

©Коллектив авторов

## ОДНОДОМЕННЫЕ АДАПТИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, ПОДАВЛЯЮЩИЕ РАЗВИТИЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

С.В. Тиллиб<sup>1\*</sup>, Е.Ю. Морзунова<sup>2</sup>, Т.И. Иванова<sup>1</sup>, Е.А. Королева<sup>2</sup>, М.В. Рutowская<sup>1</sup>, Н.А. Зигангирова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена, Москва; эл. почта: tillib@genebiology.ru

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Технология генерирования однодоменных рекомбинантных моноклональных антител (наноантител), базирующаяся на иммунизации верблюда, клонировании индуцированных последовательностей, кодирующих однодоменные антиген-узнающие фрагменты неканонических верблюжьих антител, а также на функциональной селекции клонов наноантител методом фагового дисплея, была использована с целью получить новые эффективные инструменты для более эффективной диагностики хламидийной инфекции и для разработки новых подходов для эффективной терапии. Были получены два перспективных наноантитела, которые показали эффективное связывание с внеклеточными и внутриклеточными формами *Chlamydia trachomatis*, а также обладали активностью, подавляющей развитие хламидийной инфекции в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** рекомбинантное однодоменное антитело, хламидия, урогенитальная инфекция

**DOI:** 10.18097/PBMC20176305461

### ВВЕДЕНИЕ

Урогенитальный хламидиоз – одно из самых распространенных инфекционных заболеваний, передающееся половым путём, и представляющее актуальную социально-значимую медицинскую проблему. Не диагностированные случаи первичной инфекции приводят к развитию тяжелых осложнений, среди которых женское и мужское бесплодие, воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), патология беременности и новорожденных. В основе этих заболеваний лежит хронический инфекционный процесс, сопровождающийся хроническим воспалением и иммунопатологией [1, 2].

В настоящее время для диагностики хламидийной инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*, разработаны и используются методы микробиологического выявления самого возбудителя и молекулярно-биологические методы детекции нуклеотидных последовательностей и различных антигенов возбудителя. Однако в этой области сохраняется еще целый ряд нерешенных проблем. Во-первых, микробиологическое выделение патогена затруднено из-за биологических особенностей хламидий. Во-вторых, ввиду того, что постановка диагноза хламидийной инфекции требует проведения интенсивного курса антибиотикотерапии, часто с использованием нескольких препаратов, при диагностике урогенитального хламидиоза необходимо использовать не менее 2-х методов, отвечающих требованиям строгой специфичности и чувствительности. Одним из таких методов является ПЦР, который должен быть подтвержден методом иммунодетекции возбудителя [3, 4]. И, в-третьих, в последнее время в связи с актуальностью контроля за распространением хламидийной инфекции особое значение приобретает разработка быстрых скрининговых тестов, что позволит поставить диагноз и начать лечение уже после первого обследования

пациента, так называемые “point of care” (POC) тесты. Одним из наиболее перспективных из них является бесприборный экспресс-метод на основе иммунохроматографического принципа [5, 6]. Тем самым, современные тенденции в диагностике социально-значимых инфекций требуют использования строго специфичных и высокоаффинных моноклональных антител в тестах по выявлению антигенов возбудителя в формате технологичного ИФА, иммуногистохимического исследования и быстрого иммунохроматографического метода, что может быть эффективно реализовано, в частности, на основе особых однодоменных антител (“наноантител”, “nanobodies”). Наноантитела – рекомбинантные белки, являющиеся производными однодоменных антиген-узнающих вариабельных фрагментов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких цепей, и присутствующих, наряду с обычными антителами, в норме у представителей сем. *Camelidae* (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Особые свойства наноантител могут обеспечить определенные преимущества при их использовании по сравнению с антителами традиционной структуры и их производными [7-12].

Так, малый размер облегчает всевозможные генно-инженерные модификации исходно получаемых наноантител. Наноантитела обладают высокой растворимостью и стабильностью. Они способны формировать необычные паратопы и узнавать необычные для классических антител уникальные нативные эпитопы (преимущественно конформационные эпитопы, небольшие углубления, активные центры белков), что может приводить к особо высокой специфичности узнавания. Наконец, наличие эффективной процедуры генерирования и отбора однодоменных антител, простота их наработки делают их получение и использование экономичным и технологичным.

\* - адресат для переписки

Однодоменные антитела к факторам патогенности и иммуногенным эпитопам обладают огромным потенциалом для использования в качестве терапевтических средств. При лечении хламидийных инфекций, особенно при хроническом течении, применение пассивной иммунизации как альтернативной антибиотикам терапии может быть направлено как на нейтрализацию адгезии и внутриклеточного проникновения, так и на ингибирование факторов патогенности, запускающих тяжелые иммунопатологические состояния, приводящие к бесплодию и патологии беременности.

Тем самым, разработка однодоменных наноантител к хламидийным антигенам позволит принципиально усовершенствовать диагностику хламидийной инфекции, а также даст возможность разрабатывать новые подходы для эффективной терапии.

## МЕТОДИКА

*Иммунизация верблюда, получение библиотеки кДНК-последовательностей, кодирующих однодоменные антиген-узнающие фрагменты особых антител верблюда, селекция, модификация и наработка однодоменных антител*

Иммунизацию двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* проводили на научно-экспериментальной базе “Черноголовка” Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ЦКП “Живая коллекция диких видов млекопитающих”). В качестве антигена использовали препарат нативных очищенных элементарных телец *C. trachomatis* штамма Bu-434 (целые бактериальные клетки), инактивированных УФ-облучением и препарат комплекса белков наружной мембраны клеточной стенки *C. trachomatis* штамма Bu-434 без ЛПС, выделенный, как описано ранее [13]. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых для научных целей.

Перед инъекцией препарат антигена смешивали с равным объемом адьюванта (Adjuvant LQ, “Gerbu Biotechnik”, Германия). Вторую стадию инъекций проводили через 3 недели после первой, а остальные три стадии проводили с 10-дневными интервалами. Кровь (150 мл) для экспериментов брали из яремной вены через 5 дней после последней инъекции. Для предотвращения свертывания кровь сразу же при отборе разводили равным объемом PBS, содержащим гепарин (100 ед./мл.) и ЭДТА (3 мМ).

Клонирование кДНК-последовательностей, кодирующих однодоменные антитела, проводили по традиционной схеме (выделение РНК из мононуклеарной фракции крови иммунизированного верблюда, синтез кДНК, двухстадийная ПЦР со специфическими праймерами, рестрикция и очистка вставок, встраивание вставок в фагмидный вектор, трансформация бактерий) как описано ранее [14-17].

Селекцию клонов кодирующих последовательностей наноантител проводили методом модифицированного

фагового дисплея аналогично процедурам, описанным ранее [14].

Исходно отбираемые моновалентные однодоменные антитела чаще всего обладают высокой специфичностью, но недостаточно сильными биологическими активностями. С целью существенно повысить эти активности, исходно отобранные однодоменные антитела модифицировали, как описано ранее [18] с целью получить их тримеризованные версии.

Продукцию наноантител проводили в *E. coli* (штамм BL21) как описано ранее [14-18]. Экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ индолил-бета-D-галактопиранозидом и клетки инкубировали при интенсивном перемешивании в течение 5 ч при 37°C или в течение ночи при 25°C. Наноантитела выделяли из периплазматического экстракта с использованием аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе с использованием системы для очистки QIAexpressionist (“QIAGEN”, США).

*Метод микроиммунофлуоресценции для выявления хламидийных клеток*

Суспензию хламидийных клеток 4-х видов хламидий, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. psittaci*, в овальбумине кур наносили на предметные стекла, высушивали и фиксировали охлажденным ацетоном. Серии разведений анализируемых антител, от 0,5 до 5 мкг/мл, инкубировали с нанесенным антигеном в течение 30 мин при 37°C. Детекцию связавшихся антител проводили с помощью анти-НА антител мыши, вторичных антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Результаты оценивали при просмотре в люминесцентном микроскопе при увеличении 1000.

*Метод иммунофлуоресценции для выявления внутриклеточных хламидий*

Эукариотическая культура клеток McCoу была заражена *C. trachomatis* по стандартной методике [19]. Суточный монослой клеток заражали штаммом *C. trachomatis* Bu-434 внесением культуры *C. trachomatis* в культуральную среду с последующим центрифугированием. Клетки инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Затем клетки фиксировали ацетоном и инкубировали с 5% овальбумином для предотвращения неспецифического связывания. Способность наноантител связываться с *C. trachomatis*, формирующей внутриклеточные включения в эукариотических клетках, проверяли с использованием метода иммунофлуоресцентного анализа по стандартному протоколу. В качестве контроля использовали фиксированные незараженные клетки. Детекцию связавшихся антител проводили с помощью анти-НА антител мыши и вторичных антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ).

*Метод нейтрализации хламидийной инфекции in vitro*

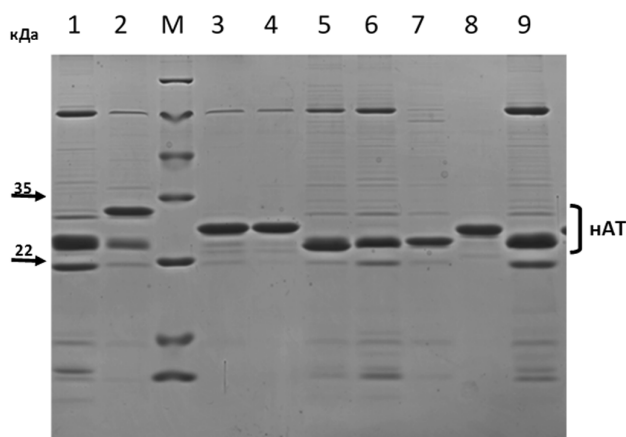
*C. trachomatis* (10<sup>5</sup> БОЕ) добавляли к разведениям наноантител и инкубировали при 37°C

в течение 45 мин. В качестве контроля использовали неиммунную мышиную сыворотку. После этого, прединкубированные элементарные тельца наносили на монослой клеток McCoу, клетки центрифугировали 1 ч при 1500 об/мин и инкубировали в течение 48 ч в среде DMEM с циклогексимидом (1 мг/мл). Клетки фиксировали ацетоном, после чего окрашивали моноклональными антителами к белку МOMP *C. trachomatis* конъюгированными с ФИТЦ. Препараты просматривали в люминесцентном микроскопе при увеличении  $\times 1000$ . В 10-ти случайных полях зрения подсчитывали процент инфицированных клеток при сравнении с контролем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение панели наноантител, связывающихся с препаратами хламидий

Первичные однодоменные антитела против хламидий генерировали, как описано в разделе “Методика”. В качестве антигенного материала для селекции использовали те же, что и для иммунизации, препараты нативных очищенных элементарных телец *C. trachomatis*, инактивированных УФ-облучением, и препарат комплекса белков наружной мембраны клеточной стенки *C. trachomatis*. В результате всех проведённых процедур были отобраны 16 первичных клонов кДНК-последовательностей, кодирующих однодоменные антитела. Последовательности этих клонов были просеквенированы. Было выявлено 9 групп заметно различающихся вариантов клонов (названы aCt1-aCt9). Пять вариантов были представлены уникальными клонами, а остальные 4 группы (aCt1-aCt4) состояли из двух или трёх практически идентичных клонов. Представители всех групп были адаптированы (с целью получить параллельно тримеризующиеся производные) и наработаны (рис. 1). В денатурирующем 14%-м полиакриламидном геле однодоменные модифицированные антитела (после диссоциации тримера) движутся в районе 27-30 кДа.



**Рисунок 1.** Выделенные модифицированные наноантитела (нАТ), фракционированные в 14% SDS-полиакриламидном геле. Взяты представители всех 9 различающихся групп отобранных клонов, обозначенные номерами с 1 до 9. М – маркер (обозначены маркерные полосы в зоне фракционируемых наноантител).

### Определение специфического связывания полученных наноантител с *C. trachomatis*

Способность однодоменных наноантител специфично связывать антигены *C. trachomatis* проверяли с использованием метода микроиммунофлуоресцентного анализа (МИФ). Для этого теста использовали внеклеточные формы хламидий, элементарные тельца, четырёх видов представителей семейства *Chlamydiaceae*: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. psittaci*. МИФ проводили по стандартному протоколу [20].

Были проанализированы представители всех 9 полученных групп наноантител.

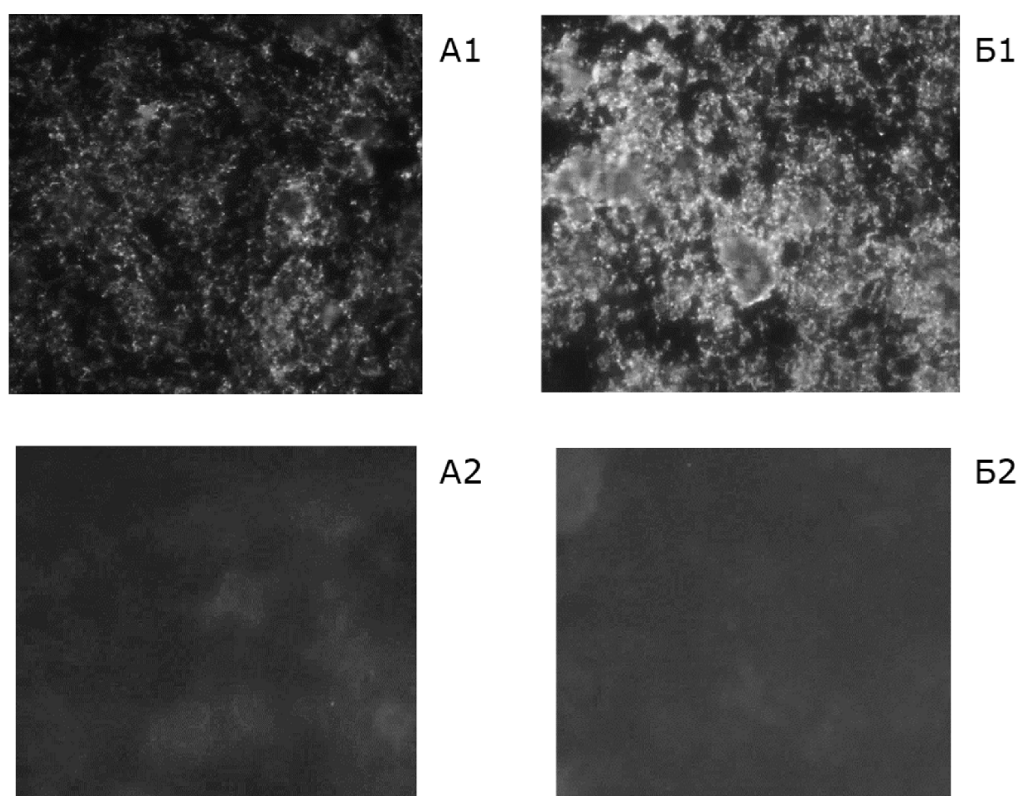
В реакции МИФ было показано, что антитела только 5 групп из 9 связывались в концентрации 10 мкг/мл с внеклеточными формами *C. trachomatis*. В случае специфического связывания антител с антигеном наблюдалось ярко-зелёное свечение. Кроме этого, при оценке специфичности связывания в отношении *C. trachomatis* было показано, что из 5 вариантов только 2, антитела aCt1 и aCt2, не давали положительного (по-видимому, неспецифического) сигнала с другими видами хламидий *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. muridarum* (рис. 2). Тем самым, было показано специфическое связывание с внеклеточными формами *C. trachomatis* полученных наноантител aCt1 и aCt2.

### Определение специфического связывания полученных наноантител с внутриклеточными хламидиями

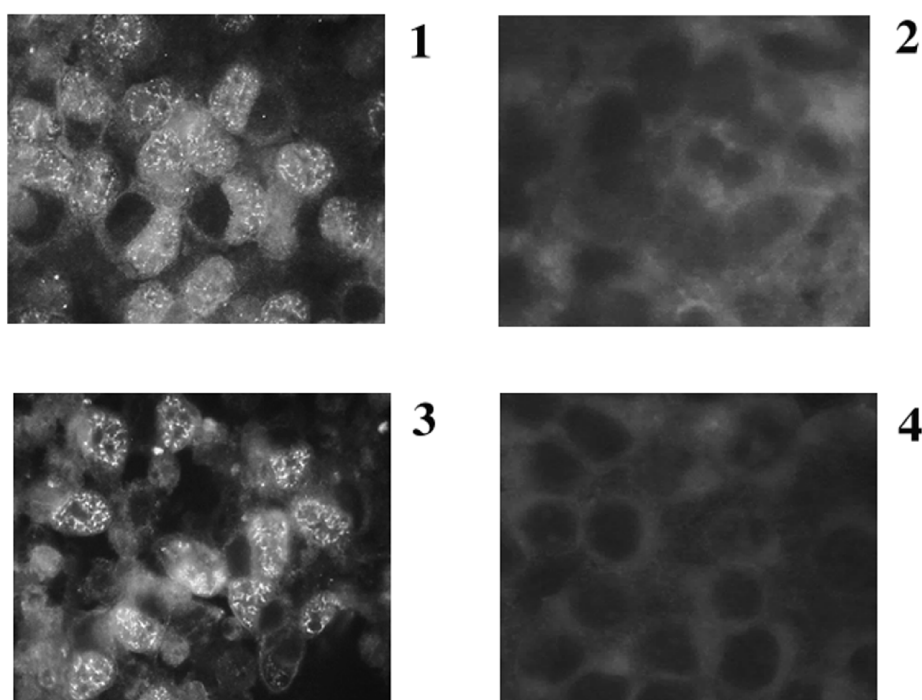
Хламидии – облигатные внутриклеточные патогены, и в условиях *in vitro* культивируются в эукариотических клетках. После проникновения в клетку хозяина элементарные тельца локализуются в фагосоме, где начинается внутриклеточный этап жизненного цикла. В результате дифференциации в вегетативные формы, так называемые ретикулярные тельца, и их деления в цитоплазме хозяйской клетки формируются внутриклеточные хламидийные включения. Способность наноантител связываться с внутриклеточными формами *C. trachomatis* проверяли с использованием метода иммунофлуоресцентного анализа по стандартному протоколу. В качестве контроля использовали фиксированные незараженные клетки. В случае специфического связывания антител с хламидиями в инфицированных эукариотических клетках выявляются вакуоли, содержащие хламидии и имеющие ярко-зелёное свечение.

Полученные наноантитела aCt1 и aCt2 в концентрации 5 мкг/мл связывались с внутриклеточными хламидиями в отличие от других вариантов (групп) наноантител, которые давали неспецифическое свечение в межклеточном пространстве или по периферии клеток (рис. 3).

Таким образом, были выбраны наноантитела, демонстрирующие специфическое связывание с *C. trachomatis*, в условиях развития внутри хозяйской клетки.



**Рисунок 2.** Результаты микроиммунофлуоресцентного (МИФ) анализа, демонстрирующего специфическое связывание *C. trachomatis* наноантителами aCt1 (A1) и aCt2 (B1) и отсутствие связывания с белком овальбумином (A2 и B2, аналогичное негативное связывание было и с тремя другими видами хламидий - *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. psittaci*). Детекцию связавшихся наноантител проводили с помощью анти-НА антител мыши и вторичных антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ).  $\times 1000$ .



**Рисунок 3.** Результаты анализа специфического связывания однодоменных наноантител с *C. trachomatis*, формирующих внутриклеточные включения в эукариотических клетках: 1 - клетки McCoу, инфицированные *C. trachomatis* и окрашенные наноантителами aCt1; 2 - неинфицированные клетки McCoу, окрашенные наноантителами aCt1; 3 - клетки McCoу, инфицированные *C. trachomatis* и окрашенные наноантителами aCt2; 4 - неинфицированные клетки McCoу, окрашенные наноантителами aCt2.

*Последовательности отобранных наноантител, специфически связывающихся с C. trachomatis*

Из нуклеотидных последовательностей кДНК, кодирующих два отобранных однодоменных наноантитела, были выведены соответствующие аминокислотные последовательности этих антител, aCt1 и aCt2, (рис. 4). В указанных последовательностях подчеркнуты соответственно (слева направо, от N- к С-концу) гипервариабельные участки CDR1, CDR2 и CDR3. Стрелками указаны позиции аминокислотных остатков, являющихся характеристическими для вариабельных доменов особых одноцепочечных антител верблюда (отличающихся от остатков в вариабельных доменах тяжелых цепей классических антител). Из сравнения последовательностей двух отобранных антител видно, что их последовательности сильно различаются.

Из структуры антитела aCt1 можно предположить, что у него имеется дополнительная стабилизирующая структура связь (цистеин-цистеин, С-С) между первым и третьим гипервариабельными участками (CDR1 и CDR3). В случае антитела aCt2 такой дополнительной связи нет. Скорее всего, столь разные структуры этих антител могут указывать на различия узнаваемых ими антигенов или эпитопов поверхностных белков хламидии *C. trachomatis*.

*Оценка нейтрализующей активности полученных наноантител к C. trachomatis in vitro*

Для постановки реакции нейтрализации использовали наноантитела в различных концентрациях: 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл. Инфекционные формы, элементарные тельца, *C. trachomatis* инкубировали с наноантителами перед заражением клеток McCoу. Инфекционность возбудителя оценивали по развитию инфекции в клетках, которую выявляли с помощью окрашивания *C. trachomatis* видоспецифическими моноклональными антителами.

В контрольных препаратах через 48 ч после заражения *C. trachomatis* в клетках выявлялись крупные внутриклеточные хламидийные включения, имеющие ярко-зелёное свечение. В случае

прединкубации элементарных телец *C. trachomatis* с наноантителами aCt1 и aCt2 в концентрациях наноантител 5 и 10 мкг/мл, наблюдалось значительное снижение количества включений в монослое клеток, а также уменьшение их размеров при сравнении с контролем. Для наноантител серии 1-30 при концентрации 10 мкг/мл наблюдали выраженное изменение размеров хламидийных включений. Таким образом, было продемонстрировано ингибирующее действие наноантител на внутриклеточное развитие *C. trachomatis in vitro*.

В результате тестирования специфичности связывания и ингибирующей активности полученных наноантител были выбраны два наноантитела, aCt1 и aCt2, которые показали эффективное связывание с внеклеточными и внутриклеточными формами *C. trachomatis*, а также обладали активностью, подавляющей развитие хламидийной инфекции в условиях *in vitro*.

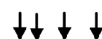
## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам научно-экспериментальной базы “Черноголовка” и ЦКП “Живая коллекция диких видов млекопитающих” ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН за помощь в содержании и проведении иммунизации верблюдов. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00081).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Haggerty C.L., Gottlieb S.L., Taylor B.D., Low N., Xu F., Ness R.B. (2010) J. Infect. Dis., **201**, 134-155.
2. Darville T., Hiltke T.J. (2010) J. Infect. Dis., **201**, 114-125.
3. Зигангирова Н.А., Петяев И.М., Пашко Ю.П. и др. (2007) Клин. микробиол. антимикр. химиотер., **7**, 351-360.
4. Meyer T. (2016) Microorganisms, **4**(3), 25.
5. de Cortina S.H. Bristow C.C., Davey D.J., Klausner J.D. (2016) Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2016: 4386127.
6. Hsieh Y.-H., Hogan M.T., Barnes M., Jett-Goheen M., Huppert J., Rompalo A.M. et al. (2010) PLoS ONE, **5**(11), e14144.

**Последовательность однодоменного антитела aCt 1**



malqvqlvesgggsvqaggsrlrlscettshyvasnscmawfrqapgkkgregvassisrraditfyadsvker  
fvisrdnsertlylqmnsllkpedtamyycaaadlsycglteegynhwgqgtqvtvss

**Последовательность однодоменного антитела aCt 2**



malqvqlvesgggsvqaggsrlrlhcassgyvearilmgwfrqapgkeregvaaiyigdgtdtdygdsvkgr  
ftvsqdgaknaiylhmydvkpedaatyycaaagimpwyrwtswgrlnvgdfdswgqgtqvtvss

**Рисунок 4.** Аминокислотные последовательности однодоменных антител aCt1 и aCt2, выведенные из нуклеотидных последовательностей кДНК, кодирующих эти два антитела.

7. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. (1993) *Nature*, **363**, 446-448.
8. Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. (1997) *FEBS Lett.*, **414**, 521-526.
9. Harmsen M.M., De Haard H.J. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 13-22.
10. Muyldermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C., De Baetselier P., De Genst E., Kinne J., Leonhardt H., Magez S., Nguyen V.K., Revets H., Rothbauer U., Stijlemans B., Tillib S., Wernery U., Wyns L., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Saerens D. (2009) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **128**, 178-183.
11. Muyldermans S. (2013) *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 775-797.
12. Steeland S., Vandenbroucke R.E., Libert C. (2016) *Drug Discovery Today*, **21**, 1077-1113.
13. Caldwell H.D., Kromhout J., Schachter J. (1981) *Infect. Immun.*, **31**(3), 1161-1176.
14. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. (2010) *Acta Naturae*, №2, 100-108.
15. Tillib S., 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. (2013) *Antivir. Res.*, **97**, 245-254.
16. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I., Vasilev L.F., Efimov G.A., Gurskiy Ya.G., Georgiev G.P., Goldman I.L., Sadchikova E.R. (2014) *J. Chromatogr. B.*, **949-950**, 48-57.
17. Тиллиб С.В., Вятчанин А.С., Муилдерманс С. (2014) *Биохимия*, **79**, 1687-1697.
18. Tillib S., Ivanova T., Vasilev L., Rutovskaya M., Saakyan S., Gribova I., Tutykhina I., Sedova E., Lysenko A., Shmarov M., Logunov D., Naroditsky B., Gintsburg A. (2013) *Antiviral Res.*, **97**, 245-254.
19. Bashmakov Y.K., Zigangirova N.A., Pashko Y.P., Kapotina L.N., Petyaev I.M. (2010) *Comp. Hepatol.*, **28**(9), 3.
20. Persson K., Boman J. (2000) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 739-744.

Поступила: 31. 08. 2017.  
Принята к печати: 19. 09. 2017.

# SINGLE-DOMAIN ADAPTED ANTIBODIES AGAINST *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, PRESERVING THE DEVELOPMENT OF CHLAMIDIC INFECTION *IN VITRO*

S.V. Tillib<sup>1</sup>, E.Y. Morgunova<sup>2</sup>, T.I. Ivanova<sup>1</sup>, E.A. Koroleva<sup>2</sup>, M.V. Rutovskaya<sup>1</sup>, N.A. Zigangirova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Gene Biology,  
Moscow, Russia; e-mail: tillib@genebiology.ru

<sup>2</sup>Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The technology for the generating of single-domain recombinant monoclonal antibodies (nanoantibodies) based on the immunization of a camel, cloning of induced sequences encoding single-domain antigen-recognizing fragments of non-canonical camel antibodies, as well as functional selection of clones of nanoantibodies by the phage display method, was used to obtain new effective tools for more efficient diagnostics of Chlamydia infection and to develop new approaches for effective therapy. Two promising nanoantibodies were obtained. They showed effective binding to extracellular and intracellular forms of *C. trachomatis*, and also had activity that inhibited the development of chlamydial infection *in vitro*.

**Key words:** recombinant single-domain antibody, Chlamydia, urogenital infections