

## ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К МОРФИН- СПЕЦИФИЧЕСКИМ ИММУНОГЛОБУЛИНАМ

Трофимов А.В.<sup>1</sup>, Атанесян В.А.<sup>1</sup>, Ищенко А.М.<sup>1</sup>, Карабанова Е.А.<sup>1</sup>,  
Рак А.Я.<sup>1,2</sup>, Симбирцев А.С.<sup>1</sup>, Гамалея Н.Б.<sup>3</sup>, Берзина А.Г.<sup>3</sup>,  
Станкова Н.В.<sup>4</sup>, Капанадзе Г.Д.<sup>4</sup>, Ульянова Л.И.<sup>3</sup>, Климова Т.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, п. Светлые горы, Красногорский район, Московская обл., Россия

**Резюме.** Получение и изучение антиидиотипических (вторичных) антител (Ab2) к моноклональным первичным антителам (Ab1), специфичным к биологически активным молекулам с известной структурой, имеет большую научную и практическую значимость. В связи с частичным антигенным подобием структур Ab2 и исходного антигена эти антитела могут стать основой вакцины в том случае, если использование антигена невозможно или ограничено законодательством. В частности, на основе Ab2 могут быть созданы препараты, предназначенные для иммунизации с целью профилактики и лечения наркологической зависимости. Ценность свойств Ab2 еще более возрастает, если для их получения используют Ab1, распознающие разные участки молекулы антигена, что позволяет получить антитела второго поколения с широким спектром специфичности. В данной работе были получены морфиноподобные поликлональные и моноклональные Ab2. В каждом случае в качестве иммуноглобулинов первого поколения для иммунизации мы использовали два мышинных моноклональных антитела (mAb), специфичных к различным производным морфина: антитела 3K11 – к 3-0-карбоксиметильному (КММ) и 2-р-карбокси-фенилазаметильному (ФАМ) производным, а также антитела 6G1 – к 6-гемисукцинилному производному (ГСМ). После проведения иммунизации лошади данными Ab1 и развития иммунного ответа из сыворотки крови животного были выделены три пула специфических поликлональных антител – антивидовые антитела лошади к тотальным иммуноглобулинам мыши (НАМ), антиидиотипические антитела лошади к антителам 3K11 (НАМ-K11) и к антителам 6G1 (НАМ-G1). Параллельно в результате иммунизации мышей антителами 3K11 и 6G1 и проведения слияния лимфоцитов животных с клетками миеломы мыши линии Sp2/0 по методу Мильштейна–Кёлера были получены три продуцента антиидиотипических антител: клон, продуци-

### Адрес для переписки:

Трофимов Александр Викторович  
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
ФМБА России  
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.  
Тел.: 8 (904) 632-07-27.  
E-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

### Address for correspondence:

Trofimov Alexander V.  
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,  
Federal Medical-Biological Agency  
197110, Russian Federation, St. Petersburg,  
Pudozhskaya str., 7.  
Phone: 7 (904) 632-07-27.  
E-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

### Образец цитирования:

А.В. Трофимов, В.А. Атанесян, А.М. Ищенко,  
Е.А. Карабанова, А.Я. Рак, А.С. Симбирцев,  
Н.Б. Гамалея, А.Г. Берзина, Н.В. Станкова,  
Г.Д. Капанадзе, Л.И. Ульянова, Т.А. Климова  
«Получение поликлональных и моноклональных  
антиидиотипических антител к морфин-  
специфическим иммуноглобулинам» // Медицинская  
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 187-196.  
doi: 10.15789/1563-0625-POP-1658

© Трофимов А.В. и соавт., 2020

### For citation:

A.V. Trofimov, V.A. Atanesyan, A.M. Ischenko,  
E.A. Karabanova, A.Ya. Rak, A.S. Simbirtsev,  
N.B. Gamaleya, A.G. Berzina, N.V. Stankova,  
G.D. Kapanadze, L.I. Ulyanova, T.A. Klimova “Preparation  
of polyclonal and monoclonal anti-idiotypic antibodies against  
morphine-specific immunoglobulins”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1,  
pp. 187-196.  
doi: 10.15789/1563-0625-POP-1658

DOI: 10.15789/1563-0625-POP-1658

рующей мышиные моноклональные Ab2, специфичные к мАт-6G1 (АИ-G1), а также клоны, продуцирующие анти-мАт-3K11 антитела (АИ-K11А и АИ-K11В). В исследовании охарактеризованы физико-химические и антигенные свойства всех полученных Ab2. Показано, что антиидиотипические иммуноглобулины лошади не только относятся к различным классам, но и являются поливалентными по специфичности, в то время как все полученные моноклональные Ab2 представлены иммуноглобулинами класса IgM и строго специфичны к соответствующим антителам первого поколения. В дальнейшем на клеточной модели будут исследованы морфиноподобные свойства полученных в работе первых отечественных поликлональных и моноклональных Ab2, а также изучена возможность индукции ими появления антител третьего поколения, как и Ab1, специфичных к морфину.

*Ключевые слова: антиидиотипические антитела, антитела, иммуноферментный анализ, конкурентный анализ, моноклональные антитела, поликлональные антитела, производные морфина*

## PREPARATION OF POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST MORPHINE-SPECIFIC IMMUNOGLOBULINS

Trofimov A.V.<sup>a</sup>, Atanesyan V.A.<sup>a</sup>, Ischenko A.M.<sup>a</sup>, Karabanova E.A.<sup>a</sup>, Rak A.Ya.<sup>a,b</sup>, Simbirtsev A.S.<sup>a</sup>, Gamaleya N.B.<sup>c</sup>, Berzina A.G.<sup>c</sup>, Stankova N.V.<sup>d</sup>, Kapanadze G.D.<sup>d</sup>, Ulyanova L.I.<sup>c</sup>, Klimova T.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, Svetlye gory, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** The preparation and study of anti-idiotypic (secondary) antibodies (Ab2) against monoclonal primary antibodies (Ab1) specific to biologically active molecules with a known structure is of great scientific and practical importance. Due to partial antigenic similarity of Ab2 and the initial antigen structures, these antibodies can be the basis of the vaccine, if the antigen usage is not possible, or is limited by law. In particular, one may create Ab2-based preparations, designed for immunization, in order to prevent and treat the drug addiction. The value of Ab2 properties increases even more if Ab1, used to obtain them, recognize different parts of the antigen molecule, which makes it possible to obtain second-generation antibodies with a wide range of specificity. In this work, the morphine-like polyclonal and monoclonal Ab2 were obtained. In each case, as the first-generation immunoglobulins for immunization, we used two murine monoclonal antibodies (mAbs) specific to different morphine derivatives: 3K11 antibodies to 3-0-carboxymethyl (CMM) and 2-p-carboxyphenylazomethyl (FAM) derivatives, as well as 6G1 antibodies to 6-hemisuccinyl derivative (GSM). After immunization of the horse with Ab1 and development of immune response, three pools of specific polyclonal antibodies were isolated from the animal blood serum: horse anti-species antibodies to the total mouse immunoglobulins (HAM); horse anti-idiotypic antibodies against 3K11 antibodies (HAM-K11), and against 6G1 antibodies (HAM-G1). In parallel, immunization of mice with 3K11 and 6G1 antibodies and fusion of obtained lymphocytes with Sp2/0 mouse myeloma cells by the Milstein-Köhler method resulted in three producers of anti-idiotypic antibodies: a clone producing mouse monoclonal Ab2 specific for mAb-6G1 (AI-G1), as well as clones producing anti-mAb-3K11 antibodies (AI-K11A and AI-K11B). The physico-chemical and antigenic properties of all the Ab2 obtained were characterized. It was shown that the horse anti-idiotypic immunoglobulins not only belong to different classes, but are also polyvalent, while all monoclonal Ab2 obtained are represented by IgM immunoglobulins, being also strictly specific to the corresponding first-generation antibodies. Subsequently, the morphine-like properties of the first domestic polyclonal and monoclonal Ab2 obtained in the work will be investigated in a cellular model. Likewise, we shall study their ability to induce Ab3 as well as morphine-specific Ab1.

*Keywords: anti-idiotypic antibodies, antibodies, competitive analysis, ELISA, monoclonal antibodies, morphine derivatives, polyclonal antibodies*

## Введение

Антиидиотипические (вторичные) антитела (Ab2) являются иммуноглобулинами, вырабатываемыми на идиотип, то есть на антигенные детерминанты активных центров первичного антитела (Ab1) к определенному антигену (Ag) [5]. По своим свойствам они подразделяются на три типа: Ab2 $\alpha$ , Ab2 $\beta$  и Ab2 $\gamma$ . Ab2 $\alpha$  взаимодействуют с Ab1, но не блокируют взаимодействие Ab1 с Ag. Антитела Ab2 $\beta$  несут на себе образ антигена, распознают паратоп или отдельный участок центра связывания Ab1 и при иммунизации вызывают образование антител следующего поколения (Ab3), которые, подобно Ab1, способны распознавать Ag. Наконец, антитела Ab2 $\gamma$  способны к взаимодействию с активным центром Ab1 и блокируют связывание Ab1 с Ag, но при иммунизации не вызывают образования антител, специфичных к антигену (Ab3). Наибольшую научную и практическую значимость имеют антитела Ab2 $\beta$ , обладающие уникальными иммунологическими свойствами, в частности способностью индуцировать выработку антител к наркотикам (кокаину и производным морфина) [3, 6, 10].

В то время как поликлональные Ab2-антитела представлены сразу тремя подтипами антиидиотипических антител, моноклональные антитела, являясь по своей природе моноспецифическими, относятся только к одному подтипу. Поэтому сравнительная характеристика влияния различных типов Ab2 на иммунный ответ организма позволяет определить их возможную роль для лечения и профилактики наркотической зависимости.

**Целью данного исследования** было получение и изучение свойств антиидиотипических поликлональных и моноклональных антител к полученным ранее моноклональным антителам: 3K11,

распознающему 3-0-карбоксиметильное (КММ) и 2-р-карбокси-фенилазометильное (ФАМ) производные морфина, и 6G1, распознающему 6-гемисукцинилное производное (ГСМ) [1].

## Материалы и методы

### Лабораторные животные и материалы

Работа выполнена с использованием мышей линии Balb/c (ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово») и лошади (кобыла породы рысистая, 9 лет, вес 500 кг), которая была предоставлена ФГБНУ ФИЦВиМ (пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская обл.).

Мышиные моноклональные антитела 3K11 и 6G1 были получены по схеме, описанной ранее в работе [1]. Конъюгаты моноклональных и поликлональных антител с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Германия) получали по методике [8].

В работе использовались производные морфина: 6-гемисукцинилное (ГСМ), 2-р-карбокси-фенилазометильное (ФАМ) и 3-0-карбоксиметильный эфир (КММ), конъюгированные с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и лизоцимом с помощью бифункционального реагента – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид. Данные конъюгаты были получены ранее по методикам, описанным в статьях [2, 3].

### Получение поликлональных антиидиотипических антител лошади (НАМ-K11 и НАМ-G1)

Поликлональные антиидиотипические антитела Ab2 (НАМ-K11 и НАМ-G1) были выделены из гипериммунной сыворотки крови лошади. Схема иммунизации лошади моноклональными мышинными антителами mAt-3K11 и mAt-6G1, специфичными к антигенам – производным морфина – КММ-БСА и ГСМ-БСА соответственно, представлена в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ИММУНИЗАЦИИ ЛОШАДИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ Ab2

TABLE 1. SCHEDULE OF HORSE IMMUNIZATION TO OBTAIN ANTI-IDIOTYPIC Ab2 ANTIBODIES

Вводимый антиген Administered antigen	Способ введения антигена Antigen administration method	
	1-я инъекция – 0 день 1 <sup>st</sup> injection – day 0	2-я инъекция – 14-й день 2 <sup>nd</sup> injection – day 14
МАТ 3K11 МАТ 6G1 mAbs 3K11 mAbs 6G1	10 мг антигена в 2 точки в области крупа с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), в соотношении 1:1 по объему внутримышечно 10 mg of antigen at 2 points in the croup region with Freund's complete adjuvant (FCA), in a ratio of 1:1 by volume intramuscularly	10 мг антигена в 2 точки верхней части шеи с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), 1:1 подкожно 10 mg of antigen in 2 points of the neck upper part with incomplete Freund's adjuvant (IFA), 1:1 subcutaneously
	3-я инъекция – 75-й день 3 <sup>rd</sup> injection – day 75	4-я инъекция – 100-й день 4 <sup>th</sup> injection – day 100
	2 мг антигена в 2 точки в области крупа с НАФ (1:1) внутримышечно 2 mg of antigen at 2 points in the croup region with FCA (1:1) intramuscularly	2 мг антигена в 2 мл физиологического раствора внутривенно 2 mg of antigen in 2 ml of saline intravenously

Ab2-антитела выделяли с помощью аффинной хроматографии на иммуносорбенте, приготовленном на основе циан-бром-активированной сефарозы 4В (Sigma-Aldrich) по модифицированной методике [4]. В качестве лиганда использовали тотальные иммуноглобулины (Ig) мыши класса G, моноклональные антитела 3K11 или 6G1.

На первом этапе выделения Ab2-антител сыровотку лошади истощали от антивидовых антител. Для этого лошадиную сыровотку пропускали через сорбент с иммобилизованными IgG мыши, уравновешенный 20 мМ фосфатно-солевым буфером, pH 7,4 (ФСБ). После нанесения образца колонку промывали пятью объемами уравновешивающего буфера. Далее для удаления неспецифически связавшихся белков через колонку пропускали один объем ФСБ, содержащего 1 М NaCl, после чего вновь уравновешивали колонку ФСБ и проводили элюцию раствором 0,1 М глицина, pH 2,5, при скорости потока 1 мл/мин. В ходе хроматографии пики детектировали при длине волны 280 нм. Полученный элюат нейтрализовали до pH 7,2-7,4. Концентрацию белка в элюате измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с учетом коэффициента молярной экстинкции 1,4.

По результатам ИФА, когда остаточный титр антивидовых антител НАМ составлял не более 0,1% от исходного, истощенную сыровотку наносили последовательно на сорбенты с иммобилизованными мАт 3K11 и мАт 6G1. Выделение антиидиотипических антител НАМ-K11 и НАМ-G1 методом аффинной хроматографии проводили по той же схеме, что и при выделении антивидовых антител НАМ.

#### **Получение моноклональных антиидиотипических антител**

Мышей линии Balb/c иммунизировали конъюгатами гемоцианина лимфы улитки, конъюгированными с моноклональными антителами 3K11 и 6G1, приготовленными по ранее описанной методике [8]. Для этого эмульгированный в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) антиген в дозе 10 мкг на мышью вводили в подошвенный апоневроз задних конечностей. На 30-й день после иммунизации животным вводили внутривенно 5 мкг мАт 3K11 или 6G1 в физиологическом растворе. На 4-й день после инъекции животных умерщвляли цервикальной дислокацией и выделяли спленоциты и лимфоциты паховых и брюшных лимфоузлов. Полученные клетки смешивали с клетками миеломы мыши линии SP 2/0 в соотношении 2:1. Гибридизацию клеток проводили 50% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1500 дальтон в течение 1,5 мин с последующим 4-кратным добавлением через 1 мин среды RPMI-1640 в объеме, равном объему раствора ПЭГ. После слияния клетки дважды отмывали культуральной средой и высевали

в 96-луночные культуральные планшеты с суточными перитонеальными макрофагами ( $5 \times 10^3$  клеток на лунку) из расчета  $5 \times 10^4$  клеток на лунку по миеломе. Селекцию гибридов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США), содержащей:  $10^{-4}$  М гипоксантина,  $4 \times 10^{-7}$  М аминоптерина и  $1,6 \times 10^{-5}$  М тимидина [9]. Полученные антиидиотипические моноклональные антитела были обозначены как АИ-K11А, АИ-K11Б и АИ-G1.

#### **Иммуноферментный анализ (ИФА)**

Первичный отбор позитивных клонов проводили по связыванию секретируемых антител с мАт 3K11 или 6G1. Для этого в лунки полистирольных планшетов Corning (Sigma, США) в посадочном буфере (20 мМ боратный буфер, pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl) адсорбировали мАт K-11 или 6G1 с концентрацией 1,5 мкг/мл в течение 20 часов во влажной камере при комнатной температуре. По окончании сорбции планшеты отмывали промывочным буфером (посадочный буфер, содержащий 0,05% Tween-20). В лунки вносили 100 мкл промывочного буфера, содержащего 10% мышиную сыровотку, и 50 мкл культуральной среды. Планшеты инкубировали 1 час при перемешивании при 37 °С. Затем в промытый планшет вносили раствор конъюгатов 3K11-пероксидаза или 6G1-пероксидаза в концентрации 100 нг/мл. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при перемешивании при 37 °С, после чего тщательно отмывали и проводили окрашивание с помощью раствора субстрата тетраметилбензидина (ХЕМА, Россия).

Культуральная среда клонов, показавшая специфическое связывание, повторно проверялась в конкурентном анализе по отмене связывания конъюгатов 3K11-пероксидаза или 6G1-пероксидаза с антигенами КММ-БСА или ГСМ-БСА, соответственно, в присутствии культуральной среды позитивных клонов. Для этого в лунки планшетов для ИФА сорбировали антигены в концентрации 5 мкг/мл. После отмывки в ячейки вносили по 50 мкл культуральной среды позитивных клонов и 50 мкл растворов конъюгатов 3K11-пероксидаза или 6G1-пероксидаза в концентрации 100 нг/мл. По отмене связывания конъюгатов с антигеном судили об антиидиотипической специфичности отобранных клонов.

Аналогичные схемы ИФА применялись для определения специфичности выделенных поликлональных и моноклональных Ab2-антител. Определение изотипа мАт проводили с помощью набора kit ISO-2 (Sigma-Aldrich) по методике производителя.

Позитивные клоны реклонировали для отбора стабильных продуцентов и криоконсервировали.

Моноклональные антитела отобранных позитивных клонов нарабатывали в перитонеальной полости сингенных мышей (BALB/C). Для это-

го внутривенно вводили  $2-3 \times 10^6$  клеток на мыш. На 14-20-й день мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и отбирали асцитную жидкость, из которой выделяли мАт с помощью аффинной хроматографии на сорбентах 3К11-сефароза или 6G1-сефароза.

#### Электрофорез

Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле осуществляли по ранее описанной методике [11]. В работе использовался разделяющий гель с градиентной концентрацией акриламида 4-20% и концентрирующий гель с концентрацией акриламида 5%. Результаты электрофореза визуализировали с помощью стандартного окрашивания раствором Кумасси G-250.

#### Иммуноблоттинг

В ряде случаев анализ результатов электрофоретического разделения проводили с помощью вестерн-блоттинга по стандартному протоколу [7]. Для переноса белков использовали буферный раствор, содержащий 47,9 мМ Трис-НСl, 38,6 мМ глицина и 20% метанола, и нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм. Перенос проводили в течение 1 часа при силе тока 350 мА, после чего мембрану инкубировали в блокирующем растворе (2% БСА в ФБ) в течение ночи при +4 °С. Затем вносили раствор первичных антител, поликлональных или моноклональных в концентрации 5 мкг/мл в блокирующем растворе. После часовой инкубации и двукратной отмывки мембрану также в течение часа обрабатывали раствором антивидового пероксидазного конъюгата антител козы против иммуноглобулинов мыши или лошади (Sigma, США) с концентрацией 0,5 мкг/мл. Для проявления окрашивания использовали 0,05% раствор диаминобензидина (Sigma, США) в ФБ, содержащий 1% диметилсульфоксида (Sigma, США) и 1% перекиси водорода (НеваРеактив, Россия).

## Результаты

На рисунке 1 представлена схема фракционирования лошадиной сыворотки.

На первом этапе выделения Ab2-антител проводили истощение сыворотки от антивидовых антител лошади к иммуноглобулинам мыши. Для этого сыворотку трижды пропускали через сорбент IgG-мыши-сефароза, содержание специфических антител контролировали на каждом этапе ИФА. После того, когда содержание элюированных антивидовых антител составило менее 0,1% от суммарного, образец истощенной сыворотки последовательно пропускали через сорбенты 3К11-сефароза и 6G1-сефароза.

В таблице 2 представлены концентрации поликлональных антивидовых НАМ и антиидиотипических антител НАМ-K11 и НАМ-G1, вы-

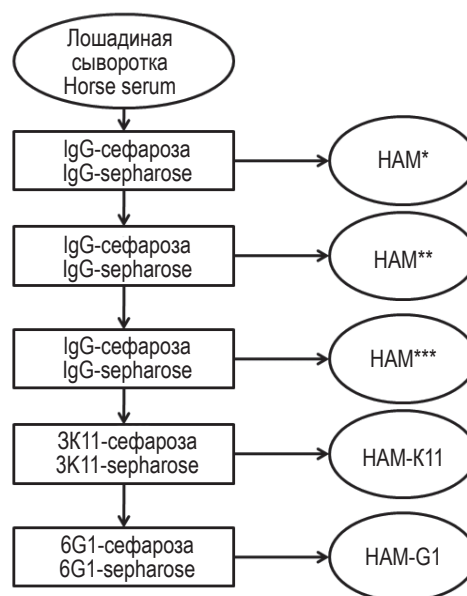


Рисунок 1. Схема выделения антивидовых и антиидиотипических поликлональных антител из сыворотки лошади

Примечание. Антивидовые антитела НАМ\*, НАМ\*\*, НАМ\*\*\* – первая, вторая и третья стадии выделения; антиидиотипические антитела НАМ-K11 и НАМ-G1.

Figure 1. Scheme for the isolation of anti-species and anti-idiotypic polyclonal antibodies from horse serum

Note. Anti-species antibodies НАМ\*, НАМ\*\*, НАМ\*\*\*, the first, second and third stages of isolation; anti-idiotypic antibodies НАМ-K11 and НАМ-G1.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИВИДОВЫХ АНТИТЕЛ НАМ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НАМ-K11 И НАМ-G1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЛОШАДИ

TABLE 2. CONTENT OF POLYCLONAL ANTI-SPECIES HAM ANTIBODIES AND ANTI-IDIOTYPIC HAM-K11 AND HAM-G1 ANTIBODIES IN A HORSE SERUM

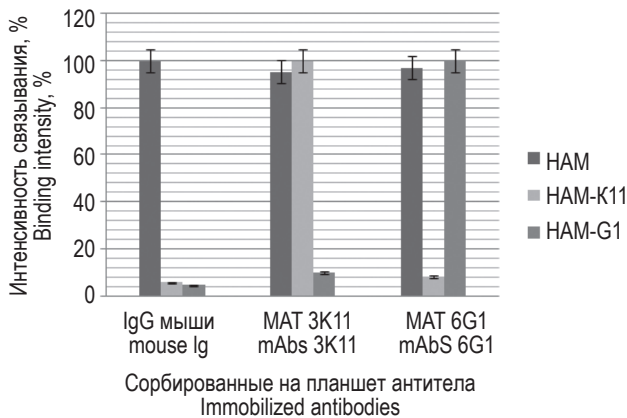
Антитела Antibodies	мг mg	%
НАМ*	192	77,73
НАМ**	37	14,98
НАМ***	0,4	0,16
НАМ-K11	6,78	2,74
НАМ-G1	10,8	4,37

Примечание. НАМ\* – первая стадия истощения, НАМ\*\* – вторая стадия истощения, НАМ\*\*\* – третья стадия истощения.

Note. НАМ\*, the first stage of absorption; НАМ\*\*, the second stage of absorption; НАМ\*\*\*, the third stage of absorption.

деленных из 100 мл сыворотки лошади на всех этапах истощения, и их процентный состав.

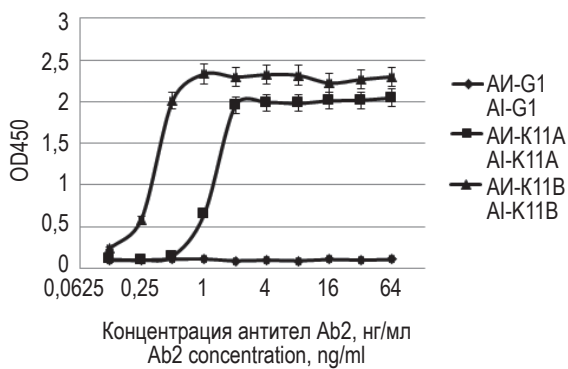
Для определения специфичности выделенных антител в планшеты с сорбированными IgG мыши, мАт 3К11 или мАт 6G1 вносили се-



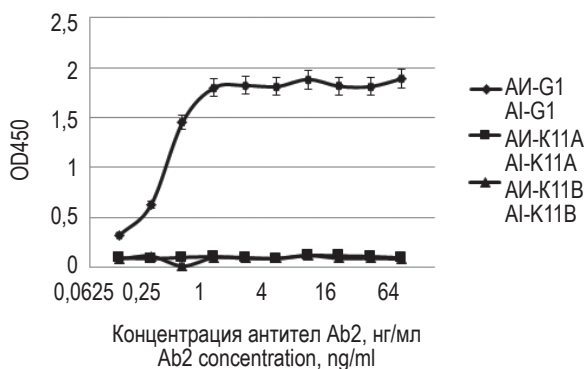
**Рисунок 2. Сравнительная характеристика специфичности поликлональных антител HAM, HAM-K11 и HAM-G1**

Figure 2. Comparative characteristics of the polyclonal antibodies HAM, HAM-K11 and HAM-G1 specificity

**А (А)**



**Б (Б)**

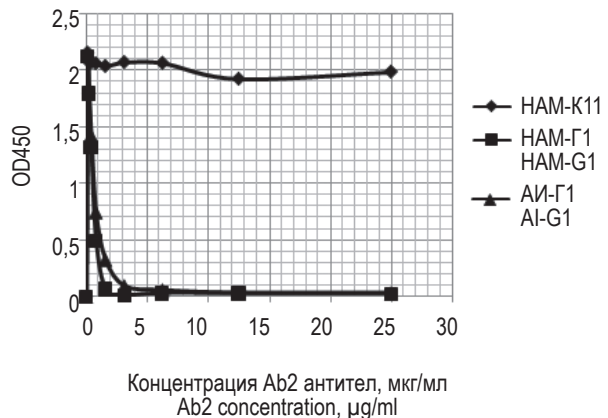


**Рисунок 3. Определение специфичности моноклональных Ab2-антител AI-G1, AI-K11A и AI-K11B**

Примечание. А – анализ в планшете с сорбированными мАТ 3К11 и конъюгатом 3К11-пероксидаза. Б – анализ в планшете с сорбированными мАТ 6Г1 и конъюгатом 6Г1-пероксидаза.

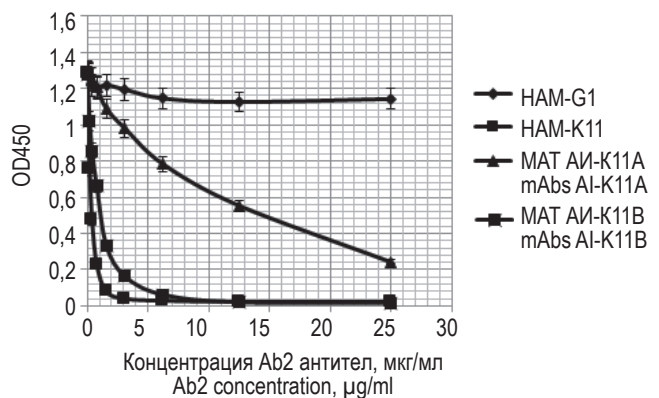
Figure 3. Determination of the specificity of monoclonal Ab2 antibodies AI-G1, AI-K11A and AI-K11B

Note. A, analysis in a plate with immobilized mAb-3K11 and conjugate 3K11-peroxidase. B, analysis in a plate with immobilized mAbs-6G1 and conjugate 6G1-peroxidase.



**Рисунок 4. Конкурентный анализ Ab2-антител на сорбированном производном морфина GSM-BSA**

Figure 4. Competitive analysis of Ab2 antibodies using the immobilized GSM-BSA morphine derivative



**Рисунок 5. Конкурентный анализ Ab2-антител на сорбированном производном морфина KMM-BSA**

Figure 5. Competitive analysis of Ab2 antibodies using the immobilized KMM-BSA morphine derivative

при двукратных разбавлений HAM, HAM-K11 и HAM-G1. На последней стадии анализа планшеты инкубировали с антивидовым пероксидазным конъюгатом. По результатам ИФА для всех антител была построена калибровочная кривая зависимости оптической плотности при длине волны 450 нм от их концентрации. С их помощью были определены концентрации, при которых наблюдалось 50% связывание антител при условии, что препарат с минимальной концентрацией иммуноглобулина обладает 100% специфичностью. По соотношению минимальной концентрации иммуноглобулина и концентрации антител в исследуемых препаратах в точке, соответствующей 50% интенсивности связывания, рассчитывали процент специфичности. На рисунке 2 представлены полученные результаты.

Определение изотипа мышиных моноклональных Ab2-антител отобранных клонов показало, что все они являются иммуноглобулинами класса IgM.

Определение специфичности антиидиотипических моноклональных антител проводили в планшетах с сорбированными мАт 3К11 или 6G1. В ячейки вносили приготовленные концентрационные разбавления Ab2-антител: АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В. После инкубации в лунки вносили раствор конъюгата пероксидазы с антителами, аналогичными тем, что сорбированы в планшете. На рисунке 3 представлены данные по определению специфичности полученных антител.

Для определения антиидиотипической специфичности полученных поликлональных и моноклональных Ab2-антител был проведен конкурентный ИФА. В планшете сорбировали производные морфина ГСМ-БСА или КММ-БСА в концентрации 5 мкг/мл. На следующей стадии вносили пробы с разными концентрациями исследуемых антител в промывочном буфере, содержащем 10% мышиной сыворотки и 100 нг/мл конъюгата 6G1-пероксидаза или 3К11-пероксидаза соответственно. На рисунках 4 и 5 представлены результаты анализа в планшетах с сорбированными конъюгатами ГСМ-БСА и КММ-БСА соответственно.

В таблице 3 приведены молярные соотношения взаимодействия поликлональных и моноклональных Ab2-антител с конъюгатами 3К11-пероксидаза и 6G1-пероксидаза, при которых наблюдается 50% подавление связывания конъюгатов с антигенами КММ-БСА и ГСМ-БСА соответственно.

На рисунке 6 представлены электрофореграммы аффинно выделенных поликлональных антимышиных НАМ и Ab2 НАМ-K11 и НАМ-G1 антител.

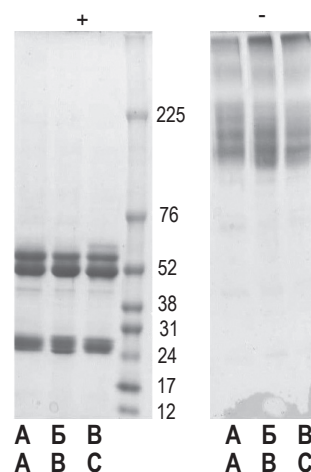
**ТАБЛИЦА 3. МОЛЯРНОЕ СООТНОШЕНИЕ Ab2-АНТИТЕЛ ПРИ 50% ПОДАВЛЕНИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОНЪЮГАТОВ K11-Пх И G1-Пх С ПРОИЗВОДНЫМИ МОРФИНА**

TABLE 3. MOLAR RATIO OF Ab2 ANTIBODIES FOR 50% INHIBITION OF THE BINDING OF K11-Px AND G1-Px CONJUGATES TO MORPHINE DERIVATIVES

Конкуратор Competitor	3К11-Пх 3K11-Px	6G1-Пх 6G1-Px
НАМ	–	–
НАМ-K11	1,35	–
НАМ-G1	–	1,25
<b>АИ-G1А</b> AI-G1A	–	1,46
<b>АИ-K11А</b> AI-K11A	50,01	–
<b>АИ-K11В</b> AI-K11B	4,09	–

**Примечание. Подавления не наблюдается.**

Note. Inhibition is not observed.

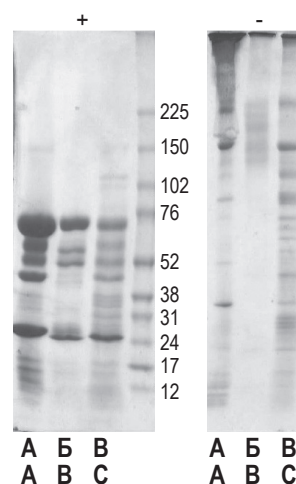


**Рисунок 6. Электрофореграммы поликлональных антител НАМ, НАМ-K11 и НАМ-G1 (нагрузка белка 5 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)**

**Примечание.** Поликлональные антитела лошади: А – антимышиные антитела НАМ; Б – антиидиотипические антитела НАМ-K11; В – антиидиотипические антитела НАМ-G1; «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия.

Figure 6. Electrophoregrams of polyclonal antibodies HAM, HAM-K11 and HAM-G1 (protein loading 5 µg per track of denaturing gradient gel)

Note. Horse polyclonal antibodies: A, HAM anti-mouse antibodies; B, anti-idiotypic antibodies HAM-K11; C, anti-idiotypic antibodies HAM-G1; “+”, reducing and “-”, non-reducing conditions.

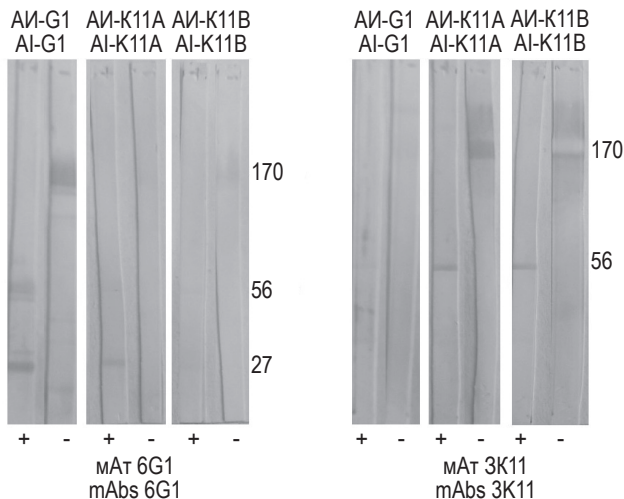


**Рисунок 7. Электрофореграммы моноклональных антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В (нагрузка белка 5 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)**

**Примечание.** Моноклональные антиидиотипические антитела мыши: А – АИ-G1; Б – АИ-K11А; В – АИ-K11В; «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия

Figure 7. Electrophoregrams of monoclonal antibodies AI-G1, AI-K11A and AI-K11B (protein loading 5 µg per track of denaturing gradient gel)

Note. Mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies: A, AI-G1; B, AI-K11A; C, AI-K11B; “+” reducing and “-”, non-reducing conditions.

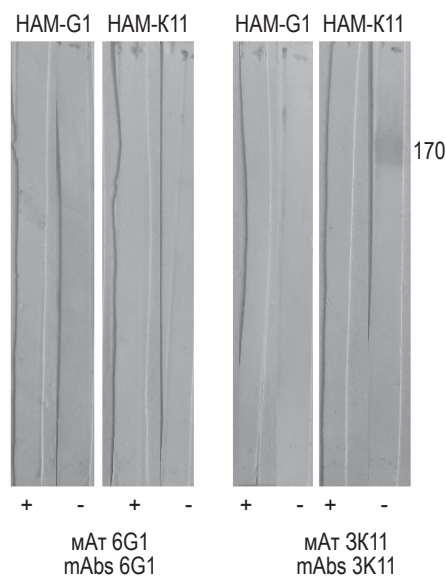


**Рисунок 8. Результат вестерн-блот анализа связывания мышинных моноклональных антиидиотипических антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В с мАт 6G1 и 3K11 (нагрузка белка 1 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)**

Примечание. «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия.

Figure 8. Result of a Western blot analysis of mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies AI-G1, AI-K11A and AI-K11B binding with mAbs 6G1 and 3K11 (protein loading 1  $\mu$ g per track of denaturing gradient gel)

Note. “+” reducing and “-”, non-reducing conditions.



**Рисунок 9. Результат вестерн-блот анализа связывания поликлональных антиидиотипических антител лошади НАМ-K11 и НАМ-G1 с мАт 6G1 и 3K11 (нагрузка белка 1 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)**

Примечание. «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия.

Figure 9. Result of a Western blot analysis of horse polyclonal anti-idiotypic antibodies HAM-K11 and HAM-G1 binding with mAbs 6G1 and 3K11 (protein loading 1  $\mu$ g per track of denaturing gradient gel)

Note. “+” reducing and “-”, non-reducing conditions.

На рисунке 7 представлены электрофореграммы моноклональных Ab2-антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В.

На рисунке 8 представлен результат вестерн-блот анализа связывания моноклональных Ab2-антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В с мАт 6G1 и 3K11.

На рисунке 9 представлен результат анализа связывания поликлональных Ab2-антител лошади НАМ-K11 и НАМ-G1 с мАт 6G1 и 3K11 методом вестерн-блоттинга.

## Обсуждение

Как видно из результатов, представленных на рисунке 2, использование предложенной схемы аффинного фракционирования сыворотки лошади, иммунизированной иммуноглобулинами 3K11 и 6G1, впервые позволило выделить три пула специфических антител: антивидовые Ab1-антитела НАМ, которые, разумеется, одинаково связываются со всеми сорбированными IgG мыши в твердофазном ИФА; Ab2-антитела НАМ-K11 и НАМ-G1, специфичные только к мАт-3K11 и мАт-6G1 соответственно. Тот факт, что полученные Ab2-антитела являются поликлональными, заставляет предположить их гетерогенность по антиидиотипическим свойствам, то есть присутствие в каждом пуле Ab2 $\alpha$ , Ab2 $\beta$  и Ab2 $\gamma$  типов Ab2-антител. Кроме того, иммунизация мышей мышинными иммуноглобулинами к производным морфина впервые позволила получить к ним мышинные антиидиотипические антитела. Анализ данных, приведенных на рисунке 3, показал, что АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В специфичны только к своим мАт, при этом специфичность антител АИ-K11В выше, чем АИ-K11А.

Как видно из результатов, представленных на рисунках 4, 5 и в таблице 3, антитела НАМ-G1 и АИ-G1А подавляют связывание конъюгата 6G1-Пх с ГСМ-БСА. При этом 50% точка подавления связывания близка к их эквимольному соотношению, что указывает на высокую специфичность процесса конкуренции идиотип – антиидиотип. В то же время эти антитела не подавляют связывание конъюгата 3K11-Пх с КММ-БСА. Антитела НАМ-K11, а также АИ-K11А и АИ-K11В имеют другую антиидиотипическую специфичность, подавляя связывание конъюгата 3K11-Пх с КММ-БСА и не подавляя связывание конъюгата 6G1-Пх с ГСМ-БСА. НАМ-K11 имеет более высокую специфичность, чем АИ-K11В. 50% точка подавления связывания 3K11-Пх с КММ-БСА для АИ-K11А наблюдается только при 50-кратном избытке.

На рисунке 6 представлены электрофореграммы трех фракций поликлональных антител лошади. Электрофоретический профиль аффинно выделенных антител, имеющий разную



специфичность, практически полностью совпадает. Наличие двух полос тяжелой цепи в восстановленных условиях и присутствии иммуноглобулинов с молекулярной массой более 225 кДа указывает на то, что, несмотря на длительную иммунизацию животных, в сыворотке лошади циркулируют не только IgG-иммуноглобулины, но и IgM.

По результатам изотипирования все полученные мАТ относятся к классу IgM, что согласуется с данными электрофореза АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В (рис. 7). Обсчет показал, что молекулярная масса основной части препарата в невосстанавливающих условиях составляет около 800 кДа, то есть представлена пентамером иммуноглобулина класса IgM.

По результатам проведенного вестерн-блот анализа, представленным на рисунке 8, видно, что мАТ АИ-G1 распознают не только молекулу антитела 6G1 с молекулярной массой 160 кДа, но и его тяжелую и легкую цепи, которые участвуют в формировании идиотипа, ответственного за связывание с АИ-G1, и не распознают мАТ 3K11. АИ-K11А и АИ-K11В связывают цельную молекулу антитела 3K11 и его тяжелую цепь. По результатам анализа методом вестерн-блот-

тинга (рис. 9) поликлональные Ab2-антитела НАМ-K11 способны к распознаванию нефрагментированной молекулы мАТ 3K11. Вполне возможно, что лошадиные Ab2-антитела по причине своей поликлональности распознают конформационные детерминанты антиопиатных антител, которые в случае SDS-фореза в восстанавливающих условиях теряют свои антигенные свойства.

Таким образом, в результате проведенной работы были впервые получены и охарактеризованы поликлональные и моноклональные антиидиотипические Ab2-антитела к морфин-специфическим иммуноглобулинам. В ходе дальнейшей работы будет исследовано влияние полученных Ab2-антител на синтез ДНК в клетках глиобластомы человека линии T98G *in vitro* и проведено сравнение их биологического эффекта с действием морфина и налоксона. Также планируется проверить, обладают ли Ab2 свойствами вакцины, то есть способностью индуцировать появление антител, способных связывать производные морфина, при иммунизации ими животных. Будет также изучена возможность применения Ab2-антител в разработке тест-систем по определению антител, специфичных к опиатам.

## Список литературы / References

1. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопросы наркологии, 2016. № 11-12. С. 39-54. [Berzina A.G., Gamaley N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Krotov G.I., Ulyanova L.I. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against two morphine derivatives. *Voprosy narkologii = Journal of Addiction Problems*, 2016, no. 11-12, pp. 39-54. (In Russ.)]
2. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Шестаков К.А., Ульянова М.А., Капанадзе К.Д., Станкова Н.В., Ревякин А.О., Фокин Ю.В., Кротов Г.И., Родченков Г.М. Методологические подходы к разработке вакцины для лечения зависимости от опиатов // Наркология, 2015. № 11. С. 25-31. [Berzina A.G., Gamaley N.B., Ulyanova L.I., Shestakov K.A., Ulyanova M.A., Kapanadze G.D., Stankova N.V., Revyakin A.O., Fokin Yu.V., Krotov G.I., Rodchenkov G.M. Methodological approaches to development of a vaccine for the treatment of opiate dependence. *Narkologiya = Narcology*, 2015, no. 11, pp. 25-31. (In Russ.)]
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Ульянова Л.И. Методологические основы создания вакцины для иммунотерапии зависимости от опиатов // Вопросы наркологии, 2017. № 4-5. С. 32-56. [Gamaley N.B., Berzina A.G., Ulyanova L.I. Methodological bases for creating a vaccine for immunotherapy of opioid use disorder. *Voprosy narkologii = Journal of Addiction Problems*, 2017, no. 4-5, pp. 32-56. (In Russ.)]
4. Кулаев Д.В., Насибов С.М., Маркин С.С., Бобков Ю.Г., Семенов М.П. Хроматографический способ выделения альфа-фетопротейна. Патент на изобретение RU № 2094078, 1997. [Kulaev D.V., Nasibov S.M., Markin S.S., Bobkov Yu.G., Semenov M.P. Chromatographic method of alfa-fetoprotein isolation. Patent RU 2094078, 1997].
5. Jerne N.K., Cocteau J. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.*, 1984. Vol. 79, no. 1, pp. 5-24.
6. Ho M., Segre M. Inhibition of cocaine binding to the human dopamine transporter by a single chain anti-idiotypic antibody: its cloning, expression, and function properties. *BBA*, 2003, Vol. 1638, no. 3, pp. 257-266.
7. Mahmood T., Yang P.C. Western blot: technique, theory, and troubleshooting. *N. Am. J. Med. Sci.*, 2012, Vol. 4, no. 9, pp. 429-434.
8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press, 2008. 1323 p.
9. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 88-94.
10. Schabacker D.S., Kirschbaum K.S., Serge M. Exploring the feasibility of an anti-idiotypic cocaine vaccine: analysis of the specificity of anticocaine antibodies (Ab1) capable of inducing Ab2 $\beta$  anti-idiotypic antibodies. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 48-56.
11. Walker J.M. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1. Proteins. Ed. Clifton N.J. Humana Press, Inc., 1984, pp. 57-61.

**Авторы:**

**Трофимов А.В.** — руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Атанесян В.А.** — старший научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Ищенко А.М.** — к.б.н., заведующий лабораторией биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Карabanова Е.А.** — инженер лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Рак А.Я.** — младший научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Симбирцев А.С.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Гамалея Н.Б.** — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Берзина А.Г.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Станкова Н.В.** — к.б.н., заведующая лабораторией спортивной медицины и экстремальных состояний ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Капанадзе Г.Д.** — д.б.н., начальник научно-организационного отдела ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, п. Светлые горы, Красногорский район, Московская обл., Россия

**Ульянова Л.И.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Климова Т.А.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Trofimov A.V.**, Head of a Research Group, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Atanesyan V.A.**, Senior Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Ischenko A.M.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Karabanova E.A.**, Engineer, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Rak A.Ya.**, Junior Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency; Postgraduate Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Simbirtsev A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Gamaleya N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

**Berzina A.G.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

**Stankova N.V.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Sports Medicine and Extreme Conditions, National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Kapanadze G.D.**, PhD, MD (Biology), Head, Scientific Organization Department, National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, Svetlye gory, Moscow Region, Russian Federation

**Ulyanova L.I.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

**Klimova T.A.**, PhD (Biology), Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.03.2019  
Отправлена на доработку 30.10.2019  
Принята к печати 01.11.2019

Received 12.03.2019  
Revision received 30.10.2019  
Accepted 01.11.2019