

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ И ТРЕТИЧНЫХ АНТИТЕЛ К ДВУМ ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА

© 2019 г. А. Г. Берзина^{1*}, Л. И. Ульянова¹, Н. Б. Гамалея¹,
Т. А. Климова¹, А. В. Трофимов², Н. В. Станкова³

*E-mail: berzina07@mail.ru

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии
им. В. П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых
биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Московская область,
Красногорский район, пос. Светлые горы, Россия

Поступила: 25.02.2019. Принята: 11.03.2019

На основе первичных мышинных моноклональных (МАт1) антител к двум производным морфина — 3-карбоксиметильному (КММ) и 6-гемисукцинильному (ГСМ) были получены лошадиные антиидиотипические антитела (Ат2). Иммунизация кроликов и мини-свиней Ат2 антителами приводила к образованию третичных антител (Ат3). Установлено, что Ат2 антитела обладают морфиноподобными свойствами — стимулируют синтез ДНК в клетках глиобластомы человека линии Т98G, экспрессирующих на мембране значительное количество опиоидных рецепторов. Добавление в систему *in vitro* Ат3 антител приводило к отмене стимулирующего эффекта.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, иммуноферментный анализ, клеточная культура глиобластомы человека линии Т98G, моноклональные, производные морфина, синтез ДНК

DOI: 10.31857/S102872210006436-4

Адрес: 119002 Москва, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского» Минздрава России, филиал ННЦ наркологии, лаборатория иммунохимии, Берзина Ася Григорьевна. Тел.: +7 (499) 241 70 83, 8 925 237 27 10 (моб.).

E-mail: berzina07@mail.ru

Авторы:

Берзина А. Г., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунохимии ФГБУ «ФМИЦПН им. В. П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия;

Ульянова Л. И., д.б.н., в.н.с. лаборатории иммунохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В. П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия;

Гамалея Н. Б., д.м.н., проф., заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В. П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия;

Климова Т. А., к.б.н., н.с. лаборатории иммунохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В. П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия;

Трофимов А. В., руководитель группы, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Станкова Н. В., заведующая лабораторией, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые горы, Россия.

По данным ВОЗ, число лиц, употребляющих наркотики, в мире составляет более 210 млн. чел, что соответствует 3% из 7 млрд. населения земного шара, подавляющее большинство — около 80%, составляют больные с зависимостью от опиатов [1]. Сравнительно недавно стали исследовать возможности иммунотерапии — вакцинации больных с целью лечения наркотической зависимости. Перспективным направлением является использование в качестве иммуногенов антиидиотипических (вторичных) антител [2, 3]. При разработке антиидиотипической вакцины от опиатов нами были использованы первичные моноклональные антитела МАт1 к 3-карбоксиметильному (КММ) и 6-гемисукцинильному (ГСМ) производным морфина.

Целью работы явилось получение Ат2 антител лошади к двум производным морфина на основе МАт1 антител, индукция Ат3 иммунного ответа в ксеногенных системах — кролики, мини-свиньи, а также оценка антигенных и биологических свойств Ат2 и Ат3 антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поликлональные антиидиотипические антитела лошади к двум производным морфина были выделены методом аффинной хроматографии на CNBr-сефарозе 4В по модифицированной нами методике [4] из сыворотки крови лошади, иммунизированной суммарным препаратом МАт1 (клоны К11 и Г1) в дозе 20 мкг/кг по схеме: в/м инъекция с полным адъювантом Фрейнда (Sigma Aldrich), через 14 дней п/к инъекция с неполным адъювантом Фрейнда в область шейных лимфоузлов и через 60 дней в/в введение 2 мг препарата МАт1 в 2 мл физиологического раствора. Антигенные свойства Ат2 антител проверяли с помощью «прямого» и «сэндвич» методов ИФА с использованием меченных пероксидазой хрена (Sigma Aldrich) Ат1 кроличьих антител к тем же производным морфина. В качестве положительного контроля в реакции использовали конъюгат 2-р-карбокси-фенилазометильного производного морфина с лизоцимом (ФАМ-лиз). Ат3 иммунный ответ изучали на кроликах породы Новозеландский белый и мини-свиньях Светлогорской популяции. Титр Ат3 антител в сыворотках крови определяли с помощью непрямого метода ИФА, используя в качестве антигена на твердой фазе ФАМ-лиз. Для оценки Ат2 антител по способности проявлять морфиноподобные свойства *in vitro*, была использована культура глиобластомы человека линии Т98G с ярко выраженной экспрессией опиоидных рецепторов. Биологический эффект Ат2 и Ат3 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 -опиатным рецепторам. Культивирование клеток и постановку экспериментов проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, как было указано ранее в статье [5]. 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 ОБСУЖДЕНИЕ

В результате иммунизации лошади МАт1 антителами к двум производным морфина была получена антиидиотипическая сыворотка с ти-

тром — 10^{-5} . Аффинная очистка Ат2 антител на иммуносорбенте CNBr-сефароза 4В + Ат1 свиной к тем же производным морфина позволила избавиться от балластных антител к Fc-фрагменту мыши. Проверка антигенных свойств аффинных Ат2 антител лошади с помощью прямого метода ИФА показала, что они положительно реагируют с меченым ферментом Ат1 антителами кролика, аналогично антигену ФАМ-лиз. В сыворотках крови кроликов и мини-свиной, иммунизированных антиидиотипическими антителами к производным морфина, были определены титры третичных антител. Так, титр Ат3 в сыворотке кролика на 45-й день от начала иммунизации составил $1,5 \times 10^{-3}$, у мини-свиной — 3×10^{-3} . Для оценки действия широкого диапазона доз Ат2 антител (0,39–25 мкг в 1 мл ППС) и агониста опиоидных рецепторов — морфина показали, что Ат2 антитела лошади активируют синтез ДНК в культуре клеток Т98G аналогично действию морфина. Пик усиления эффекта синтеза ДНК морфином наблюдался при дозе 6,25 мг/мл и был равен $2214,7 \pm 194$ против $1167,8 \pm 100,3$ имп/мин в культуре без внесения морфина, в то время как при действии Ат2 антител этот эффект наблюдался при дозе 3,125 мкг/мл и был менее выражен ($2028,2 \pm 206$ имп/мин). При одновременном введении налоксона с морфином или Ат2 антителами в культуры клеток Т98G было установлено, что налоксон полностью блокирует не только стимулирующий эффект синтеза ДНК в культурах Т98G, вызванный морфином, но и полностью устраняет эффект стимуляции, вызванный Ат2 антителами при всех исследованных концентрациях препаратов. Тестирование кроличьих и свиных Ат3 антител в разработанной нами системе показало, что они, независимо от видовой принадлежности, отменяют стимулирующее действие морфина на синтез ДНК в клетках, т.е. обладают Ат1-подобными свойствами, что было показано ранее при тестировании первичных антител к КММ и ГСМ.

Таким образом, полученные нами поликлональные Ат2 могут рассматриваться как имитатор морфина для индукции Ат1-подобного иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Всемирный доклад о наркотиках. Управление Организации Объединенных Наций по наркотикам и преступности, 2015. Организация Объединенных Наций: Нью-Йорк. World Drug Report. United

- Nations Office on Drugs and Crime, 2015. United Nations: New York.
2. 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 Ab2 anti-idiotypic antibodies. *Immunology*. 2000, 100, 48–56.
3. Гамалея Н. Б., Берзина А. Г., Ульянова Л. И. Методологические основы создания вакцины для иммунотерапии зависимости от опиатов. *Вопросы наркологии*. 2017, № 4–5, 32–56. [Gamaleya N. B., Berzina A. G., Ul'yanova L. I. Methodological basis for development of a vaccine for opiate dependence immunotherapy. *Journal of addiction Problems*. 2017, no. 4–5, 32–56.]
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 for the isolation of alpha-fetoprotein. Patent RU2094078, 1997]
5. Гамалея Н. Б., Ульянова М. А., Берзина А. Г., Ульянова Л. И. Тестирование психоактивных веществ и антител к ним в модели *in vitro*. *Наркология*. 2014, № 11, 37–41. [Gamaleya N. B., Ul'yanova M. A., Berzina A. G., Ul'yanova L. I. Testing of psychoactive substances and antibodies against them in an *in vitro* model. *Narcology*. 2014, no. 11, 37–41.]

SOME BIOLOGICAL FEATURES OF ANTI-IDIOTIPIC AND TERTIARY ANTIBODIES AGAINST TWO MORPHINE DERIVATIVES

© 2019 A.G. Berzina^{1*}, L. I. Ulyanova¹, N. B. Gamaleya¹, T. A. Klimova¹,
A. V. Trofimov², N. V. Stankova³

*E-mail: berzina07@mail.ru

¹V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology,
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

²The State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of Russia,
St Petersburg, Russia;

³Scientific Center for Biomedical Technology, FMBA of Russia, Settlement Svetlye Gory, Russia

Received: 25.02.2019. Accepted: 11.03.2019

The horse anti-idiotypic antibodies (Ab2) were obtained on the base of 2 mouse monoclonal antibodies (mAb) specific for two morphine derivatives – 3-0-carboxymethyl (CMM) and 6-hemisuccinyl (GSM). Immunization of rabbits and mini-pigs with Ab2 led to the formation of tertiary antibodies (Ab3). It was found that Ab2 antibodies have morphine-like properties, i.e. stimulate DNA synthesis in cultured human glioblastoma cells of the T98G line, which expresses a significant amount of opioid receptors on cell membrane. The addition of Ab3 antibodies to the System *in vitro* led to the abolition of the stimulating effect.

Key words: anti-idiotypic antibodies, enzyme linked immunoassay, cell culture of human glioblastoma T98G line, monoclonal antibodies, morphine derivatives, DNA synthesis

Authors:

Berzina A. G., ☒ PhD, senior researcher, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. **E-mail:** berzina07@mail.ru;

Ulyanova L. I., doctor of biological sciences, leading researcher, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

Gamaleya N. B., doctor of medical sciences, professor, head of laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

Klimova T. A., PhD, senior researcher, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

Trofimov A. V., group leader, The State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of Russia, St Petersburg, Russia;

Stankova N. V., PhD, head of laboratory, Scientific Center for Biomedical Technology, FMBA of Russia, Moscow region, Krasnogorsk, Settlement Svetlye Gory, Russia.