van der Vaart M., Hulsik D.L., Vriend G., de Haard H., Spinelli S., Cambillau C., Frenken L., Verrips T. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, Vol. 71, no. 1, pp. 442-450.
40. Dudgeon K., Famm K., Christ D. Sequence determinants of protein aggregation in human VH domains. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2009, Vol. 22, no. 3, pp. 217-220.

41. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S., Tillib S.V., Nedospasov S.A. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 11, pp. 3006-3011.
42. Evazalipour M., D'Huyvetter M., Tehrani B.S., Abolhassani M., Omidfar K., Abdoli S., Arezumand R., Morovvati H., Lahoutte T., Muyldermans S., Devoogdt N. Generation and characterization of nanobodies targeting PSMA for molecular imaging of prostate cancer. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2014, Vol. 9, no. 3, pp. 211-220.
43. Ewert S., Cambillau C., Conrath K., Plückthun A. Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains. *Biochemistry. American Chemical Society*, 2002, Vol. 41, no. 11, pp. 3628-3636.
44. Flajnik M.F., Deschacht N., Muyldermans S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.*, 2011, Vol. 9, no. 8, p. e1001120.
45. Freeman E.E., Weiss H.A., Glynn J.R., Cross P.L., Whitworth J.A., Hayes R.J. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS. England*, 2006, Vol. 20, no. 1, pp. 73-83.
46. Frenken L.G., van der Linden R.H., Hermans P.W.J., Bos J.W., Ruuls R.C., de Geus B., Verrips C.T. Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 2000, Vol. 78, no. 1, pp. 11-21.
47. Gainkam L.O.T., Huang L., Caveliers V., Keyaerts M., Hernot S., Vaneycken I., Vanhove C., Revets H., de Baetselier P., Lahoutte T. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two ^{99m}Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J. Nucl. Med.* 2008. Vol. 49, no. 5. pp. 788-795.
48. Gainkam T.L.O., Caveliers V., Devoogdt N., Vanhove C., Xavier C., Boerman O., Muyldermans S., Bossuyt A., Lahoutte T. Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2011, Vol. 6, no. 2, pp. 85-92.
49. Gasser M., Waaga-Gasser A.M. Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy. *Adv. Exp. Med. Biol. United States*, 2016, Vol. 917, pp. 95-120.
50. Gennigens C., Collignon J., Jerusalem G., Rorive A., Sautois B. Therapeutic monoclonal antibodies in hematooncology. *Rev Med Liege*, 2009, Vol. 64, no. 5-6, pp. 264-267.
51. Geoghegan E.M., Zhang H., Desai P.J., Biragyn A., Markham R.B. Antiviral activity of a single-domain antibody immunotoxin binding to glycoprotein D of herpes simplex virus 2. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2015, Vol. 59, no. 1, pp. 527-535.
52. Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C., Woude G. Vande. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer. Nature Publishing Group*, 2012, Vol. 12, no. 2, pp. 89-103.
53. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995, Vol. 374, no. 6518, pp. 168-173.
54. Hafian H., Sukhanova A., Turini M., Chames P., Baty D., Pluot M., Cohen J.H.M., Nabiev I., Millot J.M. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2014, Vol. 10, no. 8, pp. 1701-1709.
55. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, Vol. 363, no. 6428, pp. 446-448.
56. Harmsen M.M., de Haard H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2007, Vol. 77, no. 1, pp. 13-22.
57. Harmsen M.M., Fijten H.P.D., Engel B., Dekker A., Eblé P.L. Passive immunization with llama single-domain antibody fragments reduces foot-and-mouth disease transmission between pigs. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 13, pp. 1904-1911.
58. Harmsen M.M., van Solt C.B., van Zijderveld-Van Bommel A.M., Niewold T.A., van Zijderveld F.G. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, Vol. 72, no. 3, pp. 544-551.
59. Hassanzadeh-Ghassabeh G., Devoogdt N., de Pauw P., Vincke C., Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine*, 2013, Vol. 8, no. 6, pp. 1013-1026.
60. Helma J., Cardoso M. C., Muyldermans S., Leonhardt H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J. Cell Biol*, 2015, Vol. 209, no. 5, pp. 633-644.
61. Herrera C., Tremblay J.M., Shoemaker C.B., Mantis N.J. Mechanisms of ricin toxin neutralization revealed through engineered homodimeric and heterodimeric camelid antibodies. *J. Biol. Chem. United States*, 2015, Vol. 290, no. 46, pp. 27880-27889.
62. Heukers R., van Bergen en Henegouwen P.M.P., Oliveira S. Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2014, Vol. 10, no. 7, pp. 1441-1451.
63. Hmila I., Abdallah R.B.A.-B., Saerens D., Benlasfar Z., Conrath K., Ayeb M.E., Muyldermans S., Bouhaouala-Zahar B. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI. *Mol. Immunol. England*, 2008, Vol. 45, no. 14, pp. 3847-3856.
64. Hmila I., Cosyns B., Tounsi H., Roosens B., Caveliers V., Abderrazek R. Ben, Boubaker S., Muyldermans S., Ayeb M.E., Bouhaouala-Zahar B., Lahoutte T. Pre-clinical studies of toxin-specific Nanobodies: Evidence of *in vivo* efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. *Toxicol. Appl. Pharmacol. Elsevier Inc.*, 2012, Vol. 264, no. 2, pp. 222-231.
65. Hoefman S., Ottevaere I., Baumeister J., Sargentini-Maier M. Pre-clinical intravenous serum pharmacokinetics of albumin binding and non-half-life extended Nanobodies. *Antibodies*, 2015, Vol. 4, no. 3, pp. 141-156.
66. Hudson P.J., Souriau C. Engineered antibodies. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 1, pp. 129-134.
67. Hultberg A., Temperton N.J., Rosseels V., Koenders M., Gonzalez-Pajuelo M., Schepens B., Ibañez L.I., Vanlandschoot P., Schillemans J., Saunders M., Weiss R.A., Saelens X., Melero J.A., Verrips C.T., Van Gucht S., De Haard H.J. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 4, p. e17665.

68. Hultberg A., Tremblay D. M., de Haard H., Verrips T., Moineau S., Hammarstrom L., Marcotte H. Lactobacilli expressing llama VHH fragments neutralise Lactococcus phage. *BMC Biotechnol.*, 2007, Vol. 7, no. 58, pp. 7-58.
69. Ibañez L. I., de Filette M., Hultberg A., Verrips T., Temperton N., Weiss R.A., Vandeveld W., Schepens B., Vanlandschoot P., Saelens X. Nanobodies with *in vitro* neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 203, no. 8, pp. 1063-1072.
70. Jähnichen S., Blanchetot C., Maussang D., Gonzalez-Pajuelo M., Chow K.Y., Bosch L., de Vriese S., Serruys B., Ulrichs H., Vandeveld W., Saunders M., de Haard H.J., Schols D., Leurs R., Vanlandschoot P., Verrips T., Smit M.J. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010, Vol. 107, no. 47, pp. 20565-20570.
71. Kandalaf H., Hussack G., Aubry A., van Faassen H., Guan Y., Arbabi-Ghahroudi M., MacKenzie R., Logan S.M., Tanha J. Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against *Clostridium difficile*-associated disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, Vol. 99, no. 20, pp. 8549-8562.
72. Kijanka M., Dorresteyn B., Oliveira S., van Bergen en Henegouwen P.M.P. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine*, 2015, Vol. 10, no. 1, pp. 161-174.
73. Kijanka M., Warnders F.J., El Khattabi M., Lub-De Hooge M., van Dam G.M., Ntziachristos V., De Vries L., Oliveira S., van Bergen En Henegouwen P.M.P. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013, Vol. 40, no. 11, pp. 1718-1729.
74. Kirchofer A., Helma J., Schmidthals K., Frauer C., Cui S., Karcher A., Pellis M., Muyltermans S., Casas-Delucchi C.S., Cardoso M.C., Leonhardt H., Hopfner K.-P., Rothbauer U. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group*, 2010, Vol. 17, no. 1, pp. 133-138.
75. Kratz F., Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J. Control. Release. Netherlands*, 2012, Vol. 161, no. 2, pp. 429-445.
76. Lafaye P., Achour I., England P., Duyckaerts C., Rougeon F. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 4, pp. 695-704.
77. Li A., Xing J., Li L., Zhou C., Dong B., He P., Li Q., Wang Z. A single-domain antibody-linked Fab bispecific antibody Her2-S-Fab has potent cytotoxicity against Her2-expressing tumor cells. *AMB Express*, 2016, Vol. 6, no. 1, p. 32.
78. Maier J., Traenkle B., Rothbauer U. Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015, Vol. 5, p. 13402.
79. Maussang D., Mujić-Delić A., Descamps F.J., Stortelers C., Vanlandschoot P., Stigter-van Walsum M., Vischer H.F., van Roy M., Vosjan M., Gonzalez-Pajuelo M., van Dongen G.A.M.S., Merchiers P., van Rompaey P. Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth *in vivo*. *J. Biol. Chem., USA*, 2013, Vol. 288, no. 41, pp. 29562-29572.
80. Mccoy L.E., Gropelli E., Blanchetot C., Haard H.D., Verrips T., Rutten L., Weiss R.A., Jolly C. Neutralisation of HIV-1 cell-cell spread by human and llama antibodies. *Retrovirology*, 2014, Vol. 11, no. 83, pp. 1-15.
81. Miao Z., Luker K.E., Summers B.C., Berahovich R., Bhojani M.S., Rehemtulla A., Kleer C.G., Essner J.J., Nasevicius A., Luker G.D., Howard M.C., Schall T.J. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, Vol. 104, no. 40, pp. 15735-15740.
82. Moutel S., Perez F. Utilisation des intrabodies: de l'étude des protéines intracellulaires à l'immunisation thérapeutique. *Medecine/Sciences*, 2009, Vol. 25, pp. 1173-1176.
83. Movahedi K., Schoonooghe S., Laoui D., Houbracken I., Waelpuut W., Breckpot K., Bouwens L., Lahoutte T., de Baetselier P., Raes G., Devoogdt N., van Ginderachter J.A. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective *in vivo* imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 16, pp. 4165-4177.
84. Mujić-Delić A., de Wit R.H., Verkaar F., Smit M.J. GPCR-targeting nanobodies: Attractive research tools, diagnostics, and therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014, Vol. 35, no. 5, pp. 247-255.
85. Muyltermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, 2013, Vol. 82, pp. 775-797.
86. Olichon A., Surrey T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 50, pp. 36314-36320.
87. Pant N., Hultberg A., Zhao Y., Svensson L., Pan-Hammarstrom Q., Johansen K., Pouwels P.H., Ruggeri F.M., Hermans P., Frenken L., Boren T., Marcotte H., Hammarstrom L. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J. Infect. Dis.*, 2006, Vol. 194, no. 11, pp. 1580-1588.
88. Panza P., Maier J., Schmees C., Rothbauer U., Söllner C. Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies. Development. *The Company of Biologists*, 2015, Vol. 142, no. 10, pp. 1879-1884.
89. Peyvandi F., Scully M., Kremer Hovinga J.A., Cataland S., Knöb P., Wu H., Artoni A., Westwood J.-P., Mansouri Taleghani M., Jilma B., Callewaert F., Ulrichs H., Duby C., Tersago D. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 374, no. 6, pp. 511-522.
90. Platonova E., Winterflood C.M., Junemann A., Albrecht D., Faix J., Ewers, H. Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods. Elsevier Inc.*, 2015, Vol. 88, pp. 89-97.
91. Power U.F., Stortelers C., Allosery K., Melero J.A. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, Vol. 60, no. 1, pp. 6-13.
92. Pruszyńska M., Koumariou E., Vaidyanathana G., Revetsc H., Devoogdt N., Lahoutte T., Zalutsky M.R. Targeting breast carcinoma with radioiodinated anti-HER2 Nanobody. *Nucl. Med. Biol.*, 2013, Vol. 40, no. 1, pp. 52-59.

93. Put S., Schoonoghe S., Devoogdt N., Schurgers E., Avau A., Mitera T., D'Huyvetter M., De Baetselier P., Raes G., Lahoutte T., Matthys P. SPECT imaging of joint inflammation with Nanobodies targeting the macrophage mannose receptor in a mouse model for rheumatoid arthritis. *J. Nucl. Med.*, 2013, Vol. 54, no. 5, pp. 807-814.
94. Pysz M.A., Gambhir S.S., Willmann J.K. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin. Radiol.*, 2010, Vol. 65, no. 7, pp. 500-516.
95. Rajabi-Memari H., Jalali-Javaran M., Rasaei M.J., Rahbarizadeh F., Forouzandeh-Moghadam M., Esmaili A. Expression and characterization of a recombinant single-domain monoclonal antibody against MUC1 mucin in tobacco plants. *Hybridoma (Larchmt). United States*, 2006, Vol. 25, no. 4, pp. 209-215.
96. Rakovich T.Y., Mahfoud O.K., Mohamed B.M., Prina-Mello A., Crosbie-Staunton K., van den Broeck T., de Kimpe L., Sukhanova A., Baty D., Rakovich A., Maier S.A., Alves F., Nauwelaers F., Nabiev I., Chames P., Volkov Y. Highly sensitive single domain antibody-quantum dot conjugates for detection of HER2 biomarker in lung and breast cancer cells. *ACS Nano. United States*, 2014, Vol. 8, no. 6, pp. 5682-5695.
97. Rashidian M., Keliher E.J., Bilate A.M., Duarte J.N., Wojtkiewicz G.R., Jacobsen J.T., D'Huyvetter Cragolini J., Swee L.K., Victoria G.D., Weissleder R., Ploegh H. L. Noninvasive imaging of immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 19, pp. 6146-6151.
98. Roovers R.C., Laeremans T., Huang L., De Teye S., Verkleij A.J., Revets H., de Haard H.J., van Bergen En Henegouwen P.M.P. Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, Vol. 56, no. 3, pp. 303-317.
99. Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso C., Leonhardt H. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Meth.*, 2006, Vol. 3, no. 11, pp. 887-889.
100. Rutgers K.S., Nabuurs R.J.A., van den Berg S.A.A., Schenk G.J., Rotman M., Verrips C.T., van Duinen S.G., Maat-Schieman M.L., van Buchem M.A., de Boer A.G., van der Maarel S.M. Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the *in vitro* blood-brain barrier. *Neuroscience. Elsevier Inc.*, 2011, Vol. 190, pp. 37-42.
101. Sadeqzadeh E., Rahbarizadeh F., Ahmadvand D., Rasaei M.J., Parhamifar L., Moghimi S.M. Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells. *J. Control. Release. Elsevier B.V.*, 2011, Vol. 156, no. 1, pp. 89-95.
102. Saerens D., Muyldermans S. Single domain antibodies: methods and protocols. *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 911, pp. 277-286.
103. Sawyer L.A. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. *Antiviral Res.*, 2000, Vol. 47, no. 2, pp. 57-77.
104. Schorpp K., Rothenaigner I., Maier J., Traenkle B., Rothbauer U., Hadian K. A multiplexed high-content screening approach using the chromobody technology to identify cell cycle modulators in living cells. *J. Biomol. Screen*, 2016, Vol. 1, no. 13.
105. Sherwood L.J., Osborn L.E., Carrion Jr.R., Patterson J.L., Hayhurst A. Rapid assembly of sensitive antigen-capture assays for Marburg virus, using *in vitro* selection of llama single-domain antibodies, at biosafety level 4. *J. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 196, no. s2, pp. S213-S219.
106. Siontorou C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int. J. Nanomedicine*, 2013, Vol. 8, pp. 4215-4227.
107. Soukos N.S., Hamblin M.R., Keel S., Fabian R.L., Deutsch T.F., Hasan T. Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer *in vivo*. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 11, pp. 4490-4496.
108. Spinelli S., Frenken L.G., Hermans P., Verrips T., Brown K., Tegoni M., Cambillau C. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry. United States*, 2000, Vol. 39, no. 6, pp. 1217-1222.
109. Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Kisserli A., Tabary T., Reveil B., Millot J. M., Chames P., Baty D., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Cohen J.H.M., Nabiev I. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: Toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 516-525.
110. Thys B., Saerens D., Schotte L., de Bleeser G., Muyldermans S., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Rombaut B. A simple quantitative affinity capturing assay of poliovirus antigens and subviral particles by single-domain antibodies using magnetic beads. *J. Virol. Methods. Elsevier B.V.*, 2011, Vol. 173, no. 2, pp. 300-305.
111. Tillib S.V., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Saakyan S.A., Gribova I.Y., Tutykhina I.L., Sedova E.S., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Res.*, 2013, Vol. 97, no. 3, pp. 245-254.
112. Torres T., Romanelli M., Chiricozzi A. A revolutionary therapeutic approach for psoriasis: bispecific biological agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2016, Vol. 25, Iss. 7.
113. Úlrichs H., Silence K., Schoolmeester A., de Jaegere P., Rossenu S., Roodt J., Priem S., Lauwereys M., Casteels P., van Bockstaele F., Verschueren, Stanssens K., Baumeister P., Holz J., Beate J. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 3, pp. 757-765.
114. Unger M., Eichhoff A. M., Schumacher L., Stryio M., Menzel S., Schwan C., Alzogaray V., Zylberman V., Seman M., Brandner J. Rohde H., Zhu K., Haag F. Mittrücker H.-W., Goldbaum F., Aktories K., Koch-Nolte F. Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary Clostridium difficile toxin CDT. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, p. 7850.
115. van Bockstaele F., Holz J.-B., Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr. Opin. Investig. Drugs. England*, 2009, Vol. 10, no. 11, pp. 1212-1224.
116. van der Vaart J.M., Pant N., Wolvers D., Bezemer S., Hermans P.W., Bellamy K., Sarker S.A., van der Logt C.P.E., Svensson L., Verrips C.T., Hammarstrom L., van Klinken B.J.W. Reduction in morbidity of rotavirus

induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine*, 2006, Vol. 24, no. 19, pp. 4130-4137.

117. van Driel P.B.A.A., Boonstra M.C., Slooter M.D., Heukers R., Stammes M.A., Snoeks T.J.A., de Bruijn H.S., van Diest P.J., Vahrmeijer A.L., van Bergen en Henegouwen P.M.P., van de Velde C.J.H., Löwik C.V.G.M., Robinson D.J., Oliveira S. EGFR targeted nanobody-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy in a pre-clinical model of head and neck cancer. *J. Control. Release*, 2016, Vol. 229, pp. 93-105.

118. van Driel P.B.A.A., van der Vorst J.R., Verbeek F.P.R., Oliveira S., Snoeks T.J.A., Keereweer S., Chan B., Boonstra M.C., Frangioni J.V., van Bergen en Henegouwen P.M.P., Vahrmeijer A.L., Lowik C.W.G.M. Intraoperative fluorescence delineation of head and neck cancer with a fluorescent Anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Int. J. Cancer*, 2014, Vol. 134, no. 11, pp. 2663-2673.

119. van Heeke G., Allosery K., de Brabandere V., de Smedt T., Detalle L., de Fougères A. Nanobodies* as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol. Ther.*, 2016, JPT-06924.

120. van Roy M., Ververken C., Beirnaert E., Hoefman S., Kolkman J., Vierboom M., Breedveld E., 't Hart B., Poelmans S., Bontinck L., Hemeryck A., Jacobs S., Baumeister J., Ulrichs H. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody* ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 2015, Vol. 17, p. 135.

121. Vaneycken I., Devoogdt N., van Gassen N., Vincke C., Xavier C., Wernery U., Muyltermans S., Lahoutte T., Cavelliers V. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.*, 2011, Vol. 25, no. 7, pp. 2433-2446.

122. Vanlandschoot P., Stortelers C., Beirnaert E., Itatí L., Schepens B., Depla E., Saelens X. Nanobodies: New ammunition to battle viruses. *Antiviral Research*, 2011, Vol. 92, pp. 389-407.

123. Vercruyse T., Pardon E., Vanstreels E., Steyaert J., Daelemans D. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal α -helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. *J. Biol. Chem. USA*, 2010, Vol. 285, no. 28, pp. 21768-21780.

124. Vosjan M.J., Vercammen J., Kolkman J.A., Stigter-van Walsum M., Revets H., van Dongen G.A. Nanobodies Targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 1017-1025.

125. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., Unger M., Juarez K., Urrutia M., Cauerhff A., Danquah W., Rissiek B., Scheuplein F., Schwarz N., Adriouch S., Boyer O., Seman M., Licea A., Serreze D. V., Goldbaum F. A., Haag F., Koch-Nolte F. Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2009, Vol. 198, no. 3, pp. 157-174.

126. Yardehnavi N., Behdani M., Bagheri K.P., Mahmoodzadeh A., Khanahmad H., Shahbazzadeh D., Habibi-Anbouhi M., Ghassabeh G.H., Muyltermans S.A. Camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against Hemiscorpius lepturus envenomation. *FASEB J.*, 2014, Vol. 28, no. 9, pp. 4004-4014.

Авторы:

Горшкова Е.Н. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии центра молекулярной биологии и биомедицины института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Василенко Е.А. — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии центра молекулярной биологии и биомедицины института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Тиллиб С.В. — д.б.н., руководитель лаборатории молекулярных биотехнологий ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

Астраханцева И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии центра молекулярной биологии и биомедицины института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Gorshkova E.N., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Vasilenko E.A., PhD Student, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Tillib S.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Astrakhantseva I.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Поступила 24.08.2016
Принята к печати 31.08.2016

Received 24.08.2016
Accepted 31.08.2016