

УДК 571.27:578.22

Эффективная экспрессия наноантител рекомбинантным аденовирусным вектором *in vitro*

И. Ю. Грибова¹, С. В. Тиллиб², И. Л. Тутыхина¹, М. М. Шмаров¹, Д. Ю. Логунов¹,
Л. В. Верховская¹, Б. С. Народицкий^{1*}, А. Л. Гинцбург¹

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, 119334, Москва,
ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: bsnar1941@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Представленная работа посвящена возможности экспрессии однодоменного мини-антитела (наноантитела), отобранного из библиотеки последовательностей переменных доменов особых одноцепочечных антител иммунизированного верблюда, ген которого введен в эукариотические клетки в составе рекомбинантного аденовирусного вектора. Вектор, несущий ген однодоменного наноантитела, получен с использованием системы AdEasy Adenoviral Vector System («Stratagene»). Показано, что такой способ доставки гена наноантитела обеспечивает его эффективную экспрессию и функциональную активность наноантитела. Полученные результаты могут использоваться при создании средств пассивной иммунизации для защиты от патогенов или иммунобиологических противотоксических препаратов нового поколения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рекомбинантный аденовирусный вектор, наноантитела, генетическая иммунизация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НЕК-293 – клетки эмбриональной почки человека; His₆-tag – последовательность из шести остатков гистидина; HA-tag – эпитоп гемагглютинина вируса гриппа, пептид YPYDVPDYA; БОЕ – бляшкообразующие единицы; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПВДФ – поливинилиденфторид; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Антитела – важнейший инструмент иммунной системы, участвующий в защите организма от патогенных микроорганизмов. Все большее значение антитела приобретают в связи с возможностью их использования не только в диагностических, но и в терапевтических целях [1]. Антитела успешно применяют при некоторых формах онкологических заболеваний. В последние десятилетия в диагностических и исследовательских целях широко используются моноклональные антитела. Однако классические методы получения моноклональных антител, основанные на работе с клетками животного происхождения, затрудняют их использование в качестве терапевтических средств. Введение таких моноклональных тел в организм человека может привести к развитию нежелательной иммунной реакции, особенно при повторном применении [2]. С целью предотвращения возникновения подобных реакций разработаны следующие подхо-

ды: получение рекомбинантных иммуноглобулинов, в которых участки, не отвечающие за распознавание антигена, заменены соответствующими фрагментами человеческого происхождения (гуманизированные антитела); удаление доменов, не вовлеченных в связывание антигена (мини-антитела). В последнее время все чаще применяются так называемые рекомбинантные технологии, основанные на работе с библиотеками последовательностей антител человека. При построении таких библиотек в экспрессионном векторе случайным перебором в одной рамке считывания с помощью линкерной последовательности соединяют переменные домены тяжелой и легкой цепи [3]. Работа с громоздкими библиотеками таких одноцепочечных антител (scFv) весьма трудоемка, а в результате редко удается получить высокоаффинное антитело. Определенные сложности связаны с нестабильностью генетических конструкций, низким уровнем экспрессии продукта и его растворимостью [4].

Существенный прорыв в этой области связан с обнаружением у представителей сем. Верблюдовых (Camelidae) неканонических антител, лишенных легких цепей и представляющих собой димер укороченных тяжелых цепей [5, 6]. Иммунный ответ с участием этих антител можно вызвать классической иммунизацией. Использование репертуара этих неканонических антител для создания библиотек последовательностей переменных доменов (только тяжелой цепи) имеет целый ряд преимуществ. Однодоменная структура узнающего переменного домена обуславливает малый размер антигенсвязывающего фрагмента (мини-антитела), его высокую стабильность и растворимость [7].

Благодаря особенностям строения мини-антитела могут использоваться для выявления эпитопов, скрытых для классических иммуноглобулинов. Экспрессия с одного гена упрощает генно-инженерные манипуляции и, как следствие, работу с библиотеками последовательностей переменных доменов. Низкая иммуногенность (обусловленная высокой гомологией последовательностей мини-антител с переменным доменом тяжелых цепей IgG3 человека) и простота гуманизации открывают широкие возможности использования мини-антител для создания лекарственных средств нового типа [8].

Описанные особенности структуры мини-антител и простота манипуляций с их генами позволяют эффективно и экономично нарабатывать мини-антитело в больших количествах, используя различные системы экспрессии [9].

Применение прокариотических систем экспрессии для продукции белков млекопитающих связано с возможной низкой функциональной активностью получаемых белков из-за отсутствия в клетках прокариот системы посттрансляционных модификаций. Кроме того, как бы тщательно ни проводилась очистка, конечный продукт может быть загрязнен пирогенами.

Один из перспективных способов доставки генетического материала в клетки-мишени – использование вирусных векторов. С помощью методов генной инженерии в геном вирусов встраивают экспрессионные конструкции, несущие один или несколько рекомбинантных генов. Для доставки генов мини-антител в целевые клетки в ряде работ предлагаются векторы на основе генома аденоассоциированного вируса [10, 11].

К наиболее универсальным инструментам доставки и экспрессии рекомбинантных генов в клетках млекопитающих относятся аденовирусные векторы. Известно, что рекомбинантные аденовирусы эффективно переносят гены бактериальных и вирусных антигенов, цитокинов, факторов роста и других белков

в клетки-мишени, обеспечивая в них высокий уровень и длительность экспрессии целевого гена [12]. Аденовирусные векторы способны трансдуцировать как делящиеся, так и постмитотические клетки; ДНК аденовируса остается во внехромосомной форме, а сам рекомбинантный вирус выводится из организма в течение 4–5 нед [13, 14].

Получение рекомбинантных аденовирусов характеризуется следующей особенностью: вирус способен размножаться только в специальных линиях клеток *in vitro*, что обеспечивает безопасность вектора [15].

Эффективное использование рекомбинантных аденовирусных векторов для экспрессии антигенсвязывающих фрагментов антител показано на примере мини-антител к клеточному эпитопу (рецептору фактора роста эпидермиса (erbB-2)) и к компоненту сибиреязвенного токсина [16, 17].

Цель данной работы – изучение возможности использования рекомбинантных аденовирусных векторов для доставки и эффективной экспрессии однодоменных мини-антител (наноантител), полученных с использованием новой перспективной технологии генерирования особых верблюжьих одноцепочечных антител. В качестве модельного антитела, на котором показана принципиальная возможность экспрессии рекомбинантными аденовирусами однодоменных антител, полученных иммунизацией представителей Верблюдовых, выбрано полученное ранее и охарактеризованное наноантитело к клеточному цитокератину-8 [18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферменты

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4, щелочную фосфатазу (CIAP) фирмы «Fermentas MBI» (Литва), Taq-полимеразу фирмы «Promega» (США).

Клеточные линии

Использовали линию клеток HEK-293 (клетки эмбриональной почки человека, трансформированные E1-областью аденовируса человека серотипа 5) и линию H1299 (клетки рака легкого человека). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФСК) производства «HyClone» (США).

Получение клона кДНК, кодирующего однодоменное мини-антитело (наноантитело), специфически узнающее эндогенный цитокератин-8 мыши

Наноантитело аСyK-V_HN, специфически узнающее цитокератин-8 мыши, получено ранее в группе Тил-

либа С.В. (ИБГ РАН, Москва) в ходе совместной работы с лабораторией Муйлдерманса (S. Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel) и использовано (путем соединения с последовательностью флуоресцентного белка) для получения флуоресцентных наноантител («fluorescent nanobody», или «chromobodies») с целью демонстрации нового метода слежения за антигеном в живой клетке. Следует отметить, что наноантитело аСук-V_HN было одним из первых наноантител к эндогенным структурным белкам эукариот. Первый этап его получения включал иммунизацию двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) экстрактом белков из клеток мягких тканей мыши (в основном из печени). Последующую процедуру селекции, основанную на методе фагового дисплея, проводили, как описано в онлайн-приложении к статье [18]. Принципиальным этапом после отбора наиболее обогащающихся клонов наноантител была идентификация узнаваемого этими наноантителами неизвестного антигена. Белки из зоны связывания наноантитела при Вестерн-блот-анализе дополнительно разделяли с помощью электрофореза до индивидуальных продуктов, затем с помощью Вестерн-блоттинга анализировали узнавание каждого продукта наноантителом. Узнаваемый наноантителом продукт идентифицировали с помощью масс-спектрометрического анализа его трипсинового гидролизата. Полученное в результате наноантитело аСук-V_HN узнавало цитокератин-8, что подтверждено и иммунофлуоресцентным окрашиванием этими антителами линии миобластов (C2C12) мыши, выявившее характерное распределение в цитоплазме промежуточных цитокератиновых филаментов.

Получаемое в периплазме бактерий наноантитело аСук-V_HN с целью его очистки и облегчения детекции было адаптировано путем присоединения к С-концу антигенузнающей последовательности еще двух небольших фрагментов: эпитопа гемагглютинина вируса гриппа (HA-tag) и шести остатков гистидина (His₆-tag).

Получение рекомбинантного аденовируса

Плазмиды и рекомбинантный аденовирусный вектор получали с использованием гена наноантитела к цитокератину аСук-V_HN. Нуклеотидная последовательность, кодирующая наноантитело, получена химическим синтезом в ЗАО «Евроген». Для конструирования плазмидного вектора рAd-аСук-V_HN, содержащего геном рекомбинантного аденовируса с делецией области E1 и встроенной вместо нее кассетой экспрессии трансгена, методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* использовали систему AdEasy Adenoviral Vector System («Stratagene», США). Рекомбинантный аденовирус получали,

трансфицируя клетки линии HEK-293 линейаризованной по PacI-сайту плазмидной конструкцией рAd-аСук-V_HN. Для трансфекции использовали Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя. Контролем служил рекомбинантный аденовирус человека серотипа 5 с делецией области E1 и встроенной вместо нее кассетой экспрессии без трансгена – Ad-null.

Для накопления препаратов аденовируса на монослой клеток HEK-293 с конфлюэнтностью 50–70% наносили суспензию зараженных клеток (10⁷ БОЕ вируса на чашку Петри диаметром 15 см). Суспензию инфицированных клеток разрушали с помощью трех циклов замораживания-оттаивания и осветляли центрифугированием (2000 об/мин, 10 мин, +4°C).

Титры препаратов Ad5-аСук-V_HN и Ad-null, равные 10⁸ БОЕ/мл, определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK-293.

Заражение клеток рекомбинантным аденовирусом

Рекомбинантными аденовирусами инфицировали ~10⁶ клеток линии H1299. Клетки рассеивали примерно до 70% монослоя, растили в течение 24 ч и заражали рекомбинантным аденовирусом (множественность инфекции 100 БОЕ на клетку) в среде DMEM, содержащей 2% ФСК. Через 2 ч после внесения вирусного препарата отбирали среду, промывали клеточную культуру и добавляли свежую среду DMEM. Среду от зараженных клеток отбирали через 72 ч после инфекции и концентрировали центрифужной ультрафильтрацией через мембрану с номинально отсекаемой молекулярной массой 10 кДа. Сконцентрированный в 10 раз супернатант фракционировали в 10% полиакриламидном геле и использовали для анализа методом иммуноблоттинга.

Подготовка антигена

Лизат гомогенизированной печени мыши линии BALB/c получали экстракцией буфером RIPA (50 мМ Трис-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.5% натрия дезоксихолат, набор ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария)). Концентрацию суммарного белка в пробах измеряли по методу Бредфорд («Sigma-Aldrich», США). Пробы с одинаковой концентрацией белка наносили на гель для разделения с помощью электрофореза.

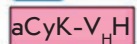
Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Клеточные белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. В качестве стандарта молекулярных масс использовали Protein Test Mixture 4 («Serva», Гер-

А



лидерная последовательность, обеспечивающая секрецию целевого белка

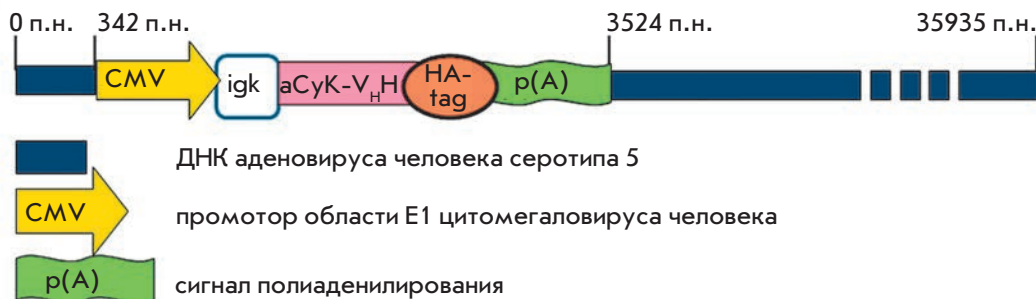


ген нанoантитела к цитокератину-8



эпитоп гемагглютинаина вируса гриппа

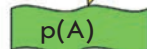
Б



ДНК аденовируса человека серотипа 5



промотор области E1 цитомегаловируса человека



сигнал полиаденилирования

мания). После гель-электрофореза белки переносили на ПВДФ-мембрану Hybond-P («GE Healthcare», США) с помощью TE70 Semi-Dry Transfer Unit («Hoefer Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя оборудования. Нанoантитела детектировали с использованием конъюгата антител к HA-эпитопу вируса гриппа с пероксидазой хрена Monoclonal Anti-HA–Peroxidase antibody («Sigma-Aldrich», США). Иммунообезвреженные белки выявляли с использованием ECL Plus Western Blotting Detection Reagents («GE Healthcare», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Хемилюминесцентное излучение регистрировали с помощью рентгеновской пленки Amersham Hyperfilm ECL («GE Healthcare», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате ранее проведенной селекции фаговой библиотеки антигенсвязывающих доменов одноцепочечных антител отобрали ДНК фагмиды pHEN4 со вставкой, кодирующей нанoантитело, которое обладает высокой аффинностью к структурному цитоплазматическому белку мыши – цитокератину-8. Данные о структуре белка-мишени получены на основании масс-спектрометрической идентификации. Нуклеотидную последовательность, кодирующую нанoантитело, клонировали в рекомбинантном аденовирусном векторе.

Чтобы обеспечить эффективную внеклеточную экспрессию нанoантитела к его N-концу присоединяли лидерный пептид κ -цепи иммуноглобулина мыши. К C-концу нанoантитела присоединяли HA-tag, который эффективно узнается коммерческими антителами, что необходимо для подтверждения экспрессии нанoантитела на уровне белка. На рис. 1 представлена схема полученной конструкции.

Для конструирования аденовирусного вектора последовательность, кодирующую нанoантитело aCyK-VH, меченное HA-tag, клонировали в челночном плазмидном векторе pShuttle-CMV («Stratagene», США). Этот вектор содержит концевые фрагменты генома аденовируса человека серотипа 5, кассету экспрессии, содержащую промотор цитомегаловируса человека (CMV) и сигнал полиаденилирования. Наличие вставки и ее ориентацию подтверждали рестрикционным картированием.

Рекомбинантный плазмидный аденовирусный вектор, несущий целевой ген, получали методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli*. Полученная плазмидная конструкция содержит сайт инициации репликации ori, ген устойчивости к антибиотику и кассету с целевым геном в составе генома аденовируса. Преимущество этого метода состоит в возможности использования клеток *E. coli* в качестве основного инструмента для клонирования, рекомбинации и получения аденовирусной ДНК в препаративных

Рис. 1. Схематическое изображение использованных генетических конструкций. А – Конструкция, содержащая ген нанoантитела к цитокератину-8. Б – Геном рекомбинантного аденовируса, несущий ген нанoантитела к цитокератину-8.

количествах. Возможность проведения гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* позволяет работать с индивидуальными клонами, содержащими плазмидные конструкции только с рекомбинантными аденовирусами, что исключает вероятность контаминации аденовирусом дикого типа.

Челночную плазмидную конструкцию, несущую кассету экспрессии с геном наноантитела, линейаризовали по PmeI-сайту и вместе с pAd-EASY («Stratagene»), вводили в клетки *E. coli* BJ5183 методом электропорации. Рекомбинантные клоны, полученные в результате гомологичной рекомбинации, отбирали на селективной среде с канамицином (50 мкг/мл). Присутствие в плазмидной ДНК рекомбинантных клонов нуклеотидных последовательностей, кодирующих наноантитело аСyК-V_HH и фибера аденовируса человека серотипа 5, анализировали методом ПЦР со специфическими праймерами, а также с помощью рестрикционного картирования с использованием рестриктазы HindIII, что позволяет получить характерную для генома аденовируса человека рестрикционную картину.

Клетки HEK-293 трансфицировали расщепленной по сайту PacI плазмидой, содержащей геном рекомбинантного аденовируса с делецией области E1 и встроенной вместо нее кассеты экспрессии с трансгеном. Полученный рекомбинантный аденовирус Ad5-аСyК-V_HH анализировали методом ПЦР с использованием пары праймеров, комплементарных целевому гену, гену гексона аденовируса человека серотипа 5, а также области E1 аденовируса, для контроля возможного присутствия репликативно-компетентных вирусных частиц.

Детекция экспрессии гена наноантитела в составе рекомбинантных аденовирусов Ad5-аСyК-V_HH

Экспрессию целевого гена в составе рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5 Ad5-аСyК-V_HH анализировали на уровне мРНК. С этой целью клетки линии HEK-293, перmissive для аденовируса человека серотипа 5, заражали рекомбинантным вирусом Ad5-аСyК-V_HH. Суммарную РНК зараженных клеток использовали для получения кДНК, которую анализировали методом ПЦР с праймерами, специфическими к последовательности гена наноантитела к цитокератину-8 мыши, к вирусной ДНК и конститутивно экспрессируемому гену глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). В качестве отрицательного контроля использовали клетки линии HEK-293, зараженные вирусом Ad-null (рис. 2А). В результате ОТ-ПЦР показано, что рекомбинантный аденовирусный вектор экспрессирует мРНК гена наноантитела к цитокератину и может использоваться для анализа продукции белка.

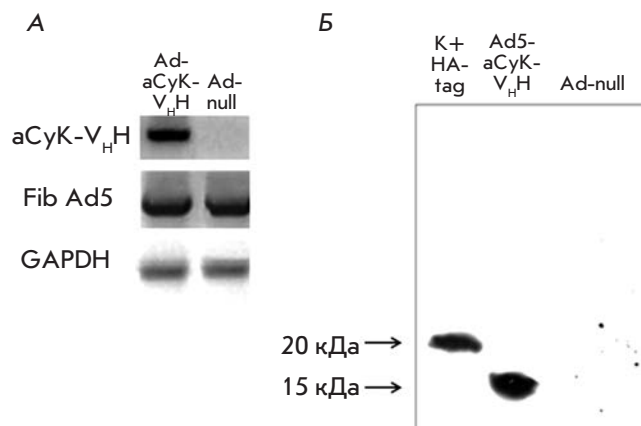


Рис. 2. Анализ экспрессии наноантитела рекомбинантным аденовирусным вектором. А – Методом обратной транскрипции и последующей ПЦР с праймерами, специфическими к последовательности гена наноантитела (аСyК-V_HH), гена фибера аденовируса человека серотипа 5 (*Fib Ad5*) и конститутивно экспрессируемого гена *GAPDH*, показана экспрессия наноантитела на уровне РНК в клетках, инфицированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-аСyК-V_HH. В качестве контроля специфичности ПЦР-анализа использовали РНК клеток, инфицированных аденовирусным вектором без трансгена (Ad-null). Б – Вестерн-блот-анализ экспрессии наноантитела клетками, инфицированными рекомбинантным аденовирусом Ad5-аСyК-V_HH и Ad-null. Гибридизация с коммерческими антителами к HA-эпитопу вируса гриппа выявила синтез белка 15 кДа в культуральной жидкости инфицированных аденовирусом Ad5-аСyК-V_HH клеток. В качестве контроля образования комплекса антиген (HA-эпитоп)–антитело (анти-HA–конъюгат) использовали охарактеризованный рекомбинантный белок, содержащий HA-эпитоп (наноантитело, наработанное в бактериях и содержащее помимо HA-эпитопа полигистидиновую последовательность (His₆-tag)).

Экспрессию наноантитела на уровне трансляции анализировали в клетках H1299, инфицированных рекомбинантным аденовирусом, несущим ген наноантитела аСyК-V_HH, меченного HA-эпитопом вируса гриппа (Ad5-аСyК-V_HH), и рекомбинантным аденовирусом, содержащим кассету экспрессии без трансгена (Ad-null). Присутствие наноантитела в культуральной среде зараженных клеток определяли методом иммуноблотинга с антителами к HA-эпитопу вируса гриппа, конъюгированными с пероксидазой хрена (рис. 2Б).

Биологическая активность

Специфичность экспрессируемого аденовирусным вектором наноантитела к цитокератину подтверж-

дали, сравнивая взаимодействие с антигеном белков культуральной жидкости от инфицированных рекомбинантным аденовирусом клеток и очищенного из периплазмы клеток *E. coli* наноантитела.

Лизаты клеток печени и головного мозга мыши фракционировали в полиакриламидном геле, переносили на ПВДФ-мембрану, которую инкубировали с культуральной средой клеток, инфицированных Ad5-аСyК-V_HN. Экспрессируемое наноантитело служило первичным антителом к белку-мишени (цитокератин-8 мыши, 55 кДа), выявляемому в суммарном лизате. Параллельно мембрану инкубировали с антителами аСyК-V_HN, полученными в периплазме клеток *E. coli*.

На рис. 3 представлены результаты электрофореза белковых лизатов в полиакриламидном геле и иммуноблотинга с наноантителами аСyК-V_HN после проявления вторичными антителами к НА-эпитопу вируса гриппа, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Результаты иммуноблотинга свидетельствуют о том, что экспрессируемое аденовирусом наноантитело обладает такой же специфичностью, как и синтезируемое в периплазме клеток *E. coli*, ген которого клонировали в рекомбинантном аденовирусе.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существует ряд технологий получения мини-антител с заданной специфичностью. Сравнительно недавно обнаружено, что у представителей семейства Camelidae (Верблюдовые) помимо классических антител в относительно больших количествах образуются функционально активные неканонические одноцепочечные антитела. Это позволяет получать мини-антитела на основе библиотек генов антигенузнающих доменов одноцепочечных антител иммунизированных животных. Неканонические антитела состоят из димера только одной укороченной тяжелой цепи иммуноглобулина (без легких цепей). Однодоменные мини-антитела (наноантитела) являются генно-инженерными производными антигенузнающих доменов этих неканонических антител. Отбор клонов мини-антител с заданной специфичностью из библиотеки последовательностей всего репертуара антигенузнающих доменов неканонических антител иммунизированного верблюда основан на высокоэффективной процедуре функциональной селекции частиц нитчатого фага, содержащих как экспонированное на поверхности мини-антитело, так и кодирующую его ДНК в составе фаговой частицы («фаговый дисплей»).

Полученные по этой технологии мини-антитела обладают высокой стабильностью, растворимостью, низкой иммуногенностью. Мини-антитела могут быть

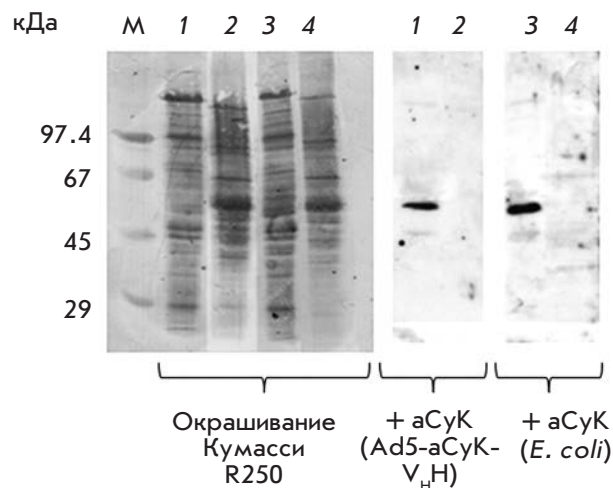


Рис. 3. Подтверждение функциональной активности наноантитела методом иммуноблотинга. Разделенный электрофорезом в полиакриламидном геле экстракт белков клеток печени (дорожки 1 и 3) и головного мозга мыши (дорожки 2 и 4) переносили на ПВДФ-мембрану, после чего детектировали специфическое взаимодействие наноантител, экспрессируемых рекомбинантным аденовирусным вектором и полученных в периплазме клеток *E. coli*, с белком-мишенью (~ 55 кДа).

получены (отобраны) к разнообразным эпитопам антигенов, в том числе и к консервативным, которые зачастую невозможно получить по традиционной технологии. Поскольку для каждого мини-антитела известна кодирующая его нуклеотидная последовательность, возможно получение соответствующего белка в любой из известных систем экспрессии (прокариотических и эукариотических).

Экономически наиболее оправдано получение белковых препаратов мини-антител в клетках *E. coli*, в дрожжах или в клетках СНО. При введении таких препаратов экспериментальным животным (или пациентам) следует учитывать очень короткое время их жизни в организме (менее 24 ч). Увеличить период терапевтического действия препаратов на основе мини-антител можно с помощью векторных систем, обеспечивающих синтез действующего вещества непосредственно в инфицированных клетках организма. Оптимальной системой экспрессии для решения таких задач являются рекомбинантные аденовирусы. Их безопасность и эффективность доказана в ходе целого ряда клинических испытаний, проводимых во всем мире, а период продукции ими целевого белка составляет около 20 дней.

Возможность использования рекомбинантных аденовирусных векторов для экспрессии генов анти-

генузнающих фрагментов одноцепочечных антител двугорбого верблюда исследована в нашей работе. Нами показана возможность экспрессии гена наноантитела с использованием аденовирусного вектора. Экспрессия трансгена подтверждена на уровне РНК-транскрипта и белкового продукта. Специфическое взаимодействие секретируемого эукариотическими клетками наноантитела с белком-мишенью свидетельствует о сохранении его функциональной активности. Для количественной оценки эффективности экспрессии наноантител с использованием рекомбинантного аденовируса необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

Доставка гена однодоменного мини-антитела (наноантитела), отобранного из библиотеки последовательностей переменных доменов особых одноцепочечных антител иммунизированного верблюда, в эукариотические клетки с помощью рекомбинантного аденовирусного вектора обеспечивает эффективную экспрессию и функциональность наноантитела. Результаты работы могут быть использованы при создании средств пассивной иммунизации для защиты от патогенов или при создании нового поколения иммунобиологических противотоксических препаратов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
2. Stern M., Herrmann R. // *Critical Rev. Oncol./Hematol.* 2005. V. 54. P. 11–29.
3. Robinson C.R., Sauer R.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 5929–5934.
4. Worn A., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 989–1010.
5. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. // *Nature*. 1993. V. 363. P. 446–448.
6. Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология*. 2011. Т. 45. № 1. С. 77–85.
7. van der Linden R.H., Frenken L.G., de Geus B., Harmsen M.M., Ruuls R.C., Stok W., de Ron L., Wilson S., Davis P., Verrips C.T. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1431. P. 37–46.
8. Vincke C., Loris R., Saerens D., Martinez-Rodriguez S., Muyldermans S., Conrath K. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 3273–3284.
9. Ghassabeh G., Muyldermans S., Saerens D. // *Curr. Trends Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*. / Ed. Shire S.J. N.Y.: Springer, 2010. P. 29–48.
10. Campana V., Zentilin L., Mirabile I., Kranjc A., Casanova P., Giacca M., Prusiner S.B., Legname G., Zurzolo C. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. P. 507–515.
11. Zuber C., Mitteregger G., Schuhmann N., Rey C., Knackmuss S., Rupprecht W., Reusch U., Pace C., Little M., Kretzschmar H.A., et al. // *J. Gen. Virol.* 2008. V. 89. P. 2055–2061.
12. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Руднева И.А., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Логунов Д.Ю. и др. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 1. С. 119–126.
13. Tutykhina I.L., Bezborodova O.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Neugodova G.L., Nemtsova E.R., Naroditsky B.S., Yakubovskaya R.I., Gintsburg A.L. // *Protein Expr. Purif.* 2009. V. 65. P. 100–107.
14. Тутыхина И.Л., Безбородова О.А., Верховская Л.В., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Немцова Е.Р., Народицкий Б.С., Якубовская Р.И., Гинцбург А.Л. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2009. № 1. С. 27–31.
15. Tutykhina I.L., Logunov D.Y., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M., Tikhvatulin A.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *J. Mol. Med.* 2011. V. 89. P. 331–341.
16. Arafat W.O., Gómez-Navarro J., Buchsbaum D.J., Xiang J., Wang M., Casado E., Barker S.D., Mahasreshti P.J., Haisma H.J., Barnes M.N., et al. // *Gene Therapy*. 2002. V. 9. P. 256–262.
17. Kasuya K., Boyer J.L., Tan Y., Alipui D.O., Hackett N.R., Crystal R.G. // *Mol. Therapy*. 2005. V. 11. P. 237–244.
18. Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M.C., et al. // *Nature Meth.* 2006. V. 3. P. 887–889.