

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, налоксон, 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., Gamaleyeva N.B., Klimova T.A., Stanikova 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-гемисукцинильному (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 гемоглобином, вводили в дозе 10 мкг/мышь в смеси с полным адьювантом 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 спленциты 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 фенилазопроизводного 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-K11B 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 адьювантом 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).

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

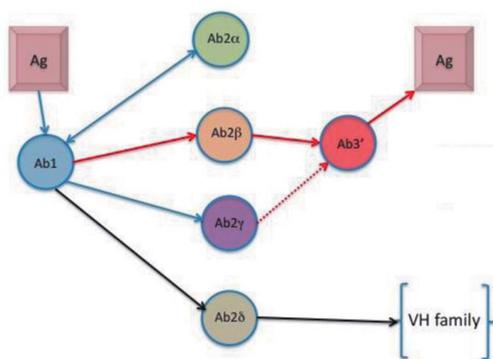


Рис. 1. Каскад антител (Ab), образующихся при иммунизации.

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

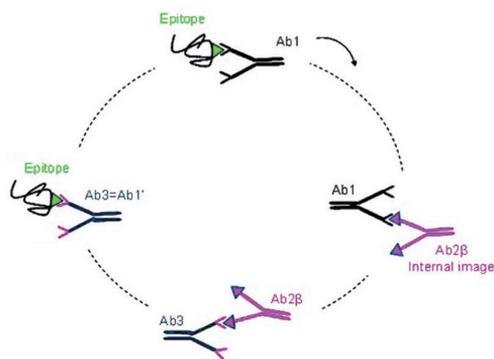


Рис. 2. Специфичность Ab1, Ab2 и Ab3 антител первичным антигеном (Ag).

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 β 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.

Заключение

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

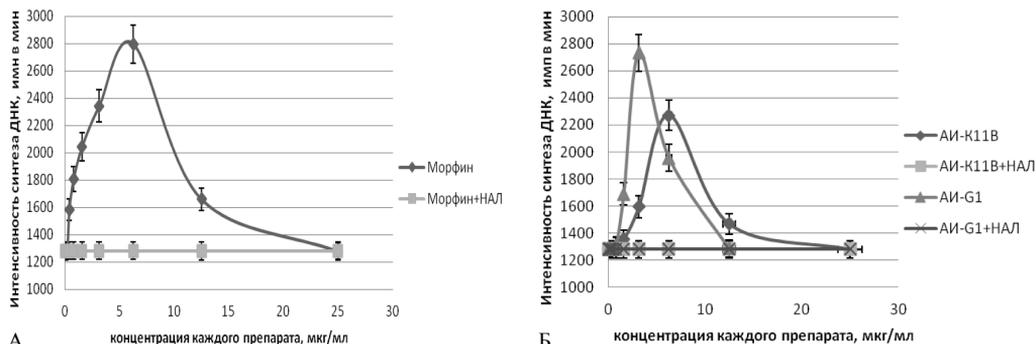


Рис. 3. Оценка биологической активности морфина (А) и Ab2 (Б) в культуре клеток Т98G.
 Fig. 3. The assessment of the biological activity of morphine (A) and Ab2 (Б) in a T98G cell culture.

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 Т98G 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 AI-K11B и AI-G1, как и морфин, оказывают стимулирующее влияние на пролиферативные процессы перевиваемой клеточной линии Т98G, что свидетельствует об их морфиноподобных свойствах.

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):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)].
2. 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 zlouptrebleniya psikhoaktivnymi veshchestvami [Drug vaccine — a new promising area of prevention of substance abuse]. *Narcology*. 2010;(11):70–83. (In Russian)].
3. 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 Т98G. *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 perevivaemoj kletochnoj 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)].
4. 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: honeyagaric@yandex.ru

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

e-mail: honeyagaric@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: oulyanova.46@mail.ru

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

e-mail: oulyanova.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