

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К МОРФИНУ: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

А.В. Трофимов¹, А.Я. Рак¹, А.Г. Берзина^{2*}, Л.И. Ульянова², Н.Б. Гамалея²,
Т.А. Климова², Н.В. Станкова³

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт
особо чистых биопрепаратов» ФМБА России
197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии
им. В.П. Сербского» Минздрава России
119034, Российская Федерация, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

³ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

В работе описана методика получения антиидиотипических моноклональных антител (Ab2) к двум производным морфина. Представлены результаты исследования специфичности полученных антител с помощью иммуоферментного анализа. Проведена оценка биологической активности на модели пролиферации культур перевиваемой клеточной линии глиобластомы человека T98G *in vitro*.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, гибридома, клеточная культура, морфин, налосон, синтез ДНК

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Трофимов А.В., Рак А.Я., Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Станкова Н.В. Антиидиотипические моноклональные антитела к морфину: получение, свойства и перспективы использования. *Биомедицина*. 2019;15(2):63–68. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-63-68>

Поступила 28.03.2019

Принята после доработки 03.04.2019

Опубликована 10.06.2019

ANTI-IDIOTYPIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST MORPHINE: PRODUCTION, PROPERTIES AND PROSPECTS OF USE

Alexandr V. Trofimov¹, Alexandra Ya. Rak¹, Asya G. Berzina^{2*}, Lyudmila I. Ulyanova²,
Natalia B. Gamaleya², Tatyana A. Klimova², Natalia V. Stankova³

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
197110, Russian Federation, Saint Petersburg, Pudozhskaya str., 7

² V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology
119034, Russian Federation, Moscow, Kropotkinskiy lane, 23

³ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1

This paper describes a technique for producing anti-idiotypic monoclonal antibodies (Ab2) against two morphine derivatives. The specificity of the obtained antibodies was investigated using enzyme immunoassay. The biological activity of the antibodies was studied using an in-vitro model of human glioblastoma T98G cell line proliferation.

Keywords: anti-idiotypic antibodies, hybridoma, cell culture, morphine, naloxone, DNA synthesis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Trofimov A.V., Rak A.Ya., Berzina A.G., Ulyanova L.I., Gamaleya N.B., Klimova T.A., Stan-kova N.V. Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies against Morphine: Production, Properties and Prospects of Use. *Journal Biomed.* 2019;15(2):63–68. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-63-68>

Submitted 28.03.2019

Revised 03.04.2019

Published 10.06.2019

Введение

Разработка вакцины для лечения опиатной зависимости имеет важное практическое значение, поскольку предупреждение дальнейших рецидивов у больных, прошедших курс лечения, является наиболее эффективной мерой. В качестве одного из перспективных направлений может рассматриваться использование для вакцинации иммунобиологических препаратов, полученных на основе антиидиотипических (вторичных) антител, являющихся белковыми имитаторами исходных антигенов [2, 4]. Для получения антиидиотипических антител к двум производным морфина нами были использованы первичные моноклональные антитела (MAb1) к 3-карбоксиметильному (КММ) и 6-гемисукцинийному (ГСМ) производным морфина, а именно — производным по гидроксильным остаткам при атомах углерода в 3-м и 6-м положениях фенантренового кольца молекулы морфина.

Цель работы — получение, характеристика, проверка иммуногенных и морфиноподобных свойств антиидиотипических моноклональных антител (Ab2) к двум производным морфина.

Материалы и методы

Мышей линии Balb/c иммунизировали ранее полученными MAb1 к двум производным морфина (клоны 3K11 и 6G1,

распознающие разные участки молекулы морфина) [1]. Антитела, конъюгированные с гемоцианином, вводили в дозе 10 мкг/мышь в смеси с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ). На 30-й день животным вводили внутривенно 5 мкг MAb1 в физ. р-ре, после чего (на 4-й день) животных умерщвляли и из паховых и брюшных лимфоузлов выделяли спленоциты и лимфоциты. Затем клетки смешивали с клетками миеломы мыши линии SP 2/0 в соотношении 2:1 и проводили гибридизацию по методу Мильштейна — Келера. Для выделения аффинных антиидиотипических (AI, Ab2) антител из асцитных жидкостей были приготовлены иммуносорбенты 3K11-сефароза и 6G1-сефароза. Специфичность моноклональных Ab2 антител определяли с помощью ИФА в реакции с пероксидазными конъюгатами MAb1 — 3K11 и 6G1. Ab3 иммунный ответ изучали на кроликах породы советская шиншилла. Схема иммунизации представлена в табл. 1.

Титр Ab3 антител в сыворотках крови определяли с помощью непрямого метода ИФА, используя в качестве антигена на твердой фазе конъюгат фенилазпроизводного морфина по 2-му атому углерода с лизоцимом (ФАМ-лиз).

Для оценки Ab2 антител по способности проявлять морфиноподобные свойства *in vitro* была использована культура глиобластомы человека линии T98G с ярко

Таблица 1. Схема иммунизации кроликов для получения Ab3 антительного ответа
Table 1. A scheme describing immunization of rabbits for obtaining the antibody Ab3 response

Вводимый антиген	Способ введения антигена	
	1-я инъекция — 0 день	2-я инъекция — 15-й день
АИ-K11В АИ-G1	0,2 мг антигена в 2 точки внутримышечно с ПАФ, 1:1	0,2 мг антигена в 4 точки подкожно вдоль хребта с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), 1:1
	3-я инъекция — 30-й день	4-я инъекция — 45-й день
	0,2 мг антигена в 4 точки подкожно вдоль хребта с НАФ (1:1)	0,2 мг антигена в 2 мл физ. р-ра внутривенно

выраженной экспрессией опиоидных рецепторов. Биологический эффект Ab2 антител в широком диапазоне доз (от 0,39 до 25 мкг на 1 мл полной питательной среды — ППС) проверяли по их способности влиять на синтез ДНК в культуре клеток в сравнении с действием морфина и налоксона, обладающих агонистическим и антагонистическим действием по отношению к μ -опиоидным рецепторам соответственно. Культивирование клеток и постановку экспериментов проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, как было указано ранее [3]. Интенсивность биологического эффекта антител и ПАВ оценивали по активности синтеза ДНК в клеточных культурах, которую измеряли по скорости включения метил- $^3\text{H}_1$ -тимидина во вновь синтезируемую ДНК и выражали в импульсах в мин (имп/мин).

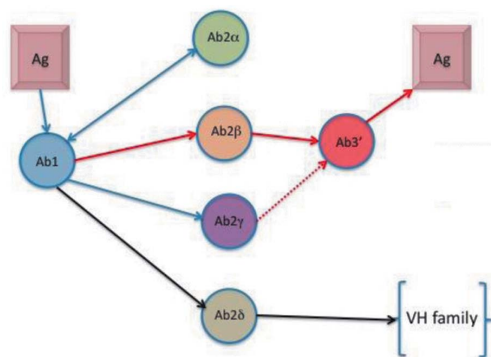


Рис. 1. Каскад антител (Ab), образующихся при иммунизации.

Fig. 1. The cascade of the antibodies (Ab) formed during immunization.

Результаты и их обсуждение

В результате проделанной работы были получены 3 клон-продуцента Ab2, из которых два (Ab2-K11A и Ab2-K11B), по данным конкурентного ИФА, продуцировали антитела, специфичные к MAb1-3K11, тогда как клон Ab2-G1 явился продуцентом Ab2, распознающих MAb1-6G1. Известно, что в результате иммунизации первичным антигеном, согласно теории Эрне, образуется целый каскад идиотипов антител (рис. 1), причем Ab3 антитела обладают Ab1-подобными свойствами (рис. 2).

Иммунизация кроликов полученными Ab2 антителами индуцировала продукцию Ab3 антител у животных. Проверка специфичности выделенных Ab3 антител методом ИФА с лизоцимными конъюгатами трех производных морфина (табл. 2) показала, что они обладают способностью

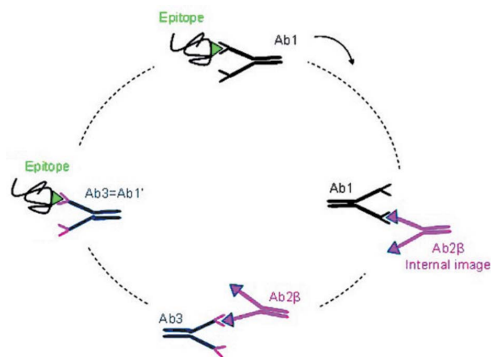


Рис. 2. Специфичность Ab1, Ab2 и Ab3 антител первичным антигеном (Ag).

Fig. 2. The specificity of the Ab1, Ab2 and Ab3 antibodies to the primary antigen (Ag).

связываться с теми производными, которые были использованы для получения Ab1 антител (КММ, ГСМ), а также с ФАМ-лиз. Полученные результаты свидетельствуют также о принадлежности Ab3 антител к $\beta 2$ -типу.

Изучение динамики накопления Ab3 антител в сыворотке кроликов, иммунизированных моноклональными Ab2 антителами, показало, что пик продукции Ab3 антител приходится на 31-е сут от последней иммунизации (табл. 3), при этом концентрация антител достигала 31692 нг/мл, что было существенно выше ранее полученных результатов, когда для иммунизации животных использовались поликлональные Ab2 антитела (200 нг/мл) к тем же антигенам.

Проверка биологической активности антиидиотипических антител (Ab2) на культуре перевиваемой линии глиобластомы человека T98G, клетки которой несут на своей поверхности опиоидные κ - и μ -рецепторы, показала, что антитела Ab2-K11B и Ab2-G1, используемые в диапазоне доз 0,39–10 мкг/мл, активируют подобно морфину синтез ДНК в культуре клеток T98G (рис. 3). Причем максимальная интенсивность синтеза ДНК в клетках линии T98G у антиидиотипических антител АИ-K11B, полученных на основе Ab1-K11B, достигалась при концентрации 6,25 мкг/мл, аналогично морфину, тогда как у АИ-G1, полученных на основе Ab1-G1 антител, этот эффект был более выражен в сравнении как с морфином, так и с АИ-K11B антителами, и достигал максимума при концентрации 3,125 мкг/мл. Далее мы попытались выяснить, является ли механизм действия Ab2 антиидиотипических антител в культуре клеточной линии T98G аналогичным действию морфина, который активирует клетки, главным образом, через μ -опиоидные рецепторы. В клеточные культуры одновременно с морфином или Ab2 антиидиотипическими антителами был введен налоксон, внесение

Таблица 2. Иммунологическая специфичность Ab3 антител

Table 2. The immunological specificity of Ab3 antibodies

Наименование антител	Антиген, иммобилизованный на плате		
	КММ-лиз.	ФАМ-лиз.	ГСМ-лиз.
Ab1 K11	+	+	–
Ab1 G1	–	–	+
Ab3 АИ-K11B	+	+	+
Ab3 АИ-G1	+	+	+

Таблица 3. Динамика образования Ab3 антител

Table 3. The dynamics of formation of Ab3 antibodies

Сутки	АИ-K11B	АИ-G1
	Ab3 нг/мл	Ab3 нг/мл
16	4804	9964
28	12 636	19 158
31	24 756	31 692
37	33 531	28 634
50	30 864	19 646

которого в культивируемые лимфоциты человека, как мы показали ранее, нейтрализует эффект морфина, стимулирующий синтез ДНК в этих культурах [3]. Результаты оценки нейтрализующего эффекта налоксона представлены на рис. 3, из которого видно, что налоксон полностью блокирует не только стимулирующий эффект синтеза ДНК в культурах T98G, вызванный морфином, но также полностью устраняет эффект стимуляции, вызванный АИ антителами, при всех испытанных концентрациях препаратов.

Закключение

Таким образом, полученные нами моноклональные антиидиотипические Ab2 антитела к двум производным морфина по своей способности индуцировать иммунный Ab1-подобный Ab3 ответ могут рассматриваться в дальнейшем как белковый имитатор производных морфина. Специфичность выделенных из кроличьей сыворотки крови Ab3 антител шире, чем

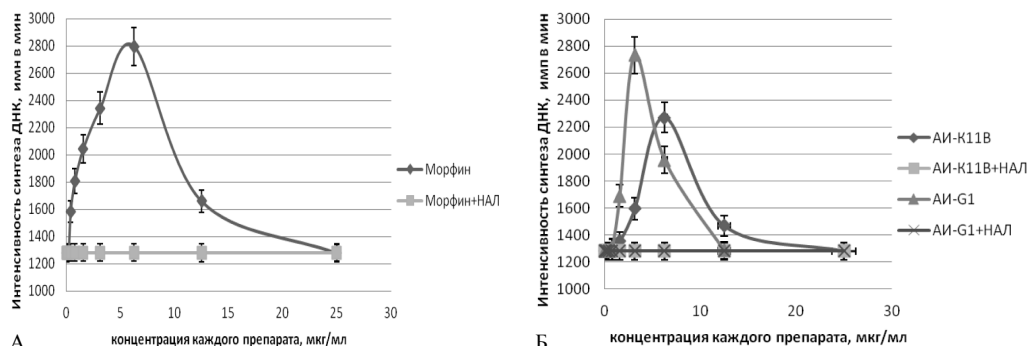


Рис. 3. Оценка биологической активности морфина (А) и Ab2 (Б) в культуре клеток T98G.
Fig. 3. The assessment of the biological activity of morphine (A) and Ab2 (Б) in a T98G cell culture.

у исходных моноклональных Ab1 антител. Пик продукции Ab3 антител приходится на 30–35 дни после последней иммунизации. У Ab2 антител, полученных на основе Ab1-K11B антител, максимальная интенсивность индукции пролиферативного ответа в клетках линии T98G достигается при концентрации 6,25 мкг/мл, как в слу-

чае морфина, а у полученных на основе G1 антител — при концентрации 3,125 мкг/мл. Таким образом, мы установили, что АИ-K11В и АИ-G1, как и морфин, оказывают стимулирующее влияние на пролиферативные процессы перевиваемой клеточной линии T98G, что свидетельствует об их морфиноподобных свойствах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- 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):39–53. [Berzina A.G., Gamaleya N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Krotov G.I., Ul'yanova L.I. Poluchenie poliklonal'nyh i monoklonal'nyh antitel k dvum proizvodnym morfina [Preparation of polyclonal and monoclonal antibodies to two morphine derivatives]. *Voprosy narkologii [The questions of narcology]*. 2016;(11–12):39–53. (In Russian)].
- Гамалея Н.Б., Берзина А.Г. Вакцина от наркотиков — новое перспективное направление профилактики злоупотребления психоактивными веществами. *Наркология*. 2010;(11):70–83. [Gamaleya N.B., Berzina A.G. Vaksina ot narkotikov — novoe perspektivnoe napravlenie profilaktiki zloupotrebleniya psikhoaktivnymi veshchestvami [Drug vaccine — a new promising area of prevention of substance abuse]. *Narcology*. 2010;(11):70–83. (In Russian)].
- Гамалея Н.Б., Ульянова М.А., Берзина А.Г., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Оценка биологической активности морфина, лоперамида и налоксона на культуре перевиваемой клеточной линии человека T98G. *Наркология*. 2017;(1):39–44. [Gamaleya N.B., Ul'yanova M.A., Berzina A.G., Krotov G.I., Ul'yanova L.I. Otsenka biologicheskoy aktivnosti morfina, loperamida i naloksona na kul'ture perezivaimoj kletочноj linii cheloveka T98G [Assessment of biological activity of morphine, loperamide and naloxone on human cell line culture T98G]. *Narcology*. 2017;(1):39–44. (In Russian)].
- Schabacker D.S., Kirschbaum K.S., Segre M. Exploring the feasibility of an anti-idiotypic cocaine vaccine: analysis of the specificity of anticocaine antibodies (Ab1) capable of inducing Ab2β anti-idiotypic antibodies. *Immunology*. 2000;100:48–56.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Трофимов Александр Викторович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;

e-mail: honeyagarc@yandex.ru

Alexandr V. Trofimov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: honeyagarc@yandex.ru

Рак Александра Яковлевна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;

Alexandra Ya. Rak, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: berzina07@mail.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

e-mail: berzina07@mail.ru

Ульянова Людмила Ивановна, д.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: ulyanova.46@mail.ru

Lyudmila I. Ulyanova, Dr. Sci. (Biol.), V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

e-mail: ulyanova.46@mail.ru

Гамалея Наталия Борисовна, д.м.н., проф., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: natgam@mail.ru

Natalia B. Gamaleyа, Dr. Sci. (Med.), Prof., V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

e-mail: natgam@mail.ru

Климова Татьяна Андреевна, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

Tatyana A. Klimova, Cand. Sci. (Biol.), V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;

e-mail: sinayva@yandex.ru

Natalia V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: sinayva@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author