

**НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ
И СООБЩЕНИЯ**
**SCIENTIFIC REVIEWS
AND REPORTS**

DOI: 10.12731/2658-6649-2020-12-2-25-40

УДК 571.27

**«ВЕРБЛЮЖЬИ» АНТИТЕЛА:
ОСОБЕННОСТИ ИХ СТРОЕНИЯ,
ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ**

Андреев А.А., Лопина Н.П., Бордина Г.Е., Некрасова Е.Г.

В статье представлен аналитический обзор научной литературы на тему «верблюжьих» антител, их открытия, структурных отличий от классических иммуноглобулинов и их применения в генной инженерии, биологических исследованиях и в медицине, в частности, в онкологической терапии.

Ключевые слова: «верблюжьих» антитела; иммуноглобулины; нанотела; моноклональные антитела; наноантитела; мини-антитела; однодоменные антитела; фаговый дисплей.

**“CAMEL” ANTIBODIES: FEATURES OF THEIR
STRUCTURE, PREPARATION AND APPLICATION**

Andreev A.A., Lopina N.P., Bordina G.E., Nekrasova E.G.

The article presents an analytical review of the scientific literature on the topic of “camel” antibodies, their discovery, structural differences from classical immunoglobulins and their application in genetic engineering, biological research and medicine, in particular, in cancer therapy.

Keywords: “camel” antibodies; immunoglobulins; nanobodies; monoclonal antibodies; nanoantibodies; mini-antibodies; single-domain antibodies; phage display.

В 1993 году бельгийскими учёными было сделано открытие: они обнаружили в крови животных семейства Верблюдовых (верблюдов, альпак, викуний, лам), помимо классических иммуноглобулинов, антитела, структура и размер которых значительно отличались от строения иммуноглобулинов других млекопитающих. Эти антитела были названы HCAb (“heavy chain antibody”). Открытые бельгийскими учёными иммуноглобулины являются самыми маленькими по размеру (приблизительно 2×4 нм) из всех известных антител. Поэтому данные белковые структуры получили следующие синонимичные названия: «одномономерные антитела», «нанополитела» и «мини-антитела».

Цель исследования: на основе сравнения структуры и свойств классических и одномономерных иммуноглобулинов определить преимущества применения нанополител в медицине и биологических исследованиях.

Материал и методы исследования

Для достижения поставленной цели исследования был произведён обзор научной литературы на тему «верблюжьих» антител, их особенностей и их практического значения. Основное внимание уделялось научным статьям, в которых описывались российские и зарубежные исследования в области генной инженерии. По мере анализа научных статей были созданы рисунки классических антител и нанополител.

Результаты исследования и их обсуждение

С помощью создания рисунков классических и одномономерных антител было выявлено их структурное отличие от нанополител на уровне строения антигенсвязывающего центра. На основе анализа научных статей были выявлены преимущества применения «верблюжьих» иммуноглобулинов в медицине, генной инженерии и биологических исследованиях. Параллельно была изучена история открытия нанополител.

Имуноглобулины, или антитела – это сывороточные гликопротеины, которые локализуются в плазме крови и тканевой жидкости и участвуют в иммунных процессах организма [1]. Синтез антител осуществляют В-лимфоциты, но для этого необходим контакт с антигеном и последующее созревание В-лимфоцитов в антителообразующие клетки [2]. Иммуноглобулины специфичны, то есть они способны взаимодействовать с антигеном, аналогичным тому, который вызвал их образование [1]. Данные соединения были обнаружены у всех млекопитающих (в том числе и человека), у акул и родственных им хрящевых рыб. Структуры, подобные антителам, были

обнаружены у менее развитых организмов [3]. Иммуноглобулины играют важную роль при диагностике различных заболеваний. Они также имеют большое значение для фундаментальных медицинских исследований [4].

Моноклональные антитела – это продукты секреции идентичных иммунных клеток, каждая из которых является клоном единственной родительской клетки [5].

В организме человека и других млекопитающих учёные выявили следующие классы антител (Ig): IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Данные иммуноглобулины принято считать классическими [6]. Наибольшую концентрацию в сыворотке крови человека имеют антитела класса G (75–85%). Они появляются в больших количествах при вторичном иммунном ответе [7].

Молекулы классических иммуноглобулинов состоят из двух тяжёлых (H) и двух лёгких (L) полипептидных цепей, соединённых между собой ковалентными и нековалентными связями. Тяжёлые цепи разных антител отличаются между собой аминокислотной последовательностью, количеством аминокислотных остатков, молекулярной массой. Эти цепи принято обозначать буквами греческого алфавита (рис. 1).

Следует упомянуть об эволюции иммунной системы. Она сформировалась на основе системы кроветворения и составила четвертую регулируемую систему позвоночных (наряду с эндокринной, условно-рефлекторной и метаболической системами) [8].

Первыми иммунными структурами были клетки, способные осуществлять фагоцитоз. Их первоначальной функцией было пищеварение, а затем способность к фагоцитозу стала использоваться для борьбы с генетически чужеродными объектами. Способность к фагоцитозу появилась у одноклеточных организмов и сохранилась у млекопитающих.

По предположениям учёных, специфический клеточный иммунитет появился у некоторых разновидностей губок и кишечнополостных (например, у гидр и коралловых полипов).

В то же время, вероятно, появилась клеточная структура, предшествующая лимфоциту, но при этом иммунная клетка, относительно сходная по структуре с Т-лимфоцитом, впервые была обнаружена у кольчатых червей.

Синтез иммуноглобулинов (классических) у млекопитающих и некоторых хрящевых рыб стал следующим важным этапом эволюции иммунной системы стал. Основная функция антител заключается в первичном обезвреживании антигенов. У иглокожих (морских ежей, морских звёзд и др.) были обнаружены структуры, которые по своей структуре подобны иммуноглобулинам [3].

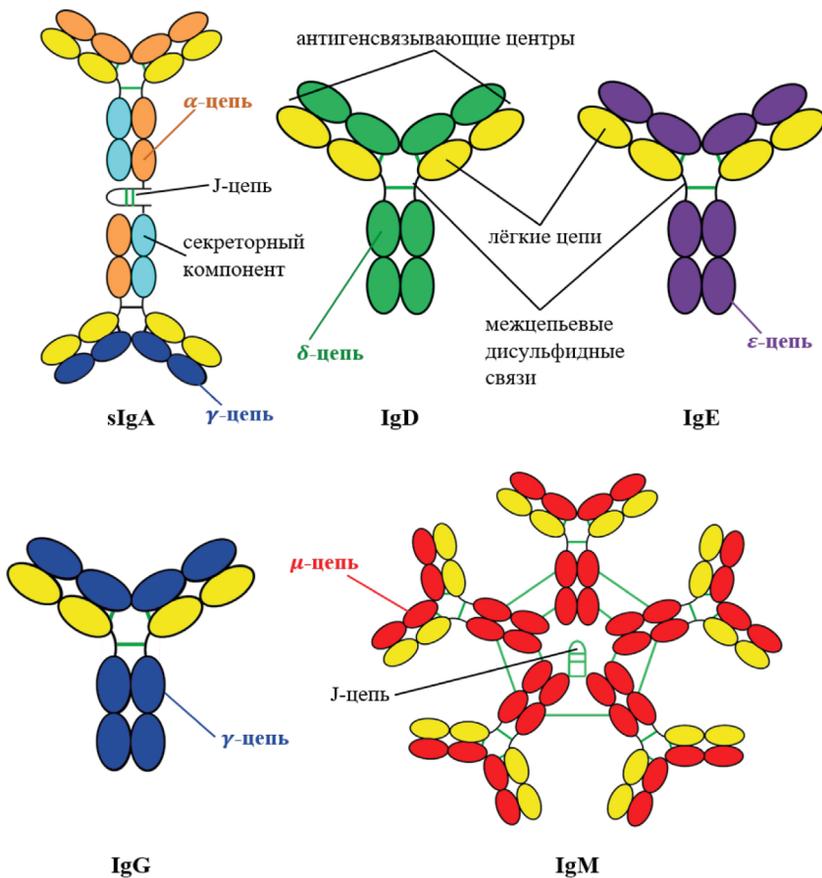


Рис. 1. Структура классических антител

В процессе эволюции у некоторых видов акул, у родственных им хрящевых рыб и у представителей семейства Верблюдовых появились однодоменные антитела, отличающиеся по структуре и размерам от классических иммуноглобулинов.

Группа учёных из Бельгии в 1993 году в результате наблюдений выявила, что антитела, которые есть в крови у верблюдовых, имеют необычное строение – в их состав входит лишь фрагмент одной укороченной тяжёлой цепи, а лёгкие цепи у них отсутствуют (рис. 2).

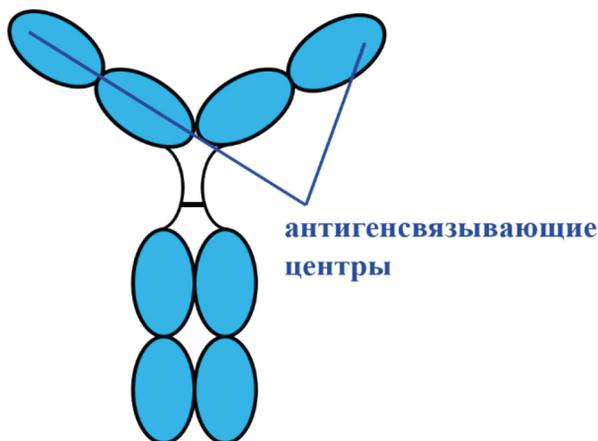


Рис. 2. «Верблюжье» антитело

Имуноглобулины у верблюдовых имеют следующие особенности:

- 1) Антигенсвязывающий участок у «верблюжьих» антител формируется только одним варибельным доменом – V_{HH} (“Variable domain of the Heavy chain of the Heavychain antibody”).
- 2) Нанотела очень стабильны и не подвергаются разрушению при колебаниях температур и при изменениях pH внутренней среды организма.
- 3) Данные белковые структуры практически не вызывают иммунного ответа (не являются иммуногенами).
- 4) Они могут образовывать необычные для классических иммуноглобулинов паратопы.

За счёт перечисленных выше особенностей «верблюжьих» иммуноглобулины имеют определённые преимущества в живом организме и практическом применении:

- 1) Они легко передвигаются по организму, проникают в органы и ткани организма, в которые крупные классические иммуноглобулины не могут проникнуть.
- 2) Они, в отличие от классических антител, лучше выводятся почками, если они там накапливаются в больших количествах.
- 3) Присутствие в структуре нанотел только тяжёлой цепи, во-первых, увеличивает молекулярную разнородность иммуноглобулинов, и, во-вторых, даёт возможность связаться со скрытыми генетически чужеродными объектами и специфически с ними прореагировать (обезвредить их).

4) За счёт своих небольших размеров мини-антитела могут распознавать те антигенные участки, которые недоступны классическим иммуноглобулинам [1].

5) Их можно вводить в организм ингаляционным путём.

6) Они устойчивы к ферментативному расщеплению (протеолитической деградации) в желудочно-кишечном тракте.

7) Наноантитела способны преодолевать гематоэнцефалический барьер [9].

8) При введении нанотел в организме осуществляются благоприятные процессы с точки зрения фармакологической кинетики [10]. Благодаря способности образовывать уникальные паратопы мини-антитела способны связываться с белковыми активными центрами. «Верблюжьим» иммуноглобулинам могут быть использованы для выявления эпитопов, которые не могут быть распознаны более крупными классическими антителами.

9) В лабораторных условиях нанотела вырабатываются в больших количествах. Обычно их первоначально вырабатывают в периплазме бактерий вида *Entamoeba coli* с выходом 1–10 мг из 1 л культуры. Имеется также возможность их выработки в растениях, дрожжах и клетках млекопитающих [1].

Благодаря высокой растворимости и стабильности в широком диапазоне температур и кислотности среды, чем в классических иммуноглобулинах, мини-антитела широко применяются в медицине, генной инженерии и биологических исследованиях:

1) Их можно применять в качестве внутриклеточных иммуноглобулинов (“intrabody”), которые распознают чужеродные соединения и, реагируя с ними, нейтрализуют их. Мини-антитела также применяются в устройствах, которые детектируют антиген [9]. Ранняя диагностика опасных инфекционных и резистентных заболеваний является приоритетным направлением здравоохранения [11].

2) Моноклональные иммуноглобулины за счёт своей особенности высокоспецифично взаимодействовать с молекулярными мишенями заняли ведущее положение в терапии аутоиммунных заболеваний, а также стали важным инструментом протеомных исследований и компонентом диагностических систем [12].

Иммунотерапевтические антитела способны дезактивировать вирусы и нейтрализовать цитокины, осуществлять избирательную доставку химиотерапевтических агентов к клеткам опухоли, активировать и подавлять функции определённых клеток [13].

На сегодняшний день иммуноглобулины составляют приблизительно одну треть от общего количества белков, которые применяются в терапии различных заболеваний в развитых государствах [14]. В настоящее время более 80 моноклональных антител применяют в терапии многих видов рака, аутоиммунных и других заболеваний [15]. Моноклональные иммуноглобулины применяются и при лечении аутоиммунных и инфекционных заболеваний, например, бруцеллёза [16].

Основной целью использования «верблюжьих» антител является улучшение здоровья человека и животных. Наиболее актуально их применение в профилактике и лечении различных онкологических заболеваний. Например, в последнее время в онкологической терапии активно применяются такие соединения белковой природы, как лектины.

3) Доставка лекарственных препаратов к очагу поражения является одной из главных задач современной фармакологии. Эта проблема является особо актуальной для онкологических заболеваний. Противоопухолевым препаратам свойственна значительная токсичность, поскольку они поражают одновременно с малигнизированными клетками здоровые клетки и ткани [17].

Мини-антитела способны проникать в твёрдые опухоли более эффективно, чем крупные классические иммуноглобулины. Они также выводятся из организма значительно быстрее, при этом подействовав на опухоль [9].

Для лечения и профилактики онкологий можно использовать классические иммуноглобулины, однако наноантитела благодаря своим малым размерам являются более удобными и эффективными, так как успешное лечение опухоли подразумевает доступ к ней большого количества антител [17].

4) Однодоменные антитела можно применять как эффективные структуры для выявления онкологических заболеваний. Было создано несколько нанотел, распознающих человеческий простат-специфический антиген – молекулу, образующуюся при раке простаты у мужчин. Эти иммуноглобулины определяют концентрацию простат-специфического антигена, за счёт чего можно установить, болен ли пациент, и предложить ему оптимальный вариант лечения [1].

5) Мини-антитела ещё используются для синтеза иммуноглобулинов, которые будут распознавать участки раковых клеток, прикрепляться к ним и специфически с ними реагировать. Таким образом, опухоль станет уязвимой для клеток иммунного ответа.

6) «Верблюжьи» иммуноглобулины блокируют факторы роста, ускоряющих развитие раковых клеток. В норме эти гликопротеиновые соединения стимулируют деление и рост нормальных клеток. Однако действие факторов роста неспецифично, и они могут способствовать развитию злокачественных клеток.

7) Есть предварительные исследования, показывающие, что с помощью нанотел можно лечить болезни Паркинсона и Альцгеймера, которые вызываются агрегацией белков. Мини-антитела способны не только предотвращать их агрегацию, но и устранять уже существующие агрегаты [9].

8) «Верблюжьи» иммуноглобулины применяются в исследовании поведения антигенов в живых клетках. Был разработан новый метод слежения за генетически чужеродными объектами в клетке. Если наноантитело с помощью генно-инженерных методов объединить с флуоресцентным белком (RFP), то можно получить конструкцию под названием “chromobody”. В трансформированных такой конструкцией клетках экспрессируются флуоресцирующие и в то же время специфически узнающие соответствующий антиген белки. При проведении микроскопирования живой клетки появляется возможность проследивать динамические изменения антигенов на всех этапах клеточного цикла.

9) Как ингибиторы ферментов – за счёт малого размера мини-антител и их способности проникать в каталитический центр (активный центр ферментов).

10) В качестве инструментов для изучения взаимодействий между белками в организме [1].

11) В пищевой промышленности – например, при производстве сыра, так как наноантитела способны предотвращать инфекцию молочнокислых бактерий и ускорять процессы брожения [18].

Говоря о «верблюжьих» антителах, стоит упомянуть о технологии их получения с заданной специфичностью.

Более ста лет назад немецкий врач, иммунолог Пауль Эрлих высказал идею о «магической пуле», которая может избирательно поражать очаг болезни. Эта идея нашла применение в настоящее время благодаря разработке гибридной технологии и получению моноклональных иммуноглобулинов, разнообразных по строению, свойствам и специфичности [19].

В 1975 г. вышла работа Кёлера и Мильштейна, которая ознаменовала собой начало гибридной технологии получения моноклональных антител. Гибридная технология позволяет получать в ответ на иммунизацию антигеном моноклональный иммуноглобулин – сывороточный гликопро-

теин одного вида, который направлен против одного специфичного антигена. Данная технология до сих пор остаётся одним из главных методов инженерии антител [20].

Использование экспрессии в различных биологических системах (дрожжах, бактериях, клетках насекомых и растений и т. д.) привело к созданию новых биотехнологических лекарственных препаратов, полученных с применением технологий рекомбинантных ДНК [21].

За последнее десятилетие был достигнут большой прогресс в создании моноклональных антител и их производных для терапии онкологических заболеваний [22].

Традиционный способ получения иммуноглобулинов путём отбора индивидуальных клонов гибридом означает низкую производительность и большую трудоёмкость [23].

Одним из наиболее применяемых в генной инженерии методов получения рекомбинантных фрагментов иммуноглобулинов, которые распознают антигены, является модифицированный метод фагового дисплея, основанный на отборе из больших библиотек ДНК-последовательностей, которые были клонированы в фагмидном направлении, и клонов, кодирующих белки (антитела). Эти иммуноглобулины способны специфически связывать определённый лиганд (антиген). Вышеупомянутые ДНК-последовательности кодируют рекомбинантные белки и экспрессируются в составе поверхностного белка нитевидных бактериофагов, которые поражают бактериальные клетки [1].

Первой стадией получения однодоменных иммуноглобулинов в лабораторных условиях является индукция образования специфических антител в организме верблюда (или ламы) в результате иммунизации [24]. При этом может возникнуть необходимость продления жизни данных иммуноглобулинов в крови лабораторного животного (или пациента). Это достигается путём олигомеризации первичного антитела, а также путём присоединения к нему другого белка (например, сывороточного альбумина) или небелковых молекул (например, при пегилировании). Такие методы способствуют увеличению иммуноглобулина в размерах [25].

Второй стадией является отбор методом фагового дисплея клонов нуклеотидных последовательностей заданных наноантител из генерируемой библиотеки всего репертуара переменных участков однодоменных антител данного иммунизированного животного [24].

Как правило, вместо целых иммуноглобулиновых молекул для экспонирования на поверхности фага используют гибридные рекомбинантные одноце-

почечные белки (scFv). Эти случайные комбинации получают таким образом, что последовательности нуклеотидов, кодирующие переменные участки тяжёлых и лёгких цепей, клонируются независимо друг от друга и впоследствии объединяются случайным образом. В случае правильного сочетания доменов полученная химерная молекула способна сохранять специфичность исходного антитела, несмотря на удаление константных районов [1].

Вторая стадия селекции наноантител на данный момент недостаточно хорошо исследована [24].

В традиционных рекомбинантных технологиях присутствуют следующие проблемы:

1) Необходимость работы с огромным количеством клонов антител из библиотек ДНК-последовательностей, в которых должны быть представлены все возможные комбинации последовательностей двух случайных переменных доменов (тяжёлой и лёгкой цепей иммуноглобулинов).

2) Проблема формирования правильной относительной конформации этих двух цепей.

3) Проблема растворимости индивидуальных переменных доменов, которые часто «склонны» к агрегации.

Перечисленные выше проблемы в значительной мере преодолеваются при использовании технологии фагового дисплея для клонирования репертуара генов однодоменных антиген-узнающих V_H-участков однодоменных иммуноглобулинов. Практически каждый клон в получаемой библиотеке будет кодировать функциональный V_H-домен, который обладает определённой антиген-узнающей специфичностью, соответствующей одному из антител иммунизированного животного. Получаемое «на выходе» нанотело, в отличие от переменных доменов классических иммуноглобулинов, как правило, хорошо растворимо, устойчиво к значительным колебаниям температуры и pH [1].

Метод фагового дисплея является весьма эффективной и широко используемой технологией отбора из больших рекомбинантных библиотек пептидов и белков [26]. Примером применения данного метода на практике являются рекомбинантные однодоменные антитела (V_HH44, V_HH49, V_HH87), специфически связывающие интерлейкин-6 (IL-6) человека. Они были отобраны методом фагового дисплея из библиотеки переменных доменов однодоменных антител ламы (*Lama glama*), которая была иммунизирована белком IL-6 человека [27].

Следует отметить другой перспективный подход – метод рибосомного дисплея, который был успешно использован для получения гаптен-специ-

фических «верблюжьих» иммуноглобулинов. В данном методе применяется специально адаптированная библиотека ДНК-последовательностей мини-антител, кодирующих соответствующие мРНК, которые не содержат стоп-кодона в составе их 3'-концевого спейсерного участка. В результате последовательных этапов транскрипции и трансляции *in vitro* нанотела остаются связанными с рибосомой и матричной РНК. Данные комплексы из трёх компонентов используют для селекционного отбора, поскольку они впоследствии будут специфически реагировать с антигеном. Из отобранных комплексов выделяют мРНК, проводят обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию, в результате которой получают специфически обогащённые библиотеки последовательностей наноантител [1].

Получение высокоаффинных однодоменных иммуноглобулинов, лишённых нежелательных компонентов и очищенных от соединений, которые содержатся в крови, широко применяется в терапии [28].

В настоящее время в Российской Федерации выпускаются только поликлональные туляремиальные диагностикумы. В связи с этим, безусловно, актуальными являются разработки, направленные на получение моноклональных антител к бактериям вида *Francisella tularensis* для конструирования иммунодиагностических тест-систем [29].

Введение «верблюжьих» иммуноглобулинов в организм человека может привести к возникновению нежелательной иммунной реакции, в частности, если они используются неоднократно.

Учёные разработали следующие методы решения проблемы возникновения иммунной реакции организма на введённые в него мини-антитела:

1) Удаление доменов, которые не принимают участие в связывании нанотел с антигенами;

2) Получение рекомбинантных иммуноглобулинов, в которых аминокислотные участки, не отвечающие за распознавание антигенов, заменяются соответствующими фрагментами человеческого происхождения, то есть происходит гуманизация антител [30].

Следует отметить, что переменные участки «верблюжьих» антител не вызывают выраженного иммунного ответа у приматов, и по структуре они весьма гомологичны переменным доменам IgG₃ человека. Было показано, что однодоменные иммуноглобулины можно «гуманизировать» без заметной потери их специфической активности, проведя небольшое число точечных замен аминокислот. Это открывает потенциальную возможность широкого использования нанотел в качестве средств пассивной иммунизации для предотвращения развития различных опасных инфекционных заболеваний [24].

Заключение

За счёт своих небольших размеров «верблюжьи» антитела способны проникать в те клеточные и молекулярные структуры организма, куда не могут проникнуть классические иммуноглобулины из-за своих крупных размеров. Благодаря физико-химической устойчивости наноантитела не подвергаются расщеплению в организме и широко применяются в генной инженерии, биологических исследованиях и медицине, в частности, в онкологической терапии.

Список литературы

1. Тиллиб С.В. “Верблюжьи наноантитела” – эффективный инструмент для исследований диагностики и терапии // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. № 1. С. 77–85.
2. Новиков В.В., Пименов В.К., Вязьмина Е.С. [и др.]. Синтетические пептиды и рекомбинантные белки в анализе эпитопной специфичности антител, направленных против возбудителей широко распространённых инфекций // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Серия: Биология. 1999. № 1. С. 143–147.
3. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. – ISBN: 5-03-003305-X.
4. Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker // Acta Naturae. 2015. Vol. 7, No. 2 (25), pp. 42–47.
5. Седых С.Е., Невинский Г.А. Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5. № 2. С. 30–40.
6. Dorokhov Y.L., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N. et al. Functional role of carbohydrate residues in human immunoglobulin G and therapeutic monoclonal antibodies // Biochemistry (Moscow). 2016. Vol. 81, No. 8, pp. 835–857.
7. Сакович А.Р. Профиль иммуноглобулинов у пациентов с острым синуситом // Оториноларингология. Восточная Европа. 2014. № 1 (14). С. 46–51.
8. Селезнев С. Б. Морфологические пути эволюции иммунной системы позвоночных // Нива Поволжья. 2008. № 1 (6). С. 59–64.
9. Горшкова Е.Н., Василенко Е.А., Тиллиб С.В. [и др.]. Однодоменные антитела и биоинженерные препараты на их основе: новые возможности для диагностики и терапии // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18. № 6. С. 505–520.
10. Garas M.N., Tillib S.V., Zubkova O.V. et al. Construction of a pIX-modified Adenovirus Vector Able to Effectively Bind to Nanoantibodies for Targeting // Acta Naturae. 2014. Vol. 6, No. 2 (21), pp. 95–105.

11. Гладышев П.П., Васильев А.А., Моренков О.С. [и др.]. Аналитическая платформа иммунохроматографической двухуровневой диагностики опасных и резистентных инфекций на основе протеомных технологий // Современная медицина: актуальные вопросы. 2016. № 51. С. 22–48.
12. Дормешкин Д.О., Бричко Е.А., Гилеп А.А. [и др.]. Фаговый дисплей в конструировании антител с заданными свойствами // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical series. 2017. № 2. С. 93–110.
13. Лушова А.А., Бязрова М.Г., Прилипов А.Г. [и др.]. Новое поколение методов получения человеческих моноклональных антител // Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 6. С. 899–906.
14. Karabelskii A.V., Nemankin T.A., Ulitin A.B. et al. Design of innovate preparations of monoclonal antibodies // Biotechnology in Russia. 2017. No. 1, pp. 10–29.
15. Данилов С.М. Конформационный фингерпринтинг с помощью моноклональных антител (на примере ангиотензин-превращающего фермента – АПФ) // Молекулярная биология. 2017. Т. 51. № 6. С. 1046–1061.
16. Куклина Г.В., Елагин Г.Д., Фоменков О.О. [и др.]. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллёза // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 2. С. 67–71.
17. Nemudraya A.A., Richter V.A., Kuligina E.V. Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands // Acta Naturae. 2016. Vol. 8, No. 1 (28), pp. 48–57.
18. Ledebouer A.M., Besemer S., J.J. W. de Haard et al. Preventing Phage Lysis of *Lactococcus lactis* in Cheese Production Using A Neutralizing Heavy-Chain Antibody Fragment from Llama // Journal of Dairy Science. 2002. Vol. 85, No. 6, pp. 1376–1382.
19. Deyev S.M., Polianovskii O.L. Monoclonal Antibodies for Diagnostics and Therapy // Biotechnology in Russia. 2008. No. 2, pp. 1–15.
20. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical Application // Acta Naturae. 2009. Vol. 1, No. 1 (1), pp. 32–50.
21. Osipova I.G., Vaganova O.A., Sakanyan E.I. Actual Problems in Standardization in RF of Biotechnological Medicinal Products on the basis of Monoclonal Antibodies // Biotechnology in Russia. 2017. No. 1, pp. 80–90.
22. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E. et al. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering // Russian chemical reviews. 2015. Vol. 84, No. 1, pp. 1–26.
23. Kravchenko Y.E., Ivanov S.V., Kravchenko D.C. et al. Combination of ribosome and phage display for fast selection of high affinity VHH antibody fragments // Bulletin of Russian State Medical University. 2019. No. 1, pp. 27–33.

24. Tillib S.V., Ivanova T.I., Vasilev L.A. Fingerprint-like Analysis of “Nanoantibody” Selection by Phage Display Using Two Helper Phage Variants // *Acta Naturae*. 2010. Vol. 2, No. 3 (6), pp. 85–93.
25. Тиллиб С.В. Адаптированные однодоменные антитела для инновационных технологий // *Аллергология и иммунология*. 2016. Т. 17. № 1. С. 27–29.
26. Vyatchanin A.S., Tillib S.V. Modifications in the Phage Display Procedure to Increase Selection Efficiency of Antigen-Binding Domains on Distinguished Single-Chain Camel Antibodies // *Biotechnology in Russia*. 2008. No. 4, pp. 30–38.
27. Тиллиб С.В., Ефимов Г.А., Губернаторова Е.О. [и др.]. Получение и характеристика комбинантных однодоменных антител из ламы, специфически связывающихся с интерлейкином-6 человека // *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9 (18). № 2. С. 93–110.
28. Klooster R., Maassen B.T.H., Stam J.C. et al. Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: Clinical application of VHH antibody technology // *Journal of Immunological Methods*. 2007. Vol. 324, No. 1-2, pp. 1–12.
29. Syrova N.A., Terekhova I.V., Tereshkina N.E. et al. Culturing of Hybridomas Producing Diagnostically Significant Monoclonal Antibodies to *Francisella tularensis* // *Biotechnology in Russia*. 2012. No. 2, pp. 66–72.
30. Gribova I.Yu., Tillib S.V., Tutikhina I.L. et al. Effective Genetic Expression of Nanoantibodies by Recombinant Adenoviral Vector in vitro // *Acta Naturae*. 2011. Vol. 3, No. 3 (10), pp. 64–70.

References

1. Tillib S.V. *Molekulyarnaya biologiya*. 2011. V. 45. № 1, pp. 77–85.
2. Novikov V.V., Pimenov V.K., Vyaz'mina E.S. et al. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo. Seriya: Biologiya*. 1999. № 1, pp. 143–147.
3. Royt A., Brostoff Dzh., Meyl D. *Immunologiya* [Immunology]. M.: Mir, 2000.
4. Gusel'nikova V.V., Korzhhevskiy D.E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 2015. Vol. 7, No. 2 (25), pp. 42–47.
5. Sedykh S.E., Nevinskiy G.A. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2018. V. 5. № 2, pp. 30–40.
6. Dorokhov Y.L., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N. et al. Functional role of carbohydrate residues in human immunoglobulin G and therapeutic monoclonal antibodies. *Biochemistry* (Moscow). 2016. Vol. 81, No. 8, pp. 835–857.
7. Sakovich A.R. Profil' immunoglobulinov u patsientov s ostrym sinusitom. *Otorinolaringologiya. Vostochnaya Evropa*. 2014. № 1 (14), pp. 46–51.
8. Seleznev S.B. *Niva Povolzh'ya*. 2008. № 1 (6), pp. 59–64.

9. Gorshkova E.N., Vasilenko E.A., Tillib S.V. et al. *Meditinskaya immunologiya*. 2016. V. 18. № 6, pp. 505–520.
10. Garas M.N., Tillib S.V., Zubkova O.V. et al. Construction of a pIX-modified Adenovirus Vector Able to Effectively Bind to Nanoantibodies for Targeting. *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6, No. 2 (21), pp. 95–105.
11. Gladyshev P.P., Vasil'ev A.A., Morenkov O.S. et al. *Sovremennaya meditsina: aktual'nye voprosy*. 2016. № 51, pp. 22–48.
12. Dormeshkin D.O., Brichko E.A., Gilep A.A. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical series*. 2017. № 2, pp. 93–110.
13. Lushova A.A., Byazrova M.G., Prilipov A.G. et al. *Molekulyarnaya biologiya*. 2017. V. 51, № 6, pp. 899–906.
14. Karabelskii A.V., Nemankin T.A., Ulitin A.B. et al. Design of innovate preparations of monoclonal antibodies. *Biotechnology in Russia*. 2017. No. 1, pp. 10–29.
15. Danilov S.M. *Molekulyarnaya biologiya*. 2017. V. 51. № 6, pp. 1046–1061.
16. Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O. et al. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017. № 2, pp. 67–71.
17. Nemudraya A.A., Richter V.A., Kuligina E.V. Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands. *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8, No. 1 (28), pp. 48–57.
18. Ledebouer A.M., Besemer S., J.J.W. de Haard et al. Preventing Phage Lysis of *Lactococcus lactis* in Cheese Production Using A Neutralizing Heavy-Chain Anti-body Fragment from Llama. *Journal of Dairy Science*. 2002. Vol. 85, No. 6, pp. 1376–1382.
19. Deyev S.M., Polianovskii O.L. Monoclonal Antibodies for Diagnostics and Therapy. *Biotechnology in Russia*. 2008. No. 2, pp. 1–15.
20. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical Application. *Acta Naturae*. 2009. Vol. 1, No. 1 (1), pp. 32–50.
21. Osipova I. G., Vaganova O. A., Sakanyan E. I. Actual Problems in Standardization in RF of Biotechnological Medicinal Products on the basis of Monoclonal Antibodies. *Biotechnology in Russia*. 2017. No. 1, pp. 80–90.
22. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E. et al. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering. *Russian chemical reviews*. 2015. Vol. 84, No. 1, pp. 1–26.
23. Kravchenko Y.E., Ivanov S.V., Kravchenko D.C. et al. Combination of ribosome and phage display for fast selection of high affinity VHH antibody fragments. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2019. No. 1, pp. 27–33.
24. Tillib S.V., Ivanova T.I., Vasilev L.A. Fingerprint-like Analysis of “Nanoantibody” Selection by Phage Display Using Two Helper Phage Variants. *Acta Naturae*. 2010. Vol. 2, No. 3 (6), pp. 85–93.

25. Tillib S.V. *Allergologiya i immunologiya*. 2016. V. 17. № 1, pp. 27–29.
26. Vyatchanin A.S., Tillib S.V. Modifications in the Phage Display Procedure to Increase Selection Efficiency of Antigen-Binding Domains on Distinguished Single-Chain Camel Antibodies. *Biotechnology in Russia*. 2008. No. 4, pp. 30–38.
27. Tillib S.V., Efimov G.A., Gubernatorova E.O. et al. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2015. V. 9 (18). № 2, pp. 93–110.
28. Klooster R., Maassen B.T.H., Stam J.C. et al. Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: Clinical application of VHH antibody technology. *Journal of Immunological Methods*. 2007. Vol. 324, No. 1-2, pp. 1–12.
29. Syrova N.A., Terekhova I.V., Tereshkina N.E. et al. Culturing of Hybridomas Producing Diagnostically Significant Monoclonal Antibodies to *Francisella tularensis*. *Biotechnology in Russia*. 2012. No. 2, pp. 66–72.
30. Gribova I.Yu., Tillib S.V., Tutikhina I.L. et al. Effective Genetic Expression of Nanoantibodies by Recombinant Adenoviral Vector in vitro. *Acta Naturae*. 2011. Vol. 3, No. 3 (10), pp. 64–70.

ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ

Андреев Алексей Алексеевич, студент

Лопина Надежда Петровна, кандидат химических наук, доцент

Бордина Галина Евгеньевна, кандидат биологических наук, доцент

Некрасова Елизавета Георгиевна, кандидат медицинских наук, доцент

*Тверской государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ул. Советская, 4, г. Тверь, 170100, Российская Федерация
aandreev01@yandex.ru*

DATA ABOUT THE AUTHORS

Andreev Alexey Alekseevich, student

Lopina Nadezhda Petrovna, Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor

Bordina Galina Evgenievna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

Nekrasova Elizaveta Georgievna, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor

*Tver State Medical University of the Ministry of health of the Russian Federation
4, Sovetskaya Str., Tver, 170100, Russian Federation
aandreev01@yandex.ru*