

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ МЫШИ, РАСПОЗНАЮЩИХ ПЕРВИЧНЫЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КРОЛИКА К ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА

Трофимов А.В.<sup>1</sup>, Ищенко А.М.<sup>1</sup>, Рак А.Я.<sup>1,2</sup>, Сергеева В.Е.<sup>1</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>,  
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, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Антиидиотипические антитела (Ab2), согласно сетевой теории Эрне, представляют собой иммуноглобулины второго поколения, которые вырабатываются на идиотип антитела к определенному антигену. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию свойств этих белков, их роль в регуляции иммунной системы организма до конца не известна. Она может заключаться в поддержании или блокировании минимального иммунного ответа на антиген. Исследование Ab2 имеет большую практическую и научную значимость. Особые свойства Ab2, а именно способность частично воспроизводить структуру первичного антигена и при иммунизации индуцировать появление третичных антител, которые, подобно антителам первого поколения, связываются с антигеном, нашли применение в создании на их основе вакцин, в частности для лечения опухолей. В свете наличия ряда ограничений на проведение исследований, связанных с психоактивными веществами, перспективной представляется также разработка на основе Ab2 вакцин против наркотической зависимости. В литературе описаны антиидиотипические антитела, полученные с этой целью, обладающие кокаин-подобной структурой. В данной работе были получены мышьи моноклональные антиидиотипические антитела (mAb2), имитирующие структуру различных производных морфина. В качестве первичных антител для иммунизации были использованы выделенные методом аффинной хроматографии кроличьи поликлональные антитела к 6-гемисукцинильному производному морфина, конъюгированному с бычьим сывороточным альбумином. В результате слияния лимфоцитов им-

### 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, А.М. Ищенко, А.Я. Рак, В.Е. Сергеева,  
А.С. Симбирцев, Н.Б. Гамалея, А.Г. Берзина,  
Н.В. Станкова, Л.И. Ульянова, Т.А. Климова  
«Получение и свойства антиидиотипических  
моноклональных антител мыши, распознающих  
первичные поликлональные антитела кролика  
к производным морфина» // Медицинская иммунология,  
2019. Т. 21, № 5. С. 987-996.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-987-996

© Трофимов А.В. и соавт., 2019

### For citation:

A.V. Trofimov, A.M. Ischenko, A.Ya. Rak, V.E. Sergeeva,  
A.S. Simbirsev, N.B. Gamaleya, A.G. Berzina, N.V. Stankova,  
L.I. Ulyanova, T.A. Klimova "Preparation and properties  
of murine anti-idiotypic monoclonal antibodies recognizing  
primary rabbit polyclonal antibodies against morphine  
derivatives", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 987-996.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-987-996

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-987-996

мунизированных мышей с клетками миеломы мыши линии Sp2/0 по методике Мильштейна–Кёлера были получены четыре гибридомных клона. После наработки в животных продуцируемые клетками гибридом mAb2 были аффинно очищены. Нами исследованы физико-химические и антигенные свойства выделенных антител. Показано, что полученные mAb2 отличаются по иммунологической специфичности, в различной степени конкурируя с производными морфина за связывание с антителами первого поколения. Проверена возможность использования полученных mAb2 в качестве аналогов антигенов при постановке твердофазного иммуноферментного анализа с целью определения титра первичных антител к морфину в сыворотках крови лабораторных животных, иммунизированных производными морфина. На основе полученных антиидиотипических антител предполагается разработка тест-систем по определению антител, специфичных к опиатам, в сыворотке крови людей при проведении специфической вакцинации с лечебной или профилактической целью без применения в анализе наркотических препаратов как антигенов, иммобилизованных на твердой фазе.

*Ключевые слова:* антиидиотипические антитела, антитела, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, морфин, поликлональные антитела

## PREPARATION AND PROPERTIES OF MURINE ANTI-IDIOTYPIC MONOCLONAL ANTIBODIES RECOGNIZING PRIMARY RABBIT POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST MORPHINE DERIVATIVES

Trofimov A.V.<sup>a</sup>, Ischenko A.M.<sup>a</sup>, Rak A.Ya.<sup>a,b</sup>, Sergeeva V.E.<sup>a</sup>, Simbirtsev A.S.<sup>a</sup>, Gamaleyа N.B.<sup>c</sup>, Berzina A.G.<sup>c</sup>, Stankova N.V.<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, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Anti-idiotypic antibodies (Ab2), according to the network theory of Jerne, are second-generation immunoglobulins that are produced against the idiotype of an antibody to a specific antigen. Despite the large number of works devoted to the study of the properties of these proteins, their role in the regulation of the immune system is not fully known. It may consist in maintaining or blocking a minimal immune response to the antigen. The study of Ab2 is of great practical and scientific importance. The special properties of Ab2, namely, the ability to partially reproduce the structure of the primary antigen and, upon immunization, induce the appearance of tertiary antibodies, which, like first-generation antibodies, can bind to the antigen, have found application in the development of Ab2-based vaccines, in particular, for the treatment of tumors. In view of the presence of a number of limitations on research related to psychoactive substances, the development of Ab2-based vaccines against drug addiction also seems promising. To example, anti-idiotypic antibodies obtained for this purpose possessing a cocaine-like structure are described in the literature. In this work, murine monoclonal anti-idiotypic antibodies (mAb2) mimicking the structure of various morphine derivatives were obtained. Rabbit polyclonal antibodies to the 6-hemisuccinyl derivative of morphine conjugated with bovine serum albumin isolated by affinity chromatography were used as primary antibodies for immunization. Four hybridoma clones were obtained as a result of the fusion of immunized mice lymphocytes with mouse Sp2/0 mouse myeloma cells by the Milstein-Köhler method. After growth in animals, mAb2 produced by hybridoma cells were affinity purified. We investigated the physicochemical and antigenic properties of the isolated antibodies. It was shown that the obtained mAb2 differ in immunological specificity, competing in different degree with morphine

derivatives for binding to first-generation antibodies. We tested the possibility of using the obtained mAb2 as antigen analogues in the solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay to determine the titer of primary antibodies against morphine in the blood serum of laboratory animals immunized with morphine derivatives. Based on the obtained anti-idiotypic antibodies, it is proposed to develop test systems to determine the serum opiate-specific antibodies in people after specific vaccination for therapeutic or prophylactic purposes to avoid the use of drugs as antigens immobilized on the solid phase in the analysis.

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

## Введение

Антиидиотипические антитела (вторичные – Ab2), согласно сетевой теории Эрне, представляют собой антитела, которые вырабатываются на идиотип – антигенные детерминанты активных центров антитела (Ab1) к определенному антигену (Ag) [9]. Антиидиотипические антитела, способные имитировать специфические антигены при активной иммунизации, индуцируют в организме иммунизированного животного гуморальный и клеточный ответ на этот специфический антиген. В настоящее время эти свойства Ab2 нашли применение в создании на их основе вакцин, в частности для лечения опухолей [6, 7, 8].

Известно, что Ab2, являющиеся «внутренним образом» молекул кокаина, при вакцинации мышей способны индуцировать появление в их крови третичных антител (Ab3), способных аналогично Ab1 задерживать вводимый кокаин в кровяном русле и значимо снижать концентрацию кокаина в мозге на 36% [12]. Было показано также, что иммунизация крыс антиидиотипическими Ab2 к производному морфина способствует снижению у животных признаков зависимости [3, 4]

Ab2 можно также использовать в перспективе в качестве имитаторов некоторых веществ при создании диагностических тест-систем в производственных масштабах. В частности, они могут найти применение в качестве иммунодиагностических реагентов при детекции антител к наркотикам в сыворотке крови людей, поскольку применение для этих целей самих наркотических веществ нежелательно для практики в силу ряда ограничений.

**Целью настоящего исследования** было получение и изучение свойств антиидиотипических антител к поликлональным антителам кролика, иммунизированного конъюгатом 6-гемисукцинильного производного морфина с бычьим сывороточным альбумином (GSM-BSA).

## Материалы и методы

Первичные антитела Ab1 к 6-гемисукцинильному производному морфина (GSM), конъюги-

рованному с бычьим сывороточным альбумином (BSA), были получены в результате иммунизации кролика препаратом GSM-BSA по схеме, описанной ранее в работе [1]. Поликлональные антитела к GSM выделяли с помощью аффинной хроматографии на иммуносорбенте, приготовленном на основе цианбром-активированной сефарозы 4B (Sigma-Aldrich) по модифицированной методике [5]. В качестве лиганда использовался конъюгат производного морфина с лизоцимом.

Ab1 к трем производным морфина были также получены ранее в результате иммунизации мини-свиней светлогорской популяции [2]. Антиидиотипические моноклональные антитела к поликлональным Ab1 кролика, обозначенным нами как Ra-GSM, получали по следующей методике. Мышей линии Balb/c (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Россия) иммунизировали антигеном Ra-GSM, эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), в дозе 10 мкг на мышь, в подожженный апоневроз задних конечностей. Через 23 дня животных повторно иммунизировали той же дозой антигена в неполном адьюванте Фрейнда. На 30-й день после второй иммунизации животным вводили внутривенно 5 мкг антигена в физиологическом растворе. На четвертый 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 (Sigma, США) 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 [11].

В таблице 1 представлена схема проведения иммуноферментного анализа (ИФА) для отбора клонов, продуцирующих mAb2.

Первичный отбор позитивных клонов проводили по связыванию моноклональных антител (mAb2), секретируемых гибридомами, с антигенами Ra-GSM и Ra-IgG в ИФА. Для этого в лунки полистирольных планшетов Corning (Sigma, США) адсорбировали Ra-GSM или Ra-IgG в 20 мМ боратном буфере с pH 8,0 (содержащем 0,15 М NaCl) в концентрации 1,5 мкг/мл в течение 20 часов во влажной камере при комнатной температуре. По окончании сорбции планшеты отмывали промывочным буфером (20 мМ боратный буфер с pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl и 0,05% Tween-20). Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл промывочного буфера, содержащего 1 мг/мл БСА, и по 50 мкл культуральных сред, содержащих mAb2. Планшеты инкубировали в течение 1 часа на шейкере при 37 °С. По окончании инкубации проводили отмывку не связавшихся с антигеном антител промывочным буфером и вносили в лунки раствор иммуноглобулинов козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Германия) согласно приложенной инструкции. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37 °С на шейкере, после чего тщательно отмывали и проводили окрашивание с помощью раство-

ра субстрата тетраметилбензидина (ХЕМА, Россия). Культуральные среды клонов, показавшие специфическое связывание только с Ra-GSM, повторно тестировались в конкурентном анализе по ингибированию связывания антиидиотипических mAb2 с Ra-GSM в присутствии конкуратора GSM-лизоцим.

По результатам первичного скрининга было отобрано 130 гибридных клонов, из которых только 4 клон (обозначены как АИ-1, АИ-2, АИ-3 и АИ-4) продуцировали специфические антитела, связывание которых с Ra-GSM угнеталось GSM-лизоцимом. Культуры были трехкратно реклонированы для отбора стабильных клонов и криоконсервированы. Определение изотипа mAb2 проводили с помощью набора ISO-2 (Sigma-Aldrich, Германия) согласно инструкции, предложенной производителем.

Для наработки mAb2 гибридомы культивировали в перитонеальной полости сингенных мышей (Balb/c), доза клеток при перевивке составляла  $2-3 \times 10^6$  клеток на мыш. На 14-20-й день мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и отбирали асцитную жидкость, из которой выделяли mAb2 методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте MabSelect-сефароза (General Electric, США) согласно инструкции, предложенной производителем.

Для изучения свойств полученных mAb2 на их основе были приготовлены иммуносорбенты с использованием цианбром-активированной се-

**ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОТБОРА ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (mAb2)**

TABLE 1. SCHEME OF THE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE SELECTION OF MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES (mAb2) PRODUCERS

1 стадия ИФА 1 <sup>st</sup> stage of ELISA Сорбция антигена Antigen sorption	2 стадия ИФА 2 <sup>nd</sup> stage of ELISA Добавление в лунки Adding to the wells	3 стадия ИФА 3 <sup>rd</sup> stage of ELISA Добавление ферментной метки Enzyme label adding	Результат реакции, оцениваемый по ОП450 Reaction result, as estimated by OD450
Ra-GSM	КС** СМ**	ГАМ-Пх**** ГАМ-Пх****	+
Ra-IgG*	КС** СМ**	ГАМ-Пх ГАМ-Пх	-
Ra-GSM	КС + GSM-лизоцим*** СМ + GSM-lysozyme***	ГАМ-Пх ГАМ-Пх	-

Примечание. \* Ra-IgG – IgG-фракция иммуноглобулинов неиммунизированного кролика; \*\* КС – культуральная среда, содержащая mAb2; \*\*\* GSM-лизоцим – конъюгат 6-гемисукцинильного производного морфина с лизоцимом; \*\*\*\* ГАМ-Пх – антитела козы к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена.

Note. \* Ra-IgG, IgG-fraction of non-immunized rabbit immunoglobulins; \*\* CM, culture medium containing mAb2; \*\*\* GSM-lysozyme, conjugate of morphine 6-hemisuccinyl derivative with lysozyme; \*\*\*\* GAM-Px, goat antibodies against mouse IgG, labeled with horseradish peroxidase.

**ТАБЛИЦА 2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (mAb2)**

TABLE 2. IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES (mAb2)

Наименование клона Clone name	Изотип Isotype	Подавление связывания mAb2 с Ra-GSM Suppression of mAb2 binding with Ra-GSM		
		конкураторы competitors		
		GSM	КММ	FAM
АИ-1 AI-1	IgG1	80%	20%	64%
АИ-2 AI-2	IgG2a	97%	96%	96%
АИ-3 AI-3	IgG2a	13%	14%	18%
АИ-4 AI-4	IgG1	67%	15%	56%

**ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКА В ЭЛЮАТАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОАФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

TABLE 3. PROTEIN CONCENTRATION IN THE ELUATES OF THE BLOOD SERUM OF ANIMALS OBTAINED AS A RESULT OF IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY

Сорбенты Sorbents	Концентрация в элюатах сывороток, мкг/мл Concentration in blood serum eluates, µg/ml		
	Ra	Ra-GSM	Pig-M
АИ-1-сефароза AI-1-sepharose	< 5	140	144
АИ-2-сефароза AI-2-sepharose	< 5	137	136
АИ-3-сефароза AI-3-sepharose	< 5	141	135
АИ-4-сефароза AI-4-sepharose	< 5	122	134
Ig-сефароза Ig-sepharose	< 5	< 5	< 5

**ТАБЛИЦА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИТЕЛ КРОЛИКА, ИММУНИЗИРОВАННОГО GSM-BSA, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОСОРБЕНТОВ АИ-1- И АИ-4-СЕФАРОЗА**

TABLE 4. DETERMINATION OF GSM-BSA IMMUNIZED RABBIT ANTIBODIES, OBTAINED USING AI-1- AND AI-4-SEPHAROSE IMMUNOSORBENTS

Ra-АИ, мкг/мл Ra-AI, µg/ml	Оптическая плотность (ОП) при 450 нм Optical density (OD), 450 nm					
	Антиген, сорбированный на твердой фазе Antigen sorbed on solid phase					
	КММ-лизоцим KMM-lisozyme		GSM-лизоцим GSM-lisozyme		FAM-лизоцим FAM-lisozyme	
	Ra АИ-1 Ra AI-1	Ra АИ-4 Ra AI-4	Ra АИ-1 Ra AI-1	Ra АИ-4 Ra AI-4	Ra АИ-1 Ra AI-1	Ra АИ-4 Ra AI-4
0	0,035	0,033	0,034	0,030	0,026	0,03
0,01	0,077	0,065	0,095	0,078	0,041	0,034
0,1	0,42	0,449	0,450	0,476	0,130	0,074
1	2,151	1,964	2,239	1,932	0,793	0,299

фарозы 4В по методике [5] и конъюгат биотина с белком сыворотки мини-свиньи, иммунизированной КММ-, GSM- и FAM-БСА, который был элюирован с сорбента АИ-1-сефароза [10].

Для определения специфичности полученных mAb2 были использованы сыворотки: неиммунного кролика (Ra); кролика (Ra-GSM), иммунизированного GSM-BSA и мини-свиньи (Pig-M), иммунизированной одновременно конъюгатами трех производных морфина: 6-гемисукцинил-

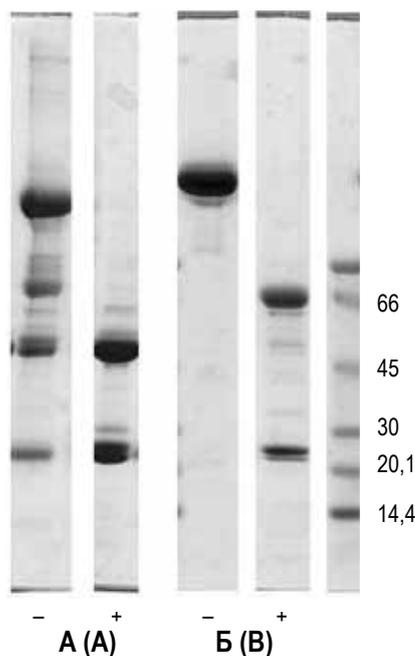
ного (GSM), 3-О-карбоксиметильного (КММ) и 2-р-карбокси-фенилазометильного (FAM) с BSA [2].

Через колонку с сорбированными на сефарозе АИ-1, 2, 3 и 4 (АИ-сефароза) пропускали однократно 1,0 мл сыворотки, в ряде экспериментов трижды. В качестве контроля использовали сорбированные на сефарозе мышинные иммуноглобулины (Ig-сефароза). После нанесения образца колонку отмывали фосфатно-солевым буфером

**ТАБЛИЦА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ БИОТИНИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ЭЛЮАТА СЫВОРОТКИ МИНИ-СВИНЬИ, ИММУНИЗИРОВАННОЙ КММ-BSA, GSM-BSA И FAM-BSA, ПОЛУЧЕННОГО С СОРБЕНТА АИ-1-СЕФАРОЗА**

**TABLE 5. DETERMINATION OF THE SPECIFICITY OF KMM-BSA, GSM-BSA, AND FAM-BSA IMMUNIZED MINI-PIG BIOTINYLATED PROTEINS OF SERUM ELUATE OBTAINED FROM AI-1-SEPHAROSE SORBENT**

Pig-M-биотин, нг/мл Pig-M-biotine, ng/ml	Оптическая плотность (ОП) при 450 нм Optical density (OD), 450 nm		
	Антиген, сорбированный на твердой фазе Antigen sorbed on solid phase		
	КММ-лизоцим KMM-lisozyme	GSM-лизоцим GSM-lisozyme	FAM-лизоцим FAM-lisozyme
0	0,016	0,018	0,014
4	0,035	0,099	0,0365
20	0,0845	0,263	0,094
100	0,139	0,826	0,1875
500	0,465	2,0505	0,583

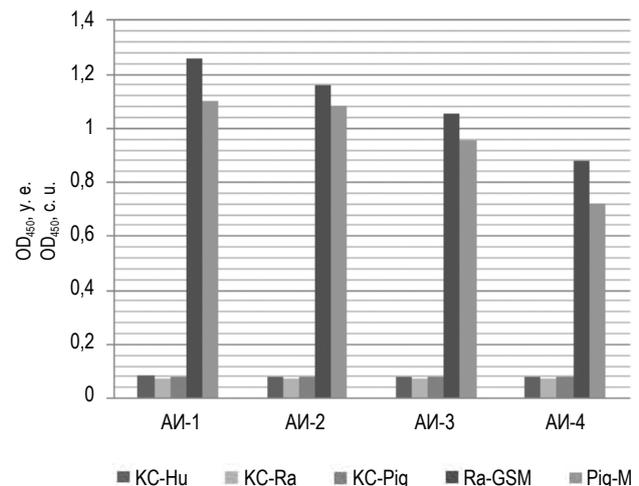


**Рисунок 1. Электрофореграмма препаратов первичных антител к производным морфина, выделенных из сывороток кролика и мини-свиньи с помощью иммуноаффинной хроматографии**

Примечание. А – элюат сыворотки Ra-GSM; В – элюат сыворотки Pig-M. + – восстановленные условия; - – невосстановленные условия.

Figure 1. Electrophoregram of primary anti-morphine antibody preparations isolated from rabbit and mini-pig sera by immunoaffinity chromatography

Note. A, eluate of the Ra-GSM serum; B, eluate of the Pig-M serum. +, reduced conditions; -, non-reduced conditions.



**Рисунок 2. Определение антител к производным морфина в контрольных сыворотках крови человека, кролика, мини-свиньи и в сыворотках крови иммунизированных животных**

Примечание. KC-Hu; -Ra; -Pig – контрольные сыворотки крови человека, кролика, мини-свиньи соответственно. Ra-GSM – сыворотка кролика, иммунизированного GSM-BSA. Pig-M – сыворотка мини-свиньи, иммунизированной GSM-BSA, KMM-BSA и FAM-BSA.

Figure 2. Detection of antibodies to the morphine derivatives in control sera from human, rabbit, mini-pig, and in sera from the immunized animals

Note. KC-Hu; -Ra; -Pig, control blood sera, from human blood, rabbit, mini-pig respectively. Ra-GSM, serum from a rabbit immunized with GSM-BSA. Pig-M, serum from a mini-pig immunized with GSM-BSA, KMM-BSA, and FAM-BSA.

(ФСБ) с рН 7,2. Для удаления с сорбента неспецифически связавшихся компонентов сыворотки через колонку пропускали фосфатно-солевой буфер (рН 7,2), содержащий 1 М хлорида натрия. Затем колонку снова промывали ФСБ, после чего проводили элюцию 0,1 М глициновым буфером с рН 2,5. Все элюаты собирали в объемах 1,0 мл, нейтрализовали до рН 7,2-7,4 и диализовали против 0,15 М раствора хлорида натрия. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с учетом коэффициента молярной экстинкции для IgG1, IgG4.

Анализ аффинно выделенных препаратов проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях в 4-20% градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН) в присутствии или без добавления восстанавливающего агента по ранее описанной методике [13].

Для определения Ат1 к производным морфина в сыворотке иммунных животных были приготовлены конъюгаты mAb2 с пероксидазой хрена по ранее описанной методике [10].

## Результаты

В таблице 2 представлены данные по изотипу полученных mAb2, а также их иммунологическая специфичность по отношению к трем производным морфина.

В таблице 3 приведены концентрации белка, полученного из 1 мл сыворотки животных: Ra, Ra-GSM и Pig-M, с использованием иммуноаффинных сорбентов АИ-1-, 2-, 3- и 4-сефароза и Ig-сефароза.

Определение специфичности выделенных антител проводили в микропланшетах с сорбированными конъюгатами производных морфина КММ-, GSM- и FAM-лизоцим.

В таблице 4 представлены результаты ИФА белков в элюатах Ra-GSM, полученных с иммуносорбентов АИ-1- и АИ-4-сефароза, где в качестве детектирующего конъюгата использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США).

В таблице 5 представлены результаты ИФА белков в элюатах Pig-M, которые предварительно конъюгировали с биотином, на последней стадии анализа меченые антитела детектировали раствором стрептавидин-пероксидазы.

Результаты исследования выделенных препаратов антител кролика и мини-свиньи методом денатурирующего электрофореза в градиентном полиакриламидном геле (4-20%) представлены на рисунке 1.

Для того чтобы определить, насколько полно можно выделить пул поликлональных антител к производным морфина, через сорбенты АИ-1-, 2-, 3- и 4-сефароза пропускали сыворотки крови лабораторных животных до полного удаления специфичных к полученным АИ антител. На первой стадии хроматографии из 1 мл сыворотки удавалось выделить от 0,12 до 0,14 мг антител. Проведение рехроматографии истощенной по антителам сыворотки позволило выделить дополнительно 15-20% антител. В результате третьей хроматографии удалось выделить не более 2-4% антител. Однако иммуноферментный анализ на антигенах КММ, GSM и FAM-лизоцим позволил детектировать в истощенных сыворотках до 83-87% антител, специфичных к производным морфина.

Полученные mAb2 были проверены в тест-системе по определению Ab1 к производным морфина в сыворотках иммунизированных животных. Для этого в лунки с сорбированными mAb2 вносили сыворотки неиммунизированного кролика, мини-свиньи, человека, Ra-GSM и Pig-M. Через 1 час инкубации в лунки вносили растворы конъюгатов тех же Ab2, но меченных пероксидазой хрена. Результаты ИФА представлены на рисунке 2.

## Обсуждение

Как видно из таблицы 2, полученные mAb2 антитела отличаются не только по изотипам, но и по иммунологической специфичности. Так, АИ-2 одинаково сильно конкурируют с тремя производными морфина, в то время как конкуренция АИ-3 со всеми производными слабая. АИ-1 и АИ-4 сильнее конкурируют с GSM- и FAM-производными морфина.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что элюаты сыворотки контрольного кролика не содержат белков, которые специфически связались бы с сорбентами АИ-сефароза. В то же время из сыворотки кролика, иммунизированного GSM-BSA (Ra-GSM), и мини-свиньи (Pig-M), удалось выделить приблизительно одинаковое количество белка на тех же иммуносорбентах. При этом элюат с контрольного сорбента Ig-сефароза не содержал белок.

Как видно из таблиц 4 и 5, в элюатах сывороток кролика и мини-свиньи содержатся антитела, которые распознают три производных морфина (КММ, FAM, GSM). Данные результаты подтверждают, что полученные моноклональные антитела распознают первичные антитела (Ab1),

специфичные к производным морфина, то есть являются антиидиотипическими по отношению к Ab1, имеющим данную специфичность, независимо от их видовой принадлежности.

Из рисунка 1 видно, что выделенные белки, которые распознаются антивидовыми конъюгатами к иммуноглобулинам класса IgG, имеют молекулярную массу 160 и 180 кДа и распадаются в восстановленных условиях на две цепи: легкую и тяжелую, то есть относятся к иммуноглобулинам класса IgG.

Результаты, представленные на рисунке 2, наглядно свидетельствуют о положительной реакции mAb2, присутствующих в сыворотках испытуемых животных, с Ab1, что позволяет сделать вывод о возможности создания тест-системы по определению антител к производным морфина у человека без применения в анализе наркотических препаратов как антигенов на твердой фазе. Применение такой тест-системы будет полезно в будущем для контроля напряженности иммунитета (выработки антител к производным

морфина) при иммунизации людей вакцинами для лечения и профилактики зависимости от опиатов.

Таким образом, в результате проведенной работы были впервые получены четыре клон, продуцирующие мышинные моноклональные антиидиотипические антитела (mAb2) к идиотипическим (первичным) антителам кролика (Ab1), иммунизированного одним из трех производных морфина. Данные mAb2, независимо от их видовой принадлежности, способны к распознаванию определенного пула поликлональных Ab1 к производным морфина, который составляет 13-17% от общего количества специфических к антигену антител в сыворотке крови кролика или мини-свиньи. На основе полученных антиидиотипических антител предполагается разработка тест-систем по определению антител, специфичных к опиатам, в сыворотке крови людей при проведении специфической вакцинации с лечебной или профилактической целью.

## 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., Gamaleyeva 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., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д. Изучение иммунного ответа у мини-свиней светлогорской популяции к двум производным морфина // Биомедицина, 2018. № 2. С. 15-21. [Berzina A.G., Ulyanova L.I., Gamaleyeva N.B., Stankova N.V., Kapanadze G.D. The study of the immune response of mini-pigs of the Svetlogorsk population to two morphine derivatives. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2018, no. 2, pp. 15-21. (In Russ.)]
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов. Патент на изобретение RU № 2548802, 2015. [Gamaleyeva N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V. Immunogen for the treatment and prevention of opiate dependence. Patent RU 2548802, 2015].
4. 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. [Gamaleyeva 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.)]
5. Кулаев Д.В., Насибов С.М., Маркин С.С., Бобков Ю.Г., Семенов М.П. Хроматографический способ выделения альфа-фетопротеина // 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].
6. Barucca A., Capitani M., Cesca M., Tomassoni D., Kazmi U., Concetti F., Vincenzetti L., Concetti A., Venanzi F.M. Recombinant DNA technology for melanoma immunotherapy: anti-Id DNA vaccines targeting high molecular weight melanoma-associated antigen. *Mol. Biotechnol.*, 2014, Vol. 56, no. 11, pp. 1032-1039.
7. Basak S., Eck S., Gutzmer R., Smith A.J., Birebent B., Purev E., Staib L., Somasundaram R., Zaloudik J., Li W., Jacob L., Mitchell E., Speicher D., Herlyn D. Colorectal cancer vaccines: antiidiotypic antibody, recombinant protein, and viral vector. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 910, Iss. 1, pp. 237-252.
8. Bellati F., Napoletano C., Ruscito I., Antonilli M., Gasparri M.L., Zizzari I.G., Rahimi H., Rughetti A., Benedetti Panici P., Nuti M. Past, present and future strategies of immunotherapy in gynecological malignancies. *Curr. Mol. Med.*, 2013, Vol. 13, no. 4, pp. 648-669.

9. Jerne N.K., Cocteau J. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.*, 1984, Vol. 79, no. 1, pp. 5-24.
10. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press, 2008, 1323 p.
11. 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.
12. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 88-94.
13. Walker J.M. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.*, 1984, Vol. 1, 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

**Ищенко А.М.** — к.б.н., заведующий лабораторией 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

**Сергеева В.Е.** — научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, 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

**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

**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

**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

**Sergeeva V.E.**, Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, 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

**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.м.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

**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., специалист лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**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 (Medicine), 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

**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), Specialist, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 30.09.2018  
Отправлена на доработку 19.11.2018  
Принята к печати 25.12.2018

---

Received 30.09.2018  
Revision received 19.11.2018  
Accepted 25.12.2018