

УДК 619.615.37-619:616.98:579.841.93Б(083.94)

С.Г. ОСПАНОВА*, А.Б. БУКЕЕВА

Казахский агротехнический университет им.С. Сейфуллина, Астана, Казахстан, 010000

e-mail: sgo5@mail.ru

Иммуногенные свойства антиидиотипических антител и их Fab-фрагментов, специфичных к иммуноглобулинам против липополисахарида бруцелл

Мышей линии *BALB/c* иммунизировали моноклональными антиидиотипическими антителами (АИАТ), специфичными к иммуноглобулинам против липополисахаридного антигена (ЛПС) бруцелл, и их Fab-фрагментами пятикратно на 1-е, 7-е, 11-е, 12-е и 13-е сутки в количестве 50 и 100 мкг. После этого определяли у тест-животных титр специфических антител (АТЗ в случае АИАТ или АТ1 в случае ЛПС). Согласно другой схеме иммунизации иммуногены инъецировали животным по 50 мкг четырехкратно с интервалом в две недели. Выявлено, что оптимальной иммунизирующей дозой АИАТ является 50 мкг. Титр иммунных сывороток при использовании в качестве иммуногена АИАТ и их Fab-фрагментов составил 1:6400, в то время как при иммунизации ЛПС-антигеном он был равен 1:12800. Таким образом, показано, что АИАТ и их Fab-фрагменты индуцируют иммунный ответ к липополисахаридному антигену.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, иммуноген, ИФА, Fab-фрагменты.

Актуальной и перспективной основой для разработки профилактических и диагностических препаратов в настоящее время являются поликлональные и моноклональные антиидиотипические антитела как безопасные и эффективные средства профилактики и лечения аутоиммунных, инфекционных, вирусных и онкологических заболеваний.

В работах [1, 2] описаны получение и изучение свойств поликлональных и моноклональных антиидиотипических антител, нейтрализующих вирус, вызывающий болезнь Марека.

Tomoko K., *et al.* иммунизировали мышей линии *BALB/c* человеческими моноАТ против вируса гепатита А и получили два клона (94-2 и 94-7), которые продуцировали АИАТ. С помощью ИФА и иммунофлуоресценции определили, что АИАТ способны конкурировать с исход-

ным антигеном за связывание с антителами первого порядка [3].

Голландские исследователи показали, что антитела к АИАТ или их фрагменты специфически распознают и связывают растворимый рецептор липопротеинов низкой плотности человека, а также способны ингибировать репликацию вируса гепатита С [4].

В Казахстане поликлональные антиидиотипические антитела были применены для ранней прижизненной диагностики оводовых болезней лошадей [5]. Также имеются сообщения об использовании поликлональных антиидиотипических антител при изучении кровепаразитарных болезней животных [6].

В научной литературе широко представлены работы по применению антиидиотипических

Оспанова Сауле Гельмановна, Букеева Акбота Бультриковна.

Список сокращений: АИАТ — антиидиотипические антитела; АТЗ — антитела 3-го порядка; БСА — бычий сывороточный альбумин; ЗФР — забуференный физиологический раствор; ИФА — иммуноферментный анализ; ЛПС — липополисахариды; моноАТ — моноклональные антитела; ПААГ — полиакриламидный гель; PBS — физиологический раствор в фосфатном буфере; SDS — додецилсульфат натрия.

* Автор для переписки.

антител для профилактики и терапии опухолевых заболеваний. Так например, авторы [7] описали АИАТ, которые индуцировали специфический клеточный иммунный ответ против опухолевого антигена. Испанскими учеными получены АИАТ против рецептора эпидермального фактора, которые ингибировали рост опухоли [8]. Использование АИАТ повысило эффективность и достоверность диагностики злокачественных опухолевых заболеваний [9]. О роли АИАТ в генезисе опухолевых заболеваний сообщается также в работе [10].

На основании обзора литературы можно утверждать, что АИАТ представляют научно-практическую ценность как основа для разработки профилактических средств. Об этом свидетельствует разнообразие опубликованных научных исследований по использованию АИАТ в качестве протективных и терапевтических препаратов при различных заболеваниях. Так, предложен способ лечения лейкоза, основанный на индукции синтеза антиидиотипических аутоиммунных антител в организме больного, что достигается с помощью иммунизации его соответствующими аутоантителами и рецепторами иммунных лимфоцитов. Последние были предварительно выделены с использованием иммуносорбентов, несущих антигены, которые служат мишенями для аутоиммунных реакций данного больного организма и присоединены к инертному носителю [11]. В исследовании [12] описана разработка вакцины для профилактики и/или лечения опосредованной Т-клетками патологии или нерегулируемой репликации клонами Т-клеток, а также способа диагностики восприимчивости к ревматоидному артриту или рассеянному склерозу и способа профилактики или лечения этих заболеваний. При этом авторы в качестве активного вещества вакцины использовали АИАТ.

АИАТ применяли и для коррекции патологического аутоиммунного процесса при сахарном диабете. В качестве иммуносупрессоров использовали инсулин или его антиидиотипические антитела, которые обеспечивали иммуномодуляцию, вследствие чего уменьшается деструктивный антипанкреатический аутоиммунный процесс [13].

При терапии злокачественных опухолей нейроэктодермальной природы в качестве нативного антигена — дисиалоганглиозида GD2, ассоциированного с опухолями — использовали антиидиотипические антитела (анти-Id) против анти-ОО2-антител (GD2-Ak), так как прямая вакцинация антигеном GD2 была невозможна из-за его недостаточной чистоты, малой растворимости в воде и низкой иммуногенности [14].

На основе АИАТ создана иммуногенная вакцина, повышающая эффективность вакцинации против канцероэмбрионального антигена [15].

На сегодняшний день бруцеллез остается социально значимым инфекционным заболеванием, в связи с чем создание соответствующих профилактических средств является актуальной проблемой.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали штамм гибридных клеток *Mus musculus* A1BG9 (2G9) — продуцент моноклональных АИАТ, направленных против иммуноглобулинов, специфичных к ЛПС антигену бруцелл [16].

Биомассу гибридных клеток *Mus musculus* A1BG9 (2G9) — продуцента моноклональных антиидиотипических антител против иммуноглобулинов, специфичных к полисахаридному антигену бруцелл, — находящуюся в ампулах в замороженном (в жидком азоте) состоянии помещали в водяную баню при температуре 36°. После размораживания клетки (1 мл) переносили в центрифужные пробирки объемом 10 мл, добавляли стерильную питательную среду без сыворотки плода коровы (9 мл) и центрифугировали при 95 g в течение 10 мин. Затем клетки еще раз отмывали стерильной средой и осаждали центрифугированием.

После отмывки от консерванта клетки высевали на питательный слой макрофагов. *Приготовление питательного слоя перитонеальных макрофагов* осуществляли следующим образом [17]. В стерильных условиях выделяли макрофаги беспородных мышей и высевали их в матрасы объемом 25 мл (Nunc, Дания). Животных убивали путем цервикальной дислокации, кожные покровы обрабатывали спиртом, шприцем вводили в брюшную полость 10 мл неполной культуральной среды и в течение 5 мин производили раздражение брюшины путем легкого постукивания пинцетом. Затем отбирали суспензию перитонеальных макрофагов из брюшной полости и осаждали клетки центрифугированием при 95 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде из расчета $2 \cdot 10^6$ кл/мл и высевали в матрасы. Клетки выращивали в CO₂-инкубаторе при температуре 37° в атмосфере 5%-ного CO₂. Концентрацию антител в культуральной жидкости определяли по [18].

Клонирование клеток миелом. Для этой цели за 2 дня до клонирования готовили питательный слой из перитонеальных макрофагов. Реклонирование проводили методом лимитирующих разведений по общепринятой методике. Клетки высевали на питательный слой в ячейки 96-луноч-

ного планшета многоканальной пипеткой. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор при температуре 37° в присутствии 5% CO₂. Колонии наблюдали на 5—7 сутки. Затем единичные клоны выращивали в матрасах.

После реклонирования выбирали одиночный клон и культивировали в условиях *in vitro*, затем клетки вводили мышам линии *BALB/c* для получения асцита.

Получение препаративного количества моноклональных антиидиотипических антител. Реклонированные гибридные клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, собирали с матраса и осаждали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл ЗФР и вводили в количестве 1·10⁶ клеток внутривенно мышам линии *BALB/c*, которым за 7—10 дней до введения гибридомы был инъецирован пристан (Sigma, США). После образования асцитной опухоли (через 15—20 дней) мышью умерщвляли, асцитную жидкость собирали из брюшной полости с помощью шприца и отделяли от гибридных клеток центрифугированием при 95 g в течение 10 мин. Гибридные клетки ресуспендировали в неполной ростовой среде и после подсчета их количества вводили в брюшную полость мышам линии *BALB/c* для дальнейшего накопления антител. Асцитную жидкость использовали для выделения из нее иммуноглобулинов. Иммуноглобулины выделяли высаливанием.

Высаливание. К полученной асцитной жидкости добавляли насыщенный раствор сульфата аммония в соотношении 1:1 и оставляли на 12—14 ч при температуре 4° и перемешивании. Затем осадок белков отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 95 g. Осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, по объему равном первоначальному асциту, и подвергали диализу. Очищенные моноклональные антитела хранили при -70° без консерванта или при 4° с добавлением 0,1% азида натрия (Sigma, США).

Диализ. Осадок после высаливания растворяли в 1—2 мл фосфатного буфера и диализовали 3 раза против фосфатно-солевого буфера при температуре 4° в течение 14—18 ч.

Выделенные иммуноглобулины в растворе PBS использовали для ИФА и иммунизации.

Хроматография [19]. В коммерческую микроцентрифужную хроматографическую колонку фирмы Thermo Scientific (США) вносили 400 мкл 25 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,0. Центрифугирование проводили в течение 5 мин при 5000 g; проточный буфер отбрасывали. Процедуру повторяли 2 раза. Затем в колонку вносили 400 мкл образца и центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин; про-

точный буфер отбрасывали. Процедуру проводили двукратно. Колонку промывали добавлением 400 мкл 25 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,0, с последующим центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. Процедуру проводили дважды. Белок элюировали 25 мМ трис-НСl, рН 8,0, содержащим 0,5 М или 1 М NaCl.

Непрямой вариант ИФА. В лунки 96-луночного планшета (Nunc, Дания) вносили ЛПС-антиген по 5 мкг в лунку и инкубировали 16—18 ч при 4°. После промывки и блокировки с помощью БСА в лунки вносили разведения экспериментальных иммунных сывороток мышей и сыворотку неиммунизированной мыши в качестве отрицательного контроля. В качестве положительного контроля использовали сыворотку мыши, иммунизированной ЛПС-антигеном. Реакцию проявляли антивидовым конъюгатом [20].

Получение Fab-фрагментов осуществляли на микроцентрифужных колонках фирмы Thermo Scientific. Колонку с иммобилизованным папаином промывали и уравнивали центрифугированием при 5000 g в течение 1 мин. Затем в центрифужную колонку добавляли 0,5 мл приготовленного образца IgG. Реакцию гидролиза проводили в течении 3—4 ч при 37° и перемешивании. После процедур отмывки полученный препарат Fab-фрагментов очищали на колонке с белком А (Sigma, США) и выделяли с помощью элюирующего буфера при центрифугировании (1000 g).

Иммунизацию мышей линии *BALB/c* с целью получения иммунных сывороток, содержащих антитела АТЗ 2G9, проводили по краткосрочной схеме И.И. Фридлянской [17]. За 7—10 дней до иммунизации мышам вводили пристан. Иммуногены вводили мышам пятикратно — на 1-е, 7-е, 11-е, 12-е и 13-е сутки. На 3-й день после последней иммунизации экспериментальные сыворотки проверяли на наличие антител третьего порядка в непрямом варианте твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированной мыши. Положительным контролем служили сыворотки мышей, иммунизированных ЛПС. Иммунизацию по длительной схеме проводили по В.А. Федоровой [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значимость и перспективность АИАТ и их Fab-фрагментов для создания диагностических, профилактических и лечебных препаратов при различных заболеваниях отмечают многие авторы [1, 3, 7]. В настоящей работе мы исследовали

способность АИАТ и их Fab-фрагментов стимулировать в организме подопытных животных синтез антител третьего порядка (АТЗ).

Для их получения мы испытали краткосрочную схему иммунизации, согласно которой АИАТ и их Fab-фрагменты вводили пятикратно в течение двух недель, а также длительную, при которой иммуноген инъецировали четырехкратно с интервалом в две недели.

В работе В.А. Федоровой с сотр. экспериментальным животным вводили АИАТ в следующих дозах: 0,001 мг; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 мг, из которых эффективной была доза 50 мкг. Авторы предполагают, что дозы АИАТ более 50 мкг ингибируют синтез АТЗ [21, 22].

В данной работе исследуемые антиидиотипические антитела, направленные против иммуноглобулинов, специфичных к липополисахаридному антигену бруцелл, и их Fab-фрагменты инъецировали мышам линии *BALB/c* в дозах 50 и 100 мкг.

На рис. 1 представлены данные иммунизации мышей линии *BALB/c* цельными иммуноглобулинами.

Согласно рис. 1, в случае положительного контроля, где иммуногеном являлся ЛПС-антиген, начиная с первой недели после окончания иммунизации наблюдали высокий титр антител, равный 1:12800. На второй неделе уровень антител снижался до 1:6400. На третьей неделе титр АТЗ в положительном контроле составлял 1:3200 и сохранялся на этом уровне в течение последующего срока наблюдения.

При введении АИАТ в дозе 100 мкг титр АТЗ в течение первых двух недель был на уровне 1:6400, на третьей неделе титр снижался до 1:1600, а на четвертой неделе наблюдалось резкое снижение титра до 1:200.

Иммунизация лабораторных животных АИАТ в дозе 50 мкг стимулировала иммунную систему на выработку АТЗ с титром 1:3200 на первой неделе наблюдения. В течение второй и третьей недель титр искомым антител повысился до уровня 1:6400, а затем постепенно снижался до 1:3200 на четвертой неделе, до 1:1600 на пятой неделе и до 1:200 на шестой неделе (см. рис. 1).

Аналогичный эксперимент с использованием в качестве иммуногена Fab-фрагментов АИАТ показал сходную эффективность дозы 50 мкг (рис. 2).

Иммунизация фрагментами в дозе 50 мкг стимулировала выработку АТЗ с титром 1:1600 в организме подопытных животных на первой неделе после окончания срока иммунизации. Максимальное значение уровня АТЗ наблюдалось на вто-

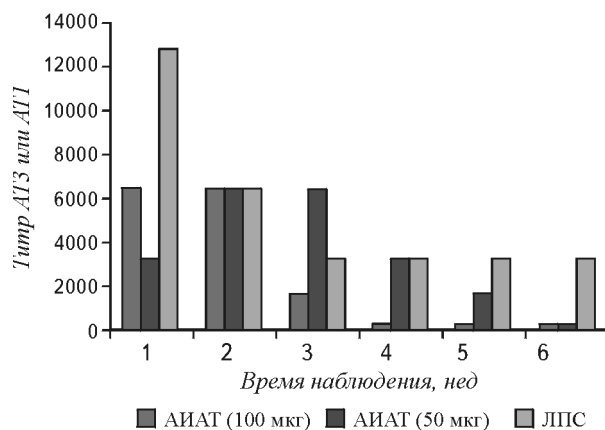


Рис. 1. Динамика индукции АТЗ у мышей в зависимости от дозы АИАТ; ЛПС — положительный контроль

рой и третьей неделях — 1:6400. Титр антител на четвертой неделе также был достаточно высоким и составлял 1:3200, а на пятой и шестой неделях он снизился до 1:800 (см. рис. 2).

При иммунизации Fab-фрагментами в дозе 100 мкг максимальный титр антител АТЗ составил 1:3200, наблюдался с первой недели и сохранялся на данном уровне в течение четырех недель. На пятой и шестой неделях он снизился до 1:400. На основании данных результатов можно также отметить, что оптимальной дозой для продукции АТЗ мышами является 50 мкг иммуногена.

Сравнение результатов иммуногенной активности АИАТ и их Fab-фрагментов при краткосрочной схеме иммунизации в дозе 50 мкг выявило следующую динамику синтеза АТЗ (рис. 3). При иммунизации АИАТ на первой неделе титр антител составил 1:3200, в то время как в случае с Fab-фрагментами наблюдался титр 1:1600. В тече-

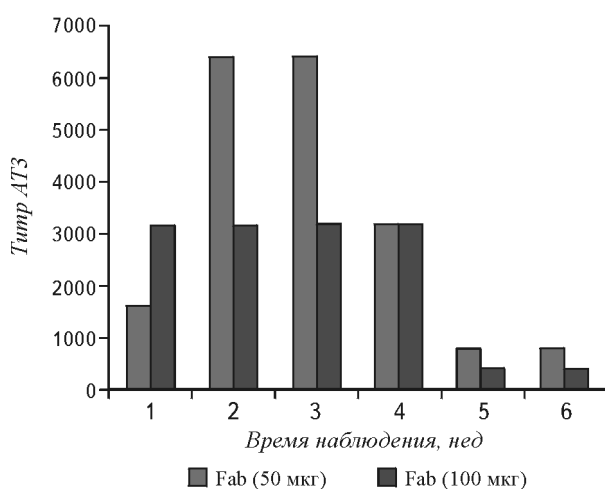


Рис. 2. Динамика индукции АТЗ у мышей в зависимости от дозы Fab-фрагментов

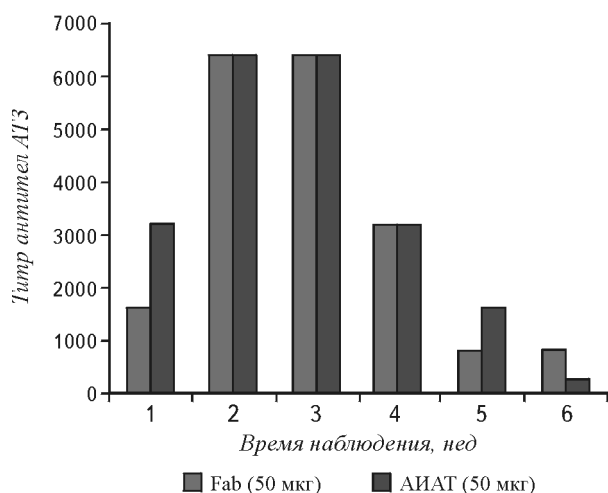


Рис. 3. Динамика индукции АТЗ у мышей в зависимости от иммуногена

ние последующих двух недель динамика выработки АТЗ в организме подопытных животных в обоих случаях была одинаковой и АТЗ определялись в титре 1:6400. На четвертой неделе в обоих случаях произошло одинаковое снижение титра антител до 1:3200. Начиная с пятой недели отмечалось различие в динамике выработки АТЗ. Так, при использовании в качестве иммуногена АИАТ титр составил 1:1600, который затем резко снизился на 6-й неделе до 1:200. В случае с Fab-фрагментами на пятой и шестой неделях титр АТЗ составлял 1:800 (см. рис. 3). На седьмой неделе АТЗ определялись только в сыворотках мышей, иммунизированных АИАТ (данные не приведены).

Таким образом, можно заключить, что оба исследованных иммуногена — цельные иммуноглобулины и их Fab-фрагменты — способны индуцировать иммунный ответ, т.е. стимулируют синтез АТЗ, гомологичных АТ1, которые вырабатыва-

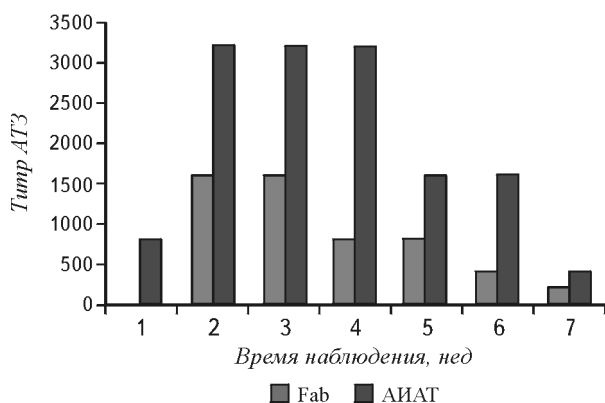


Рис. 4. Результаты длительной иммунизации мышей АИАТ и их Fab-фрагментами

ются в ответ на введение нативного ЛПС-антигена. Титр АТЗ при иммунизации цельными иммуноглобулинами сохранялся в сыворотках мышей в течение 5 нед после иммунизации, а при использовании Fab-фрагментов — в течение 6 нед. Принципиальной разницы в иммуногенных свойствах между АИАТ и их фрагментами не обнаружено.

Во время длительной иммунизации иммуногены вводили в организм подопытных животных 4-кратно с интервалом в 2 нед (рис. 4).

Исследование в ИФА иммунных сывороток, полученных в ходе длительной иммунизации, также свидетельствует об иммуногенности исследуемых препаратов. В данном случае иммунный ответ против цельных иммуноглобулинов (АИАТ) регистрировался начиная с первой недели после окончания иммунизации; титр АТЗ составил при этом 1:800.

В течение последующего срока наблюдения уровень антител повышался до титра 1:3200 на второй неделе и сохранялся на данном уровне в течение третьей и четвертой недель. На пятой и шестой неделях титр АТЗ составлял 1:1600 и наименьшего значения достиг на седьмой неделе — 1:400.

В случае иммунизации Fab-фрагментами на первой неделе исследования антитела в иммунной сыворотке обнаруживались, но титр их был крайне низким. На второй и третьей неделях АТЗ определялись на одном уровне с титром 1:1600. На четвертой—пятой неделе титр АТЗ снизился до 1:800, а на шестой—седьмой неделе — до 1:400—1:200.

Результаты тестирования иммунных сывороток, полученных при длительной и краткосрочной иммунизации показали, что несколько более эффективной была иммунизация цельными иммуноглобулинами, чем их фрагментами (рис. 5).

Как показано на рис. 5, высокие значения титра АТЗ наблюдались при краткосрочной (кр) иммунизации — 1:6400, при использовании в качестве иммуногена как АИАТ, так и их Fab-фрагментов. При длительной иммунизации (дл) титр АТЗ в случае АИАТ в течение трех (со второй по четвертую) недель находился на уровне 1:3200. Достаточно высокий титр антител 1:1600 сохранялся также на пятой и шестой неделях, что указывает на стабильный иммунный ответ.

На основе полученных результатов можно сделать заключение, что и АИАТ и Fab-фрагменты обладают иммуностропным действием на организм подопытных животных.

Таким образом, анализ результатов показывает, что и цельные АИАТ и их фрагменты обладают иммуногенной способностью. Значения титра АТЗ

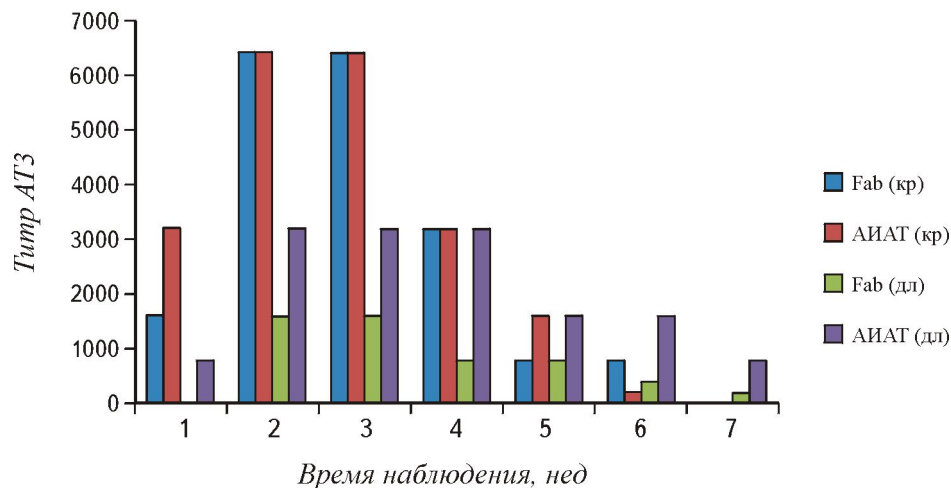


Рис. 5. Сравнительный анализ титра иммунных сывороток при краткосрочной и длительной иммунизации мышей АИАТ и их Fab-фрагментами в дозе 50 мкг

в сыворотках мышей, полученных при иммунизации АИАТ и их Fab-фрагментами (1:3200—1:6400) были ниже, чем при использовании ЛПС-антигена — 1:12800, что не снижает научно-практической ценности АИАТ и их Fab-фрагментов в качестве агентов для лечения и профилактики бруцеллеза. Особым преимуществом данных иммуногенов является их иммуноглобулиновая природа, которая обеспечивает безопасность и эффективность потенциальных иммунологических средств на их основе.

Результаты получены в ходе выполнения проекта «Изучение свойств антиидиотипических антител как основы для разработки новых диагностических и профилактических биопрепаратов» в рамках бюджетной программы МОН РК за 2011—2014 г.

Получено 18.06.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Ярыгина Е.И. К проблеме вируса болезни Марека. Применение поли- и моноклональных антител для выявления структурных белков вируса болезни Марека / Е.И. Ярыгина, В.А. Лукина, Б.В. Соловьев, А.Я. Самуйленко, И.В. Бобровская, И.В. Румянцева, Л.А. Скороходова, Р.Р. Климова, О.В. Масалова, А.А. Куш // Вестник РАСХН. — 2001. — № 5. — С. 67—70.
2. He, Qian-ni. Influence of different immune processes on the efficiency of anti-idiotypic antibodies against Marek's disease virus / Quan-ni He, Qi Zhong, Bing Zhao, Rong-qi Chen, Weidong Zhao, Wen-xi Gu // J. Xinnijiang Agr. Univ. — 2005. — N 3. — P. 71—73.
3. Tomoko, K. Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking antibody — and receptor-binding sites on hepatitis A virus / K. Tomoko, T. Atsuko, Y. Tetsuo, I. Koji, I. Toshihiro, W. Takaji // Arch. Virol. — 2009. — V. 154. — N 8. — P. 1263—1269.
4. Йонах Н., Суисса Д., Бельзер И., Антонетти Ф., Смоларски М., Дреано М. Моноклональные антитела к растворимому рецептору липопротеинов низкой плотности человека, способы их получения и применения и гибридомы, продуцирующие указанные антитела // Патент Нидерландов 007494, C07K 16/28, G01N 33/577. 2006.
5. Еспанов Ж.У. Применение антиидиотипических антител для ранней прижизненной диагностики оводовых болезней лошадей // Вестник науки. — 1994. — № 9. — С. 81—85.
6. Шабдарбаева Г.С. Иммунобиологические аспекты излечения антиидиотипических антител в трипананомозе животных: Мат. междунар. конф. «Современное состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов». — Алматы, 2006. — С. 271—277.
7. Wei, Li. Anti-idiotypic (Id) antibodies can be used to induce specific cellular immune responses against tumor antigens / Li Wei, Cui Heng, Meng Fan-Qiang, Chang Xiao-Hong, Zhang Guo, Liu Bei, Li Zi-Hai // Cancer Immunol, Immunother. — 2008. — V. 57. — N 2. — P. 143—154.
8. Карсельер А., Роседь Э., Гомес А., Адан Х., Пьюлатс Х. Антиидиотипические антитела, которые индуцируют иммунный ответ против рецептора эпидермального фактора // Патент Испании 96109830, A61K39/395, C07K16/22, C07K16/46. 1998.
9. Пантелеев Д.Ю., Шейн Ю.Г. // Способ получения антиидиотипической сыворотки для диагностики злокачественных опухолей // Патент РФ 2205410, G01N 33/96. 2003.
10. Lemke, H., Tanasa, R.I., Trad, A., Lange, H. Function of Maternal Idiotype and anti-idiotypic antibodies as transgenerational Messengers: Mat. Fetal Transmission of Human Viruses and their Influence on Tumorigenesis. — Spinger Netherlands, 2012. — P. 249—279.
11. Тер-Григоров В.С. Способ лечения лейкоза с аутоиммунными проявлениями, индуцированного в эксперименте // Патент РФ 2085215, A61K 39/44. 1997.

12. Хауэл М., Бростофф С., Карло Д. Вакцина для профилактики или лечения опосредованной Т-клетками патологии или нерегулируемой репликации клонами Т-клеток, способ выделения вакцины, способ диагностирования или прогнозирования восприимчивости к ревматоидному артриту или рассеянному склерозу, способ профилактики или лечения ревматоидного артрита или рассеянного склероза и содержащий последовательность sgdqggne пептид, являющийся агентом для обнаружения, профилактики или лечения рассеянного склероза // Патент РФ 2138512, А61К 39/00. 1999.
13. Францев А.П., Францева И.А. Способ коррекции иммунного состояния организма при сахарном диабете // Патент Казахстана 17061, А61К 39/395. 2010.
14. Uttenreuther-Fischer, M., Krueger, J. Препарат человеческого происхождения для вакцинации против gd2- позитивных опухолей // Патент Германии 10059930, А61К 39/395. 2002.
15. Leung Shui-On; Losman, M.J., Hansen, H. Способ гуманизации антиидиотипического антитела против канцероэмбрионального антигена и применение антитела как противораковой вакцины для получения направленности // Патент США 6730300, 61К 39/395. 2004.
16. Оспанова С.Г., Булашев А.К., Сурашиев Ж.А., Серикова Ж., Бокаева А.Б. Штамм гибридных, культивируемых клеток животных *Mus musculus* L., используемый для получения моноклональных антиидиотипических антител к иммуноглобулинам против антигенов бруцелл // Патент Республики Казахстан 2009/0083.1. 2011.
17. Фридлянская И.И. Получение моноклональных антител (гибридная технология). Методы культивирования клеток. — Л.: Наука, 1987. — С.194—205.
18. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72. — P.248—254.
19. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.:Наука, 1981. — 288 с.
20. Куц А.А. Антиидиотипические антитела к вирусу простого герпеса типа 1 нейтрализуют инфекционную активность вируса / А.А. Куц, Т.А. Посевая, В.И. Симонов // Вопросы вирусол. — 1991. — № 4. — С.312—314.
21. Федорова В.А. Разработка экспериментальной иммуноглобулиновой тест-системы на основе антиидиотипиче-

ских иммуноглобулинов для определения специфических противочумных антител в сыворотках людей, привитых живой чумной вакциной EV НИИЭГ / В.А.Федорова, З. Девдариани // Клин. лабораторная диагностика. 2006. — № 4. — С.54—56.

22. Федорова В.А. Перспективы создания антиидиотипических экспериментальных вакцин против чумы / В.А.Федорова, З. Девдариани // Инф. иммунол. — 2006. — № 3. — С. 144—148.

S.G. OSPANOVA*, and A.B. BUKKEEVA

The Seifullin Kazakhstan Agrarian University, 010000, Astana Kazakhstan

e-mail: sgo5@mail.ru

Immunogenic Properties of Anti-Idiotypic Antibodies and their Fab Fragments with Specificity to Immunoglobulins against *Brucella* Lipopolysaccharide

BALB/c mice have been immunized by 50 or 100 µg of monoclonal anti-idiotypic antibodies (AIB) specific immunoglobulins to *Brucella* lipopolysaccharide antigen and their Fab-fragments on 1st, 7th, 11th, 12th and 13th days in amounts of 50 µg and 100 µg. After that, the titers of AT3 and AT1 specific antibodies were determined in mice in the variants of immunization by AIB or LPS, respectively. The other scheme implied for the four-time immunization by 50 µg of the antigen with two-week intervals. It was established that 50 µg was an optimal dose for the immunization by AIB. When monoclonal anti-idiotypic antibodies were used as immunological reagents, the titers of immune sera were 1:6400, whereas using the *Brucella* lipopolysaccharide antigen, the titer of sera was 1:12800. Thus, it was demonstrated that the monoclonal anti-idiotypic antibodies and their Fab-fragments induce immune response to the lipopolysaccharide antigen.

Key words: anti-idiotypic antibodies, ELISA, Fab-fragments, immunogen.

* Author for correspondence.