

Филиал Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки
Института Биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук

На правах рукописи

КАРАТОВСКАЯ АННА ПЕТРОВНА

**ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
AlpA И AlpB, СЕКРЕТИРУЕМЫХ *LYSOBACTER* SP. XL1**

03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат химических наук
Н.В. Руденко

Пушино 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. ГИБРИДОМНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ.....	11
1.2. СВОЙСТВА, ОПРЕДЕЛИВШИЕ ШИРОКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МА.....	14
1.3. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ МА.....	16
1.3.1. Гуманизация МА.....	16
1.3.2. Примеры терапевтических МА.....	18
1.3.3. Иммунотоксины.....	20
1.4. Использование МА в диагностике.....	21
1.4.1. Принцип ИФА.....	22
1.4.2. Форматы ИФА.....	23
1.4.3. Иммунохроматографический анализ.....	25
1.5. МА КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ НАУКЕ.....	26
1.5.1. МА для очистки молекул и протеомики.....	26
1.5.2. МА в вирусологии.....	28
1.5.3. МА в биохимии рецепции.....	29
1.5.4. МА в изучении иммунной системы.....	31
1.5.5. МА в энзимологии.....	32
1.6. ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИНОВЫХ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB, СЕКРЕТИРУЕМЫХ <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1.....	34
1.6.1. Бактерия <i>Lysobacter</i> sp. XL1.....	34
1.6.2. Сериновые эндопептидазы AlpA и AlpB.....	38
1.6.3. Лизоамидаза.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. НЕПРЯМОЙ ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ.....	44
2.2. ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C ПРОПЕПТИДАМИ И ЗРЕЛЫМИ ФОРМАМИ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB <i>LYSOBACTER</i> SP.XL1.....	44
2.3. ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C ПЕПТИДАМИ ИЗ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ AlpB <i>LYSOBACTER</i> SP.XL1.....	46
2.3.1. Конъюгирование пептидов с KLH.....	46
2.3.2. Иммунизация конъюгатами пептидов с KLH.....	46

2.4. ПОЛУЧЕНИЕ МА ПРОТИВ ПРОПЕПТИДОВ И ЗРЕЛЫХ ФОРМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB <i>LYSOBACTER SP.XL1</i>	47
2.4.1. Приготовление фидерного слоя макрофагов мыши.....	47
2.4.2. Культивирование клеток мышинной миеломы SP2/0.....	48
2.4.3. Замораживание клеток	48
2.4.4. Получение иммунных спленоцитов мыши	49
2.4.5. Гибридизация клеток миеломы и лимфоцитов	49
2.4.6. Культивирование первичных гибридом в среде ГАТ	50
2.4.7. Клонирование гибридом методом лимитирующих разведений	50
2.4.8. Нарботка МА в асцитной жидкости мышей линии Balb/C	51
2.4.9. Определение типов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов	51
2.4.10. Очистка МА из асцитной жидкости методом аффинной хроматографии на белок А-агарозе	51
2.4.11. Определение концентрации белков	52
2.4.12. Определение $K_{афф}$ иммуноглобулинов	52
2.5. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ФОРМЫ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ AlpA	53
2.6. «СЭНДВИЧ»–ИФА НА ОСНОВЕ МА К ПРОПЕПТИДАМ И ЗРЕЛЫМ ФОРМАМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB	53
2.6.1. Конъюгирование антител с биотином.....	53
2.6.2. «Сэндвич»–ИФА.....	53
2.7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ	55
2.8. ИММУНОБЛОТТИНГ	55
2.9. ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ <i>LYSOBACTER SP. XL1</i>	55
2.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	57
3.1. ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ ГИБРИДОМНЫХ КЛОНОВ–ПРОДУЦЕНТОВ МА К ПРОПЕПТИДАМ И ЗРЕЛЫМ ФОРМАМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB <i>LYSOBACTER SP. XL1</i>	57
3.1.1. Получение и характеристика МА к ProA и ProB.....	57
3.1.1.1. Получение МА к пропептидам.....	57
3.1.1.2. Иммунохимическая характеристика МА к пропептидам.....	59
3.1.2. Получение и характеристика МА к зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB	64
3.1.2.1. Получение МА к зрелой форме AlpA.....	64

3.1.2.2. Получение МА к зрелой форме AlpB	65
3.1.2.3. Иммунохимическая характеристика МА к зрелым формам	68
3.2. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОПЕПТИДОВ И ЗРЕЛЫХ ФОРМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1 НА ОСНОВЕ ПОЛУЧЕННЫХ МА	71
3.2.1. Разработка тест–систем для количественного определения ProA, ProB и зрелой формы эндопептидазы AlpA.....	73
3.2.2. Разработка тест–системы для количественного определения зрелой формы эндопептидазы AlpB.....	79
3.3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА «СЭНДВИЧ»–ИФА ProA, ProB И ЗРЕЛЫХ ФОРМ AlpA И AlpB <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1 В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ	81
3.3.1. Определение в культуральных жидкостях.....	81
3.3.2. Определение в клеточных фракциях	83
3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ AlpA И AlpB В КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1 МЕТОДОМ ИММУНОБЛИТТИНГА	85
3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ AlpA И AlpB В ЛИЗОАМИДАЗЕ	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	92
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	119
БЛАГОДАРНОСТИ	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

MA – моноклональные антитела;

MA_{bio} – биотинилированные формы моноклональных антител;

ProA – пропептид эндопептидазы AlpA;

ProB – пропептид эндопептидазы AlpB;

PreAlpA – предшественник AlpA;

PreAlpB – предшественник AlpB;

ИФА – иммуноферментный анализ;

ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ;

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий 150 мМ NaCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄;

PBST – PBS, содержащий 0,1% Tween 20;

ПАФ – полный адъювант Фрейнда;

НАФ – неполный адъювант Фрейнда;

ГАТ – селективная среда, содержащая 0,1 мМ гипоксантин, 0,4 мкМ аминоптерин, 16 мкМ тимидин;

ГТ – селективная среда, содержащая 0,1 мМ гипоксантин и 16 мкМ тимидин;

KLH – гемоцианин улитки (*keyhole limpet hemocyanin*);

K_{афф} – константа аффинности антител;

DMCO – диметилсульфоксид;

ТХУ – трихлоруксусная кислота;

SDS – додецилсульфат натрия;

FCS – эмбриональная сыворотка телёнка (*fetal calf serum*);

DMEM – ростовая питательная среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Моноклональные антитела (МА) являются важнейшим инструментом исследований в биохимии, молекулярной биологии и медицине. МА широко применяются в научной практике, так как позволяют идентифицировать распределение молекул как в организме в целом, так и в отдельной клетке и её компартментах, выявлять чужеродные антигены, получать гомогенные препараты исследуемых веществ и т. п. Успех применения МА обусловлен направленностью против конкретного уникального участка исследуемого вещества – антигенной детерминанты. В настоящее время МА используются для решения как фундаментальных, так и биотехнологических проблем.

В данной работе МА были применены для разработки методов количественного определения молекулярных форм литических ферментов AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 и изучения их распределения внутри и за пределами клетки. Ферменты входят в состав антимикробного препарата лизоамидаза, получаемого из культуральной жидкости бактерии. AlpA и AlpB – наиболее охарактеризованные внеклеточные литические ферменты *Lysobacter* sp. XL1, представляющие собой гомологичные (61,5%) (Муранова *и др.*, 2004; Lapteva *et al.*, 2012) низкомолекулярные (22 и 24 кДа) термостабильные белки. Демонстрируя различный спектр антимикробной активности, AlpA и AlpB гидролизуют пептидогликан клеточной стенки микроба – мишени, разрушая пептидные глицин-глициновые мостики и амидную связь между L-аланином и сахарным остовом (Бегунова *и др.*, 2003; Кудрякова 2017).

Ферменты AlpA и AlpB относятся к сериновым протеазам и синтезируются в виде предшественников. Аминокислотные последовательности PreAlpA и PreAlpB состоят из последовательностей сигнальных пептидов, N-концевых пропептидов и зрелых частей, которые превращаются в активные формы в процессе созревания и секреции (Lapteva *et al.*, 2012). Сигнальный пептид обеспечивает транслокацию синтезированной полипептидной цепи через цитоплазматическую мембрану в периплазму. Пропептид в составе предшественника удерживает зрелую часть в неактивном состоянии. В результате отщепления пропептида формируется протеолитически активная пространственная структура зрелой части. Несмотря на гомологию первичной структуры, общий принцип синтеза и тип секреции, ферменты AlpA и AlpB по-разному попадают в окружающую среду. Фермент AlpA предположительно секретруется также как, и гомологичная ему α -литическая протеаза *Lysobacter enzymogenes* (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*, 1992;

Vasilyeva *et al.*, 2014). Секреция фермента AlpB осуществляется посредством внешнемембранных везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008; Kudryakova *et al.*, 2015, 2016).

В последнее время достигнуты большие успехи в изучении секреции белков в окружающую среду, однако, остаются открытыми некоторые вопросы: где и когда происходит полное отщепление пропептидов исследуемых ферментов, где происходит окончательное созревание функционально активных форм – в периплазме или в процессе транслокации через внешнюю мембрану. МА, являясь специфичным инструментом исследования, направленным на различающиеся участки близких по структуре исследуемых гомологичных белков, могут помочь приблизиться к решению этих вопросов.

Ферменты, секретируемые *Lysobacter* sp. XL1, являются основой ферментного антимикробного комплекса лизоамидазы и могут быть использованы для создания современных антимикробных препаратов, не вызывающих привыкания патогенов, в отличие от антибиотиков. Разработанные в данной работе методы количественного определения эндопептидаз AlpA и AlpB на основе МА, позволят стандартизовать лизоамидазу.

Работа представляется актуальной, так как иммунохимическое изучение топографии молекулярных форм литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1, позволит приблизиться к пониманию особенностей их секреции. Результаты работы могут иметь и прикладное значение при разработке новых антимикробных препаратов, не приводящих к появлению резистентности, на основе секретируемых литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

Цель работы – разработка методов иммунохимической идентификации и количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Получить неперекрестные МА против пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB.
2. Разработать на основе полученных МА тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА для количественного определения пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB.
3. Детектировать молекулярные формы AlpA и AlpB иммуноблоттингом и определить их количественное содержание разработанными «сэндвич»–ИФА в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1.

4. Апробировать разработанные методы определения количественного содержания ферментов AlpA и AlpB в лизоамидазе.

Научная новизна

Получены представительные коллекции гибридных клеток – продуцентов МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

Высокая аффинность и специфичность (отсутствие иммуноперекрестной реактивности) позволило эффективно использовать МА в качестве инструмента для иммунохимического исследования эндопептидаз AlpA и AlpB.

Разработаны высокочувствительные тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА на основе МА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

Количественное определение содержания молекулярных форм AlpA и AlpB «сэндвич»–ИФА и их детекция иммуноблоттингом в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1 показали, что AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве.

Научно–практическая значимость работы

С помощью разработанных тест–систем на основе МА возможны стандартизация и проведение контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов, секретируемых грамотрицательной бактерией *Lysobacter* sp. XL1 – лизоамидазы и препаратов, разрабатываемых в настоящее время с использованием рекомбинантных штаммов–продуцентов.

Впервые метод «сэндвич»–ИФА использован для количественной оценки содержания ферментов AlpA и AlpB и их молекулярных форм в различных компартментах клетки.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Представительные коллекции гибридных клеток – продуцентов высокоаффинных неперекрестных МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB.
2. Высокочувствительные тест–системы на основе МА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB.
3. Детекция и количественная оценка содержания молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB в различных компартментах клетки.

4. Стандартизация и контроль качества лизоамидазы и препаратов, разрабатываемых с использованием рекомбинантных штаммов–продуцентов.
5. В периплазме происходит окончательное созревание ферментов AlpA и AlpB.
6. В окружающую среду зрелые формы ферментов AlpA и AlpB секретируются без пропептидов, уровень секреции AlpA превышает AlpB.

Методы исследования

В работе применялись современные биохимические методы: гибридная технология; ИФА в непрямом и «Сэндвич» форматах; иммуноблоттинг; электрофорез в денатурирующих условиях; аффинная хроматография; культивирование бактерий.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена объемом экспериментального материала, а также использованием соответствующих компьютерных программ.

Личный вклад автора

Получение неперекрестных МА к пропептидам и зрелым формам литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1; проведение иммунохимической характеристики МА к пропептидам и зрелым формам AlpA и AlpB; наработка МА *in vivo* и *in vitro*; очистка МА; создание тест–систем в варианте «сэндвич»–ИФА на основе полученных МА; количественная оценка содержания пропептидов и зрелых форм AlpA и AlpB в исследуемых препаратах; установление локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB в клетках *Lysobacter* sp. XL1 иммуноблоттингом, выполнялись лично автором.

Микробиологические и биохимические этапы работы, связанные с культивированием и получением клеточных фракций бактерии *Lysobacter* sp. XL1, получение рекомбинантных белков проводились в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино (заведующая лабораторией к.б.н. Васильева Н.В).

Соискатель принимал непосредственное участие в интерпретации и обсуждении всех полученных результатов, в оформлении публикаций и их подаче.

Связь с государственными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 13–04–00644) и программы УМНИК (государственный контракт № 9840ГУ2/2015).

Апробация работы и публикации

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Международная конференция «БИОЛОГИЯ – НАУКА 21 ВЕКА» (Пушино 2015, устный доклад); Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология» (Тула 2013, 2014, 2015, устные доклады); Седьмая региональная научно–практическая конференция «Молодежные научно–инновационные проекты Московской области» (п. Дубровицы 2014, устный доклад); XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии» (Москва 2013, постер); XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии» (Москва 2015, постер); XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии» (Москва 2016, постер).

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 26 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 305 источников отечественной и зарубежной литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ГИБРИДОМНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Иммунная система позвоночных защищает организм от разнообразных чужеродных веществ, в том числе и патогенов. Основным компонентом иммунного ответа является антитело, имеющее сайт связывания чужеродных структур. Для эффективной защиты организма иммунная система должна быть способна образовывать практически безграничное количество антител, взаимодействующих с таким же безграничным многообразием молекулярных структур: вирусов, бактерий, паразитических организмов, а также узнающих их многочисленные мутированные формы. Гибридная технология позволяет из этого многообразия антител получить целевой продукт с высокоспецифической направленностью (Boyd *et al.*, 1989; Shoyama *et al.*, 1999).

Метод получения МА – гибридная технология – является частью клеточной инженерии. Гибридная технология, разработанная в 1975 г. Кёлером и Мильштейном (Köhler *et al.*, 1975), имела революционное значение в иммунологии, молекулярной биологии и медицине. Благодаря гибридомам возникли новые методы диагностики различных заболеваний, открылись пути для победы над злокачественными опухолями и другими ранее неизлечимыми болезнями. Несмотря на то, что технология получения гибридом относится к гениальным изобретениям, а не к научным открытиям, за которые присуждают Нобелевские премии, Кёлер и Мильштейн, в 1984 г. стали лауреатами Нобелевской премии.

Исходно каждый В–лимфоцит синтезирует антитела только одного вида и специфичности, в культуре В–лимфоциты совершают ограниченное число делений и быстро погибают. Чтобы получить идентичные по своей структуре и специфичности антитела (МА), необходимо выделить из организма животного лимфоциты, продуцирующие антитела, и иммортализовать их, т.е. сделать способными к бесконечному количеству делений. Иммортализация осуществляется путем слияния лимфоцитов с опухолевыми клетками. Линия клеток, представляющих собой продукт слияния В-лимфоцита и опухолевой клетки, называется гибридомой. Гибридомы приобретают от В–лимфоцита способность продуцировать антитела необходимой специфичности, а от миеломной клетки – способность к продолжительному росту и делению в культуре (Köhler *et al.*, 1975). Гибридома способна секретировать антитела, абсолютно одинаковые по своим свойствам (строение, аффинитет, специфичность). Антитела, продуцируемые линией гибридных клеток, называются моноклональными. Схема гибридной технологии представлена на рисунке 1.

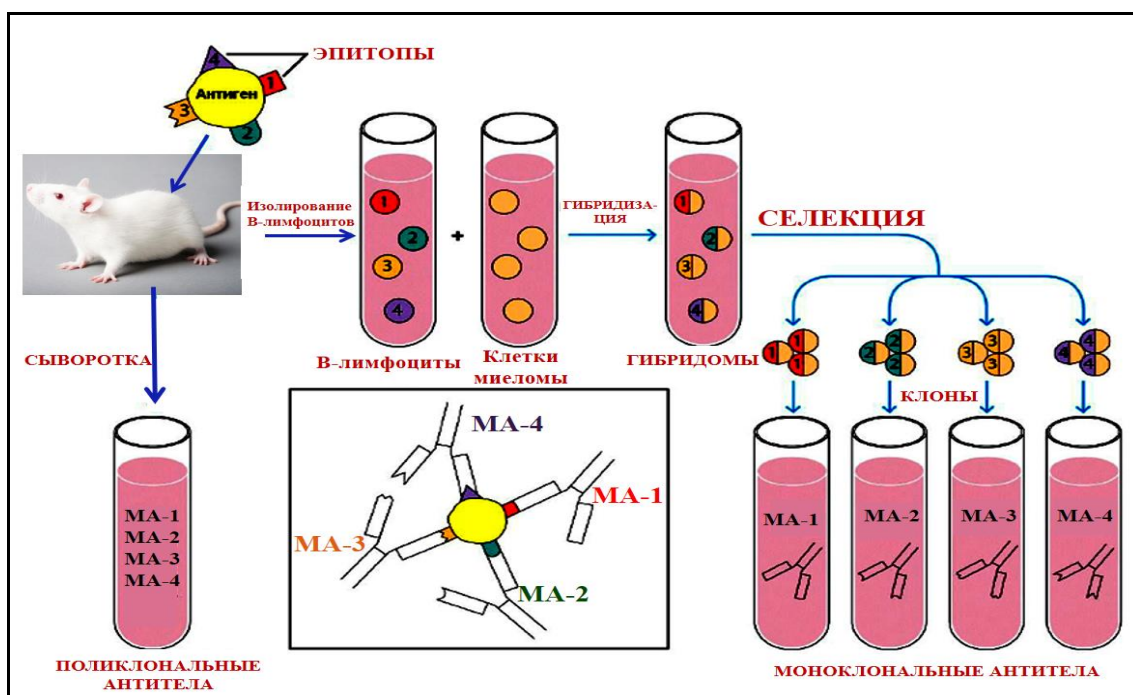


Рис. 1. Гибридомная технология, принципиальная схема (Абелев 1998).

Ее реализация начинается с иммунизации экспериментальных животных антигеном, против которого предполагается получить антитела. Иммуногенами могут быть препараты очищенных макромолекул, их различные смеси, а также целые клетки или субклеточные структуры. После достижения в сыворотке крови достаточного количества антител (необходимого титра) селезенку или лимфоузлы иммунизированных животных используют в качестве источника В–лимфоцитов, секретирующих искомые антитела (Kohler *et al.*, 1975).

В присутствии фьюзогена – агента, разжижающего клеточные мембраны, свежeweделенные лимфоциты селезенки сливают с опухолевыми клетками животного того же вида, способными к неограниченному делению. Чаще всего в качестве фьюзогена используют полиэтиленгликоль. Опухолевые клетки должны обладать развитым эндоплазматическим ретикулумом, не синтезировать иммуноглобулины, кодируемые их собственными генами, иметь чувствительность к селектирующему агенту (аминоптерину или азасерину). Для удаления из гибридизационной смеси опухолевых клеток, не слившихся с лимфоцитами, был получен особый мутант мышинной плазмоцитомы, чувствительный к селектирующему агенту, рост которого контролировался составом питательной среды. Известно, что имеются основной и резервный пути синтеза предшественников нуклеиновых кислот. Основной путь синтеза нуклеотидов блокируется противоопухолевым веществом аминоптерин, который является антагонистом фолиевой

кислоты. Фолиевая кислота в свою очередь является коферментом при биосинтезе пуринов и пиримидинов. Аминоптерин, конкурентно ингибируя, предотвращает синтез, как пуринов, так и пиримидинов. Однако в присутствии аминоптерина клетки не гибнут, так как обладают резервным путём – способностью синтезировать нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, используя продукты распада ранее синтезированных нуклеиновых кислот: гипоксантина и тимидина. Добавление гипоксантина и тимидина в питательную среду, содержащую аминоптерин, снимает токсический эффект последнего. Для селекции гибридом был получен мутант плазмоцитомы, не способный пользоваться резервным путём и, следовательно, погибающий в среде ГАТ, содержащей гипоксантин, тимидин и аминоптерин. Данный мутант, резистентный к 8-азагуанину, был получен путём добавления в среду токсических аналогов гипоксантина и тимидина (Kohler *et al.*, 1975).

Гибридные клетки (гибридомы) отделяют от исходных опухолевых клеток на селективной питательной среде ГАТ. Гены гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы и тимидинкиназы, необходимые для роста клеток на селективной среде, гибридомы получают в результате слияния от В-лимфоцитов селезёнки. Сами же клетки селезёнки недолго сохраняют свою жизнеспособность в культуре и спонтанно погибают (Bartal & Hirshaut 1987).

Полученные гибридомные клоны можно заморозить и длительно хранить в жидком азоте. Гибридомы можно культивировать и накапливать антитела в культуральной среде, что часто осуществляют в специальных аппаратах, приспособленных для наращивания клеточных культур в препаративных количествах (Galfre *et al.*, 1981). Для препаративной наработки МА гибридомы также культивируют *in vivo* в виде асцитных опухолей (Hendriksen *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1999a). Для этого гибридомы вводят внутрибрюшинно мышам-реципиентам, в брюшной полости которых накапливается асцитная жидкость, содержащая большое количество МА (Brodeur *et al.*, 1986; Jackson *et al.*, 1999b). Отмечено, что непродолжительное культивирование *in vivo* в дальнейшем способствует стабилизации клеточных линий, продуцирующих МА (de Geus *et al.*, 1998). Полученные охарактеризованные клоны гибридом являются источником неограниченного количества МА заданной специфичности. Препараты МА не содержат посторонних антител и настолько однородны, что могут рассматриваться как чистые химические реагенты (Shivanand 2010).

Современные генно-инженерные методы позволяют экспрессировать легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, как индивидуальные белки, создавать разнообразные антиген связывающие фрагменты антител, а также изменять свойства антител, такие как:

аффинность, число и специфичность паратопов (эпитоп–связывающих участков), состав доменов, подвижность молекулы, пространственную ориентацию участков связывания с антигеном, молекулярный вес, изоэлектрическую точку и потенциальную иммуногенность.

В настоящее время получение МА стало прибыльным коммерческим направлением биотехнологии. Производство МА является быстро развивающимся сегментом фармацевтической индустрии, составляющим третью часть всех биотехнологических продуктов. Получено и находятся в разработке огромное число МА, с помощью которых решены и продолжают решаться многие принципиальные проблемы различных отраслей биологических знаний.

1.2. СВОЙСТВА, ОПРЕДЕЛИВШИЕ ШИРОКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МА

Антитела являются одним из наиболее распространенных инструментов современной биохимии, цитологии и клинической медицины. С их помощью можно проводить качественное и количественное определение различных веществ, изучать внутри– и внеклеточную локализацию молекул, исследовать распределение и уровень экспрессии белков в различных клетках организма методами иммуногистохимии, иммуноцитохимии, иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга и др. Антитела также могут быть использованы для сортировки клеток методом проточной цитометрии и для очистки белков (Engvall *et al.*, 1971; Van *et al.*, 1971; Towbin *et al.*, 1979; Koivunen *et al.*, 2006). Широкое употребление МА обусловлено их уникальными свойствами.

МА вырабатываются иммунными клетками одного клеточного клона, то есть происходят из одной плазматической клетки–предшественницы. МА направлены только против одного конкретного эпитопа иммуногенного вещества. Эпитоп, или антигенная детерминанта, обычно представляет собой 5 – 12 аминокислотных остатков, расположенных последовательно (конформационно–независимый эпитоп) или сближенных в пространственной структуре (конформационно–зависимый эпитоп). Антитела могут быть образованы против любого участка белка, как экспонированного на поверхности, так и находящегося внутри белковой глобулы, образующегося в результате денатурации. В связи с этим к антигену с несколькими эпитопами можно получить столько МА, сколько имеется антигенных детерминант, и отобрать клоны, секретирующие МА только одной нужной специфичности (Galfre 1977). МА идентичны по своему строению, относятся к одному и тому же классу, изотипу, аллотипу иммуноглобулинов, имеют одинаковую структуру участка, связывающегося с лигандом, обладают одинаковой специфичностью и аффинностью.

Специфическое взаимодействие «антиген – антитело» лежит в основе разнообразных иммунохимических методов. Иммунохимия предлагает простые, быстрые, надежные, чувствительные и в большинстве случаев легко автоматизируемые методы, применимые в научных и клинических лабораториях. Иммунохимические методы обычно не требуют обширной подготовки проб или дорогостоящих инструментов. Для иммунохимических методов предпочтительны высокоаффинные антитела, как связывающие больше антигена за меньший период времени, и образующие более стабильные комплексы.

В отличие от МА, поликлональные антитела, очищенные из антисыворотки иммунизированного животного, проявляют кросс-реактивность с аналогичными эпитопами на других молекулах, так как представляют собой смесь гетерогенных антител с различной аффинностью, каждое из которых направлено к различному эпитопу. Активность поликлональной антисыворотки представляет собой комбинацию антигенсвязывающих реакций различных антител. Это делает иммунохимический метод менее конкретным, но более применимым к ситуациям, когда мишень представляет собой группу структурно связанных молекул. Способность поликлональных антител узнавать множество эпитопов на одной молекуле имеет преимущества в гистологии, потому что ткань пациента часто повреждается при подготовке к анализу, при этом некоторые эпитопы разрушаются. Действие МА в данном случае менее эффективно, так как направлено против одного конкретного эпитопа.

К недостаткам поликлональных антител относят трудности их получения в больших воспроизводимых количествах, стандартизации препаратов, а также возможные перекрестные реакции. Вариабельность, присущая поликлональным антителам объясняется различным иммунным статусом экспериментальных животных. Однако поликлональные антитела продолжают активно использоваться благодаря их высокому сродству к аналиту, а также простоте и дешевизне их получения в сравнении с моноклональными и рекомбинантными антителами (Harlow & Lane 1988; Hendriksen & Nau 2003; Nau *et al.*, 2005).

Преимущество МА состоит в возможности стандартизации препаратов антител. Конкретная гибридная клеточная линия при производстве МА позволяет осуществить стабильную продукцию антител и не зависит от статуса животного, как в случае поликлональных антител. Но, важнейшим фактором, который определил широкое использование МА в различных отраслях науки, является их тонкая специфичность, направленность против конкретного эпитопа (Hendriksen & Nau 2003).

1.3. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ МА

Благодаря уникальным свойствам МА широко используются в биомедицинских исследованиях, диагностике заболеваний и лечении (Wang *et al.*, 2008; Zola 2010; Ghagane *et al.*, 2017). Потенциальное терапевтическое применение антител обусловлено образованием иммунных комплексов («антиген – антитело»). Рецепторы клеток, составляющих иммунную систему, взаимодействуют с иммунными комплексами, что приводит к нейтрализации токсинов, удалению инфекционных агентов из кровообращения, разрушению клеток организма, опосредующих болезнь, включая аутоиммунные и раковые клетки и т.п. (Adams *et al.*, 2005; Takimoto *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Zola 2010; Rastogi *et al.*, 2014). Использование МА привело к появлению новой концепции лечения – специфической, прицельной (таргетной) терапии.

К недостаткам лекарственных препаратов на основе МА относится возможные индивидуальные аллергические реакции, но основным недостатком является их высокая цена (Dimitrov *et al.*, 2009).

1.3.1. Гуманизация МА

Введение человеку МА сопровождается иммунным ответом на чужеродный мышинный белок. Константные домены иммуноглобулинов из организма другого вида являются иммуногенными для человека, что приводит к образованию собственных антивидовых антител, специфичных к антителам животного (Donzeau *et al.*, 2007). Адекватных методов получения гибридом на основе клеток человека не было разработано. Высокая потребность в терапевтических человеческих МА была решена генно–инженерными методами. Один из них – «гуманизация» мышинных антител, создание генетических химерных конструкций, объединяющих константные участки генов иммуноглобулинов человека с переменными участками генов мышинных антител. Гуманизированные МА не отторгаются человеческим организмом как чужеродный антиген и сохраняют специфичность к антигену, присущую мышинным Fab–фрагментам (Morrison *et al.*, 1984; Boulianne *et al.*, 1984).

Генно–инженерные технологии позволили создать гуманизированные МА, на 95 % состоящие из иммуноглобулина человека. В этих молекулах мышинными являются только гипервариабельные участки CDR (*complementarity–determining regions*) – области Fab-фрагментов, ответственные за специфическое связывание антитела с антигенной детерминантой. Полностью избежать использования мышей для создания человеческих МА позволил фаговый дисплей (Carter 2006). Библиотеки фагового дисплея создают,

комбинируя в случайных сочетаниях переменные гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, выделенные из библиотек генов, экспрессируемых В-лимфоцитами (Clackson & Lowman 2004). В результате получают комбинаторную библиотеку, представляющую собой огромный набор генов Fab-молекул разнообразных специфичностей, встроенных в ген фага, отвечающий за синтез белка капсида, в результате чего фаг отображает Fab-молекулу на своей оболочке. Взаимодействие с целевым фиксированным антигеном позволяет извлечь из популяции фаги, кодирующие Fab-домены необходимой специфичности. Таким фагом заражают бактериальные клетки, для наработки конкретных антигенспецифических молекул (Bratkovic 2010; Vaks *et al.*, 2013).

Биофармацевтические компании мультипликацией минимальной антиген-связывающей молекулы (одноцепочечный антиген-связывающий фрагмент – *scFv*, *Single chain fragment variable*, в котором переменные домены тяжелой и легкой цепей ковалентно связаны гибким линкером) активно разрабатывают генно-инженерные антитела: «diabodies», «triabodies», «tetrabodies». Разрабатываются также мини-тела (*minibody*), представляющие собой единую полипептидную цепь с молекулярной массой около 60 кДа, содержащей два β-слоя из переменного домена тяжелой цепи по 3 β-складки в каждом, в которых содержатся гиперпеременные петли (Kim *et al.*, 2005; Hagemeyer *et al.*, 2009; Olafsen *et al.*, 2010).

Перспективные разработки последних лет также направлены на получение биспецифических антител, с помощью которых возможна одновременная блокировка двух мишеней, например, факторов роста опухоли и их рецепторов на клеточной поверхности (Lum *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2011).

Производство МА является максимально быстро развивающейся отраслью фармацевтической индустрии и составляет третью часть всех биотехнологических продуктов. Номенклатура медицинских препаратов, представляющих собой МА, отражает принцип их получения. Названия всех МА, используемых в качестве медицинских препаратов, оканчиваются на «-mab» (от англ. «**m**onoclonal **a**ntibody»). Если антитело получено от мыши, добавляется буква «o», и окончание у таких антител «-omab». Химерные антитела получили окончание «-ximab» (ритуксимаб (*rituximab*), цетуксимаб (*cetuximab*)) (Wu *et al.*, 2017; Furtado *et al.*, 2017). Гуманизированные антитела имеют окончание «-zumab» (алемтузумаб (*alemtuzumab*)) (Aranha 2013; Gobbin *et al.*, 2017; Ziemssen *et al.*, 2017), бевацизумаб (*bevacizumab*) (Roviello *et al.*, 2017; Glitza *et al.*, 2017), гемтузумаб (*gemtuzumab*) (Appelbaum *et al.*, 2017; Godwin *et al.*, 2017), пембролизумаб (*pembrolizumab*) (Abdul-Karim *et al.*, 2017; Toor *et al.*, 2017), обинутузумаб (*obinutuzumab*)

(Golay *et al.*, 2013; Rioufol *et al.*, 2014; Shah 2014; Owen *et al.*, 2015; Shah 2015; Cerquozzi *et al.*, 2015; Seiter *et al.*, 2015), ранибизумаб (ranibizumab) (Jiang *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2017), трастузумаб (trastuzumab) (De Santis *et al.*, 2017), полностью человеческие – «-umab» (ипилимумаб (ipilimumab) (Naylor *et al.*, 2017; Copur *et al.*, 2017), офатумумаб (ofatumumab) (AlDallal 2017; Wang *et al.*, 2017), панитумумаб (panitumumab) (Del Prete *et al.*, 2015; Tay *et al.*, 2015) (рис. 2).

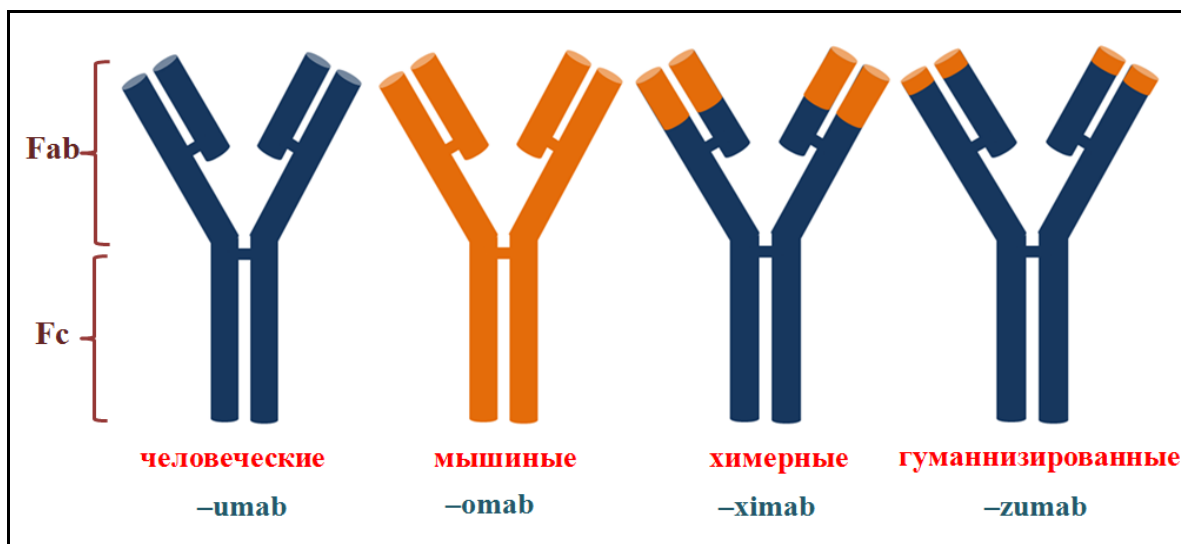


Рис. 2. Типы МА и их номенклатура (Будчанов 2016).

Производство полностью человеческих МА сопряжено с трудностями препаративной наработки, решаемые путем использования трансгенных мышей, мышинные В-лимфоциты которых экспрессируют тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов человека (Molina *et al.*, 2003; Lonberg 2008; Pruzina *et al.*, 2011).

1.3.2. Примеры терапевтических МА

Среди утвержденных почти 50 терапевтических МА большинство представляют собой молекулы подкласса IgG1. Этот факт обусловлен эффекторными функциями их Fc-регионов и тем, что иммуноглобулины этого подкласса обладают более длительным периодом полураспада в сыворотке.

Терапия с использованием МА направлена на использование механизма защиты организма путем активации антителозависимых цитотоксических или комплементарных цитотоксических путей. Цитотоксичность вызывается взаимодействием константной области антитела и Fc-рецептора (FcγRIIIa), экспрессированного на иммунных эффекторных клетках. Часть терапевтических МА нацелены на сигнальные пути

ингибирования роста и апоптоза, эти препараты стимулируют иммунный ответ, приводящий к разрушению раковых клеток. МА используют для терапии рака, аутоиммунных, респираторных, сердечно-сосудистых, инфекционных и других заболеваний. В трансплантологии терапевтические МА используют для снижения риска отторжения трансплантатов (Dübel 2007).

Первым и наиболее изученным на сегодняшний день является антитело ритуксимаб (rituximab), химерное МА мыши и человека (Salles *et al.*, 2017). Ритуксимаб специфически взаимодействует с трансмембранным фосфопротеидом CD20, экспрессирующимся на поверхности пре-B-лимфоцитов и зрелых В-лимфоцитов, но отсутствует на гемопоэтических стволовых, плазматических и клетках других тканей (Banchereau *et al.*, 1992; Tedder *et al.*, 1994; Riley *et al.*, 2000). В результате лечение ритуксимабом не влияет на клетки, не имеющие антигена CD20 на своей поверхности. Такая избирательность позволяет восстановиться В-лимфоцитам из гемопоэтических предшественников после удаления опухолевых клеток, при этом антитела продолжают секретироваться плазматическими клетками, обеспечивая нормальный иммунный статус организма (Martin *et al.*, 2007; Renaudineau *et al.*, 2009; St Clair 2009; Gurcan *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009; Boffetta 2011; Cang *et al.*, 2012; Castillo-Trivino *et al.*, 2013; Otukesh *et al.*, 2013; Rosman *et al.*, 2013; Morrison 2014; Bhandari *et al.*, 2014; Bhandari *et al.*, 2014; Hallek 2015).

Результатом 20-летнего применения ритуксимаба в качестве терапевтического средства явилось продление жизни многим пациентам с В-клеточными гематологическими злокачественными новообразованиями и инициирование разработки новых препаратов для лечения гематологических злокачественных опухолей В-клеток на основе МА (Cang *et al.*, 2012; Shah 2014; Evans *et al.*, 2015; Salles *et al.*, 2017).

Примером высокоэффективного препарата для лечения хронического лимфолейкоза (наиболее частого вида лейкоза у взрослых) является гуманизированное МА против CD52 антигена – препарат алемтузумаб (лемтрада). Антиген CD52 экспрессируется на мембране большинства зрелых нормальных и опухолевых Т- и В-лимфоцитов с высокой плотностью – примерно 500 000 молекул на клетку (по сравнению с антигеном CD20, плотность экспрессии которого составляет около 8000 молекул на клетку, что объясняет чрезвычайно высокую эффективность алемтузумаба в терапии хронического лимфолейкоза и Т-клеточных лимфом. Алемтузумаб также используют для уменьшения реакции «трансплантат против хозяина» при аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток (Osterborg *et al.*, 1997; Ferrajoli *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2002).

Терапевтические МА достаточно эффективны при лечении воспалительных заболеваний. Мишенями таких антител являются молекулы иммунной системы, ответственные за развитие воспалительного процесса: фактор некроза опухоли (TNF- α) (Elliott *et al.*, 1993; Feldmann *et al.*, 2001; Feldmann 2002), рецептор интерлейкина-1 (Jiang *et al.*, 2000), рецептор интерлейкина-6 (Wendling *et al.*, 1993; Yoshizaki *et al.*, 1998; Andreakos *et al.*, 2002). Примерами противовоспалительных препаратов, направленных против фактора некроза опухоли, являются инфликсимаб или ремикейд, полностью человеческие рекомбинантные МА адалимумаб (хумира) (Lipsky *et al.*, 2000; Van den Brande *et al.*, 2003; Danese *et al.*, 2011; Malottki *et al.*, 2011).

Одной из мишеней противоопухолевых препаратов является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), с которым взаимодействуют рекомбинантные гуманизированные МА – бевацизумаб (Авастин), приводя к нарушению ангиогенеза, снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли (Kim *et al.*, 1993).

Радикально изменило лечение рака молочной железы применение трастузумаба (герцептина), представляющего собой гуманизированные рекомбинантные МА, избирательно связывающиеся с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток. (Pegram *et al.*, 1998; Cobleigh *et al.*, 1999). При HER2 – позитивном раке молочной железы происходит постоянная стимуляция злокачественного роста за счет присоединения выделяемого самой опухолью вещества, известного как эпидермальный фактор роста, к рецептору HER2. Трастузумаб блокирует рецептор HER2, что не позволяет эпидермальному фактору роста стимулировать процесс деления злокачественных клеток.

1.3.3. Иммуноксины

Создание иммуноксенов – направление технологии с использованием МА, объединяющее специфическую тонкую направленность МА с низкомолекулярными цитостатическими препаратами или с радиоактивными изотопами. Такой подход делает возможным доставку токсических веществ непосредственно к патологически измененным опухолевым клеткам и исключает повреждение здоровых тканей, так как конструкция из МА, специфичного к опухолевому антигену, и токсического вещества способна уничтожить опухолевую клетку, причем как в самой опухоли, так и в ее метастазах. К МА пришиваются токсины бактериального (псевдомонадный экзотоксин А, дифтерийный токсин) или растительного происхождения (рицин, абрин) (Hall *et al.*, 1992; Kreitman *et al.*, 1994; Pai *et al.*, 1995; Pastan 1997; Smallshaw *et al.*, 2003; Kreitman *et al.*, 2006).

В настоящее время разрешены к клиническому применению при неходжкинской лимфоме два препарата на основе МА к CD20 антигену, меченные радиоактивными изотопами. Для терапии В-клеточных лимфом используется конъюгат МА с радиоактивным изотопом иттрия Y^{90} – ибритумомаб (зевалин). Y^{90} выделяет только β -излучение, 90% эффективной энергии которого действует на глубину всего 5 мм, в результате все возможные вредные воздействия на здоровые ткани сведены к минимуму (Rizzieri 2016). Конъюгатом мышиного МА против CD20 с радиоактивным изотопом йода J^{131} является тозитумомаб (бексар). Данный изотоп характеризуется коротким периодом полураспада, 8 дней. Специфическое связывание J^{131} –тозитумомаба с CD20 приводит к лизису клеток, экспрессирующих данный антиген, за счет ионизирующего излучения (Davies *et al.*, 2004; Kaminski *et al.*, 2005).

Введение в медицинскую практику препаратов–МА важнейшее достижение, которое трудно переоценить. Производство МА представляет собой максимально быстро развивающуюся отрасль фармацевтики. Проводится большое количество доклинических и клинических испытаний новых перспективных препаратов, расширяется число мишеней, на которые они направлены, а, следовательно, увеличивается число болезней, которые будут побеждены с их использованием.

1.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МА В ДИАГНОСТИКЕ

Медицинские приложения МА практически неограниченны, в частности. МА применяются для диагностического определения маркеров сердечно–сосудистых заболеваний (Vaidya 1994; Feng *et al.*, 1998; Katrukha *et al.*, 1998; Filatov *et al.*, 1998; Semenov *et al.*, 2009; Kandolin *et al.*, 2015; Omland *et al.*, 2015; Maznyczka *et al.*, 2015; Gore *et al.*, 2016; Na *et al.*, 2016), сахарного диабета (Krishnamurti *et al.*, 2001), раковых заболеваний (Ludwig *et al.*, 2005), патологии беременности, почечной недостаточности (Arthur *et al.*, 2008), аутоиммунных заболеваний (Nakamura *et al.*, 1988), аллергии, расстройств эндокринной системы (Ekins 1992; Shivaraj *et al.*, 2009), инфекционных заболеваний (Wolters *et al.*, 1976; van der Waart *et al.*, 1978; Stamm *et al.*, 1984; Safford *et al.*, 1991; Cummings *et al.*, 1996; Black 1997) и др. МА также используют для определения группы крови (Malomgré *et al.*, 2009), диагностики беременности (Cole 2009) и измерения содержания лекарств или токсинов в крови человека.

МА используют в судебно–медицинской экспертизе, контроле качества пищевых продуктов (определение пестицидов, фунгицидов, гербицидов, микотоксинов,

антибиотиков и др. (Haasnoot *et al.*, 1999; Loomans *et al.*, 2003; Maragos *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2013)).

1.4.1. Принцип ИФА

В основе любого иммунного анализа лежит образование комплекса «антиген-антитело» и мечение одного из компонентов комплекса ферментом, радионуклидом, флуоресцентным красителем и др. (Crowther 1995). Оценка реакции проводится на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать и автоматизировать анализ. В зависимости от типа метки иммунный анализ называют иммуноферментным (ИФА), радиоиммунным (РИА), иммунофлуоресцентным и др. (Weiler *et al.*, 1976; Amino *et al.*, 1995).

В основе практически всех диагностических тест-систем с использованием МА лежит ИФА и его различные модификации, использующие каталитическое действие ферментного маркера. Преимуществами ИФА являются высокая чувствительность, специфичность, точность, возможность стандартизации и автоматизации, отсутствие особых требований к условиям лаборатории, микрообъемы исследуемого материала, быстрота выполнения, что обусловило его широкое применение в медицине, ветеринарии и научно-исследовательской практике. На рынке имеется большое количество коммерчески доступных ИФА – наборов к практически всем клинически, экологически и экономически важным субстанциям, к которым возможно получить антитела. (<http://www.r-biopharm.com>; <https://www.id-vet.com>; <https://ca.idexx.com/en/corporate/home.html>). ИФА используют как для обнаружения антигена, так и для выявления антител в низких и очень низких концентрациях (Schuurs 1980).

Существует много вариантов ИФА, каждый из которых обязательно содержит 3 стадии: 1) взаимодействие аналита с антителом с образованием иммунного комплекса; 2) связывание химического конъюгата «фермент + специфический реагент» с иммунным комплексом или со свободными центрами связывания; 3) превращение ферментного субстрата в регистрируемый сигнал (Van Weeman *et al.*, 1971). Ферментативная активность образовавшегося иммунного комплекса пропорциональна концентрации каждого из составляющих компонентов, в том числе и аналита, что изображается в виде кривой, где на оси ординат отложена интенсивность сигнала субстрата после его ферментативного превращения, а по оси абсцисс концентрация аналита в пробе (Koivunen *et al.*, 2006).

Под чувствительностью анализа понимается та минимальная концентрация аналита, при которой заметно различие сигнала от контрольного образца, т.е. образца, заведомо не

содержащего аналит. Эта разница в величинах сигналов должна составлять 2 величины стандартного отклонения (СО) для контрольного образца, рассчитываемого по формуле:

$$CO = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n-1}},$$

где СО – стандартное отклонение, n – число измерений, x_i – величина сигнала для данного измерения, m – среднее арифметическое от x_i (Вербов 1998).

Ферменты, используемые в ИФА, обладают высокой удельной каталитической активностью, возможностью получения очищенного фермента в препаративном количестве, сохранением каталитической активности после химического конъюгирования «фермент–антитело» (или антиген), стабильностью, простотой и чувствительностью метода определения активности (Blake *et al.*, 1984). Одна ферментная молекула может реагировать с большим количеством молекул субстрата, что делает возможным определение до 10^{-12} М аналита (Avrameas *et al.*, 1978). Функциональные группы аминокислотных остатков фермента позволяют ковалентно присоединять лиганд. В ИФА используют щелочную фосфатазу, β -D-галактозидазу, чаще других – пероксидазу хрена (Lequin 2005). В качестве хромогенного субстратного реагента чаще применяется орто–фенилендиамин с перекисью водорода, продукт окисления которого регистрируется фотометрически при длине волны 490 нм. Флуоресцентные и хемилюминесцентные субстраты сокращают время анализа и повышают чувствительность более чем на два порядка (Yang 1998).

Для повышения чувствительности сигнала используют взаимодействие биотина с авидином или стрептавидином, аффинность которого очень высока (константа диссоциации комплекса – 10^{-15} М). Биотинилирование не нарушает антигенсвязывающих и ферментативных свойств (Егоров 1991).

1.4.2. Форматы ИФА

Существует несколько вариантов классификации ИФА. Конкурентный и неконкурентный варианты ИФА различают по типу реагентов, присутствующих на первой стадии. На первой стадии конкурентного ИФА в реакционной смеси одновременно присутствуют аналит и его меченный ферментом аналог, конкурирующие за центры специфического связывания. В ингибиторном формате ИФА антиген, присутствующий в исследуемом образце взаимодействует с МА, мечеными ферментом, и ингибирует их

взаимодействие со стандартным антигеном, иммобилизованным на твердой фазе (Wang *et al.*, 2011).

По характеру реакционной среды различают гомогенные и гетерогенные форматы ИФА. Гомогенный ИФА, чаще используемый для определения низкомолекулярных соединений, предполагает, что все стадии проходят в растворе, между ними нет разделительных этапов (Voller *et al.*, 1979). Гетерогенный (твердофазный) анализ характеризуется наличием твердой фазы и обязательного этапа отделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка). Образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие компоненты – в растворе (Lequin 2005).

В зависимости от количества стадий различают прямой и непрямой ИФА. В прямом на первой стадии исследуемый образец фиксируют на твердой фазе, далее добавляют конъюгат, после удаления непрореагировавших компонентов – ферментный субстрат. В клинической практике и ветеринарии для диагностики инфекционных заболеваний используют непрямой ИФА, в котором иммобилизованный антиген инкубируют с исследуемым материалом, меченые ферментом антивидовые антитела добавляют после удаления несвязавшихся компонентов. При наличии антител к искомому антигену в анализируемом образце уровень оптической плотности реакции выше, чем в отрицательных образцах (Engvall 1977).

«Сэндвич»–ИФА используют для определения антигенов, пространственная структура которых имеет не менее двух пространственно отдаленных неперекрывающихся эпитопов, против каждого из которых получают антитела. Антитела к одному из эпитопов сорбируют на твердой фазе, к которой добавляют исследуемый материал. После образования комплекса «антитело – антиген» и удаления несвязавшихся компонентов, добавляют антитела к другому эпитопу искомого антигена, меченые ферментом. По завершении инкубации, с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой, образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Ферментативная активность, остающаяся на твердой фазе, прямо пропорциональна содержанию антигена в пробе. «Сэндвич»–ИФА применяется для определения аналита в сложнокомпонентных смесях, которыми являются практически все жизненно важные субстанции (Khamehchian *et al.*, 2008).

Большое количество тест–систем в формате «сэндвич»–ИФА на основе МА разработано для анализа пищевых продуктов (Bennett 2005; Wang *et al.*, 2013; Kuang *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

1.4.3. Иммунохроматографический анализ

В настоящее время иммунохроматографический анализ представляет собой один из самых бурно развивающихся и востребованных методов диагностики, так как не требует лабораторных условий, его можно быстро и легко проводить в практически любых условиях с визуальной оценкой результата, может быть проведен неспециалистом и не требует использования оборудования. С его помощью определяют наличие определенных компонентов в биологических материалах (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, кал, пробы пищевых продуктов, питьевой воды, почвы и т.д.). Анализ также называют методом сухой иммунохимии, стрип–тестом, экспресс–тестом или экспресс-анализом и проводят индикаторными полосками, палочками, панелями или тест-кассетами (Shyu *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Raphael *et al.*, 2002; Putalun *et al.*, 2004; Yong *et al.*, 2005, 2006; Urusov *et al.*, 2011). Также существуют приборные полуколичественные и количественные форматы, в которых используются специальные приборы, измеряющие интенсивность сигнала на тест–полоске. Возможно также одновременное определение нескольких аналитов (Rubina *et al.*, 2010; Филиппова *и др.*, 2011). Наиболее распространенной меткой иммунохроматографического метода являются наночастицы коллоидного золота, реже используют наночастицы углерода или окрашенного латекса. В приборных вариантах экспресс–метода применяют ковалентно связанные с частицами латекса флуоресцентные, фосфоресцентные, парамагнитные и биолюминесцентные метки (Puо *et al.*, 2012). В случае использования ферментных меток реакция визуализируется субстратами, демонстрирующими цветные реакции.

В основе иммунохроматографического метода лежит принцип тонкослойной хроматографии. Исследуемая жидкость играет роль подвижной фазы, в которой движутся нанесенные на нижнюю часть тест–полоски меченые специфические антитела, которые связываются с аналитом. На каждой тест–полоске делают две линии, на тестовую иммобилизуют антитела против аналита, а на контрольную – антивидовые антитела против первичных антител. При нанесении исследуемого образца на мембране происходит связывание аналита с конъюгатом («МА–метка»), с движением жидкости этот иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где связывается со специфическими антителами, образуя «сэндвич». Оставшаяся избыточная часть конъюгата МА–метка связывается с антивидовыми антителами на линии положительного контроля, ее окрашивание свидетельствует о достоверности и качестве самого теста. Окрашивание обеих линий является положительным результатом. При отсутствии определяемого вещества в пробе конъюгат связывается только с антивидовыми антителами на контрольной линии. Этот

метод используется для выявления вирусов, в т.ч. ВИЧ, гормонов (например, в тестах на беременность), возбудителей инфекционных заболеваний, таких бактерий как *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Campylobacter*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori* и др. (Coons 1989; Latman *et al.*, 1989; Hicks *et al.*, 1989; Cognein *et al.*, 1994; Tramont 1995; Sato *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Torlesse *et al.*, 1997; Schrier *et al.*, 1998; Bastian *et al.*, 1998; Shirin *et al.*, 1999; Struyf *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 1999; http://www.lab-biomed.ru/singlepath_duopath; <http://www.diacheck.ru/collection/med-ekspress-diagnostics>).

Конкурентный вариант иммунохроматографического метода используется для определения низкомолекулярных соединений, например, наркотиков. Аналит из пробы, конкурируя с иммобилизованным аналитом, связывается с мечеными антителами на мембране. Далее иммунный комплекс движется через тестовую зону, где иммобилизован конъюгат аналита с белком-носителем. Иммунный комплекс не взаимодействует с этим конъюгатом, так как низкомолекулярные соединения обычно имеют одну антигенную детерминанту и могут связаться только с одним антителом, этот эпитоп в случае наличия аналита в пробе уже задействован. На контрольной линии иммунный комплекс взаимодействует с антивидовыми антителами. Если в тестовой зоне нет окрашенной полосы, а в контрольной зоне окрашенная полоса присутствует, это означает, что аналит в исследуемой пробе находится в количестве, превышающем его минимально определяемое значение для этого теста. Наличие двух окрашенных полос является отрицательным результатом (Wennig *et al.*, 1998).

Благодаря уникальным свойствам МА широко используются для выявления различных веществ в самых различных областях человеческой деятельности. На основе МА разработаны различные форматы для качественного и количественного иммунохимического определения анализируемых веществ, созданы биосенсоры для обнаружения конкретного аналита в определенном месте в реальном времени.

1.5. МА КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ НАУКЕ

1.5.1. МА для очистки молекул и протеомики

МА используют в виде иммуноаффинных сорбентов для очистки молекул или клеток из многокомпонентных смесей (Hall *et al.*, 1993). Иммуноаффинная хроматография более эффективна по сравнению с традиционными методами биохимической очистки, обычно для успешной очистки целевого продукта сочетают как аффинные, так и

традиционные методы (Creaser *et al.*, 1998). Применение МА для создания аффинных сорбентов позволяет добиться 100–, а иногда и 1000–кратного обогащения целевой молекулы (Fitzgerald *et al.*, 2011). Биологические препараты состоят из множества молекул, находящихся в широком динамическом диапазоне концентраций, различающихся на несколько порядков (Selvaraju *et al.*, 2012). Методы очистки на основе МА позволяют получать любые количества биологически активных веществ из сложных смесей, но особенно важны и незаменимы при очистке нанограммовых количеств из концентрированных растворов (Fitzpatrick *et al.*, 2000).

Критическим этапом иммуноаффинной хроматографии является элюирование. Высокое сродство МА к антигену требует жестких условий элюирования целевого белка с аффинного носителя. В случае очистки ферментов вариантами мягкой элюции могут быть: очистка в составе мультиферментных комплексов, проводимых на стадии мягкой диссоциации, специфическое элюирование субстратами и эффекторами, стабилизация фермента, гипотоническое элюирование и др. (Ehle *et al.*, 1990). Одна из стратегий получения рекомбинантных белков представляет собой аффинную очистку с использованием МА, направленного на короткую линейную эпитопную последовательность. Использование короткого аминокислотного эпитопа позволяет увеличить скорость диссоциации иммунного комплекса и провести элюирование целевого белка в мягких условиях без денатурации. Этот подход был использован для очистки рекомбинантных функционально активных ферментов: деубиквитиназы CYLD, E3 убиквитина, лигазы MARCH3 (Takeda *et al.*, 2017). МА были успешно использованы для очистки кальпаинов с целью изучения их протеолитической активности. Кальпаины -цитозольные Ca^{2+} -активируемые цистеиновые протеазы, ответственные за нарушение гомеостаза Ca^{2+} , приводящее к неадекватной деградации белка при различных патологиях, включая мышечную дистрофию, образование катаракты и др. (Cong *et al.*, 2002).

С помощью МА очищают человеческий хорионический гонадотропин для использования в качестве иммуногена при подготовке стандартов и контрольных сывороток в ходе производства тестов для определения его содержания у пациентов, в том числе и тестов на определение беременности (Rodríguez *et al.*, 2005).

МА использованы также для очистки рекомбинантного поверхностного антигена вируса гепатита В, используемого в качестве вакцины (Ibarra *et al.*, 1999).

Современные проекты секвенирования геномов идентифицировали тысячи новых генов, кодирующих неизвестные белковые продукты, которые необходимо исследовать на

молекулярном, субклеточном и тканевом уровнях. Исследование и реконструирование метаболических путей требует достоверного контроля уровня экспрессии каждого фермента. В таких случаях МА являются незаменимыми для характеристики и мониторинга многочисленных белков в протеомных исследованиях и реконструкциях метаболических путей. Так, в работе Li Y., с соавт., была установлена роль трех ферментов в метаболическом пути синтеза растительных хелатов: гамма-глутамил цистеин синтетазы, глутатионин синтетазы и фитохелат синтазы (Li *et al.*, 2001). В работе Lin J., с соавт. с помощью флуоресцентно меченых МА выявлена локализация белка, присутствующего в клетках в минорных количествах. Проанализировав несколько типов клеток, авторы установили его локализацию в мембранах и цистернах аппарата Гольджи (Lin *et al.*, 1982). С помощью МА в работе Тоневицкого с соавт. установлено наличие множественных копий рибосомального белка L7/L12 в бактериальных клетках (Тоневицкий *и др.*, 2009).

В работе Eder M., и соавт. с помощью МА было исследовано распределение пектин-подобных углеводов между клеточной стенкой и продуктами секреции в процессе роста и деления клетки на примере водоросли *Netrium digitus*. Были выявлены конформационные изменения пектина в составе клеточной стенки в ходе процессов жизнедеятельности, изучена степень связывания кальция пектин-подобными компонентами клеточной оболочки, что позволило уточнить таксономическое положение организма в общей классификации (Eder *et al.*, 2010).

Использование МА помогает ускорить отбор штаммов-продуцентов биотехнологически значимых веществ, в качестве примеров можно привести следующие работы: Павлов К., с соавт. использовали МА в ходе экспрессии и клонирования кДНК-нейроспецифической енолазы человека в *E. coli* (Павлов *и др.*, 2011); Swancutt M., с соавт., – для отбора рекомбинатных клонов *E. coli*, экспрессирующих поверхностный иммуноген *Treponema pallidum*, возбудителя сифилиса, с целью изучения его иммуногенных свойств (Swancutt *et al.*, 1986).

1.5.2. МА в вирусологии

В области вирусологии изучение взаимодействия МА с вирусными белками и их рекомбинантными аналогами в системах *in vivo* и *in vitro* позволило получить информацию об особенностях строения вирионов, структуре и функциях вирусных белков, их роли в формировании противовирусного иммунитета, определить структуру вирусных антигенных детерминант и их влиянии на развитие инфекции. МА также используют как

диагностический инструмент для эффективного контроля инфекционных заболеваний. Создаются новые эффективные методы иммунодиагностики вирусных заболеваний, таких как лихорадка Западного Нила (Razumov *et al.*, 2005; Pereboev *et al.*, 2008), экстремелия, натуральная оспа (Разумов *и др.*, 2005), грипп (Webster *et al.*, 1980), вирус Эбола (Казачинская *и др.*, 2010, 2015) и др. В работе Bhat S., с соавт. были получены и охарактеризованы антинуклеопротеиновые МА для использования в иммунодиагностических тестах к вирусу птичьего гриппа (Bhat *et al.*, 2013). МА против специфичных для хозяина сигнальных аминокислотных остатков в вирусном нуклеопротеине были использованы для выявления тонких различий между различными вирусами гриппа подтипа А, такими, как высокопатогенный штамм птичьего гриппа H5N1 и пандемический H1N1 (Zhang *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Varich *et al.*, 2011; Nicholls *et al.*, 2012; Miyoshi–Akiyama *et al.*, 2012).

Показательным примером использования МА для исследования вирусов является вирус Эбола, не имеющий официального лекарства или вакцины. С помощью МА против вирусных компонентов определены структуры участков, ответственных за прикрепление вируса к клетке–хозяину, расщепление эндосомной протеазой, взаимодействие с эндосомальным холестерин–транспортёром Ниманна – Пика С1 (NPC1), поглощение вируса мембраной клетки–хозяина. Перспективным является применение лекарственных препаратов, полученных на основе МА к этим важнейшим вирусным эпитопам (Carette *et al.*, 2011; Audet *et al.*, 2014; Vecquart *et al.*, 2014; González–González *et al.*, 2015). Трудность заключается в том, что большая часть антител работают только против определенного вида эболавируса. Например, самое современное лекарство, ZMapp™, коктейль из трех МА, специфичных для эболавируса Заир, не действует против вируса Судан и Бундибугио. Изолировав 349 МА у пациента, пережившего эпидемию 2013–16 гг., ученые обнаружили, что два из них ADI–15878 и ADI–15742, могут нейтрализовать инфекцию всех пяти известных видов вируса Эбола. И оба антитела оказались способны защитить подопытных животных от летальной дозы трех самых крупных агентов: вирусов Заир, Судан и Бундибугио (Moeckotte *et al.*, 2016).

1.5.3. МА в биохимии рецепции

МА являются уникальной моделью в изучении биохимии рецепции. Даже в том случае, если о природе рецептора нет никаких сведений, получение МА против такого рецептора является возможным, следовательно, становится возможной его идентификация и дальнейшее изучение. Для этого получают МА к лиганду искомого рецептора. Далее

получают МА к антигенсвязывающей области первых МА – антиидиотипические антитела, которые и будут взаимодействовать с неизвестным рецептором, что было применено для исследования адренергического рецептора (Fraser *et al.*, 1980; Guillet *et al.*, 1985). В ряде случаев МА обладают «мимикрирующим» действием, т. е. способностью запускать те же реакции в клетке, что и лиганд, связывающейся с рецептором, что позволяет использовать их для изучения последствий лиганд–рецепторного связывания на жизнедеятельность клетки. Например, были получены МА к инсулиновому рецептору, которые имитировали действие инсулина. Возможно получение МА, которые, связываясь с рецептором, не изменяют его функции. Сравнительное изучение воздействия таких МА позволяет изучить механизмы регуляции функциональной активности рецепторов (Hawley *et al.*, 1989).

В работе Hino T., с соавт. (Hino *et al.*, 2012) предложен новый способ моделирования активности G–белок–связанных рецепторов Fab–фрагментами МА и наноантителами – CDR (сокращение от англ. *complementarity–determining region*). МА против аденозинового рецептора, ответственного за регуляцию кровоснабжения сердечной мышцы и освобождения нейромедиаторов – глутамата и дофамина, в головном мозге, предотвращали связывание только агонистов, но не антагонистов к экстраклеточному лиганд–связывающему центру. Структура комплекса аденозинового рецептора с Fab–фрагментами МА выявила, что эти антитела узнавали внутриклеточную поверхность рецептора. CDR–H3 этих антител (один из антиген-связывающих участков аминокислотной последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина) проникал внутрь рецептора, располагаясь по отношению к С-концевому фрагменту G–белка таким же образом, как и опсин (светочувствительный мембранный рецептор) располагается по отношению к $\beta(2)$ –адренергическому рецептору в функционально–активных конформациях. CDR–H3 блокировал аденозиновый рецептор в не активной конформации (Hino *et al.*, 2012).

Значительную роль МА сыграли в свое время в изучении интегрального трансмембранного белка бактериородопсина. Иммунохимическими методами были идентифицированы участки полипептидной цепи белка, экспрессированные на поверхности клеточной мембраны, что в конечном итоге позволило в сочетании с физико-химическими методами установить пространственную структуру фермента. Трансмембранная часть бактериородопсина составлена из 7 α –спиралей, идущих от одного до другого края мембраны. С помощью МА были точно установлены: β –шпилька и участки полипептидной цепи неупорядоченной пространственной структуры (петли, соединяющие α –спирали) выходящие из мембраны (Kimura *et al.*, 1982; Втюрина *и др.*, 1984; Ovchinnikov *et al.*, 1985; Yamaguchi *et al.*, 1993; Pashkov *et al.*, 1996; Пашков *и др.*, 2002).

1.5.4. МА в изучении иммунной системы

С помощью МА были выявлены, охарактеризованы и продолжают изучаться молекулы иммунной системы. В многочисленных лабораториях по всему миру было получено большое количество МА к эпитопам на поверхности лейкоцитов – белых кровяных клеток. МА позволили открыть многие экспрессированные на поверхности иммунокомпетентных клеток молекулы, изучить и выяснить их роль в иммунном ответе, так называемые CD (сокращение от англ. *cluster differentiation*) (Zola *et al.*, 2005, 2007). Классификация CD была предложена в 1982 году для идентификации и исследования поверхностных мембранных белков лейкоцитов. Определённый CD–антиген приписывался к группе МА, состоящей, по крайней мере, из двух различных клонов, распознающих один и тот же эпитоп на поверхности клетки иммунной системы. Исследование CD–антигенов с помощью МА позволило характеризовать и определять их функции. CD–антигенами (или CD–маркерами) называют и белки, которые узнаются моноклональными антителами CD и выполняют функции рецепторов или лигандов, участвующих в межклеточных взаимодействиях и являющихся компонентами каскадов различных сигнальных путей. С помощью МА был открыт Т–клеточный рецептор, исследована его специфичность и пусковые механизмы Т–клеточного иммунитета. Список CD–антигенов, внесённых в международную номенклатуру, постоянно пополняется и в настоящее время содержит 350 CD–антигенов и их подтипов (Tedder *et al.*, 1994; Zola 2007).

Система кластеров дифференцировки применяется в иммунофенотипировании для отнесения клеток к тому или иному типу по представленным на клеточных мембранах молекулам–маркёрам с помощью МА. Хотя наличие одного типа CD редко позволяет точно определить популяцию клетки, сочетания CD–маркёров определяют её достаточно чётко. Поэтому CD–молекулы и МА используются для сортировки клеток в проточной цитометрии. Чаще других используют CD–маркеры – CD4 и CD8, которые характерны для Т–хелперов и цитотоксических Т–лимфоцитов, соответственно. Эти молекулы определяются также в сочетании с CD3+ и с другими маркерами на других популяциях клеток. Например, некоторые макрофаги экспрессируют низкий уровень CD4; дендритные клетки имеют высокий уровень CD8. Тот факт, что вирус иммунодефицита человека связывает CD4 и хемокиновый рецептор на поверхности Т–хелперов для проникновения в клетку, позволил использовать количество CD4 и CD8 – Т–лимфоцитов в крови для мониторинга развития ВИЧ–инфекции (Migueles *et al.*, 2002; Catalfamo *et al.*, 2011).

Проточная цитометрия с использованием информативных комбинаций МА против клеточных маркеров в сочетании с разнообразными флюорохромными конъюгатами

(многоцветное иммунофенотипирование) позволило многосторонне изучать иммунофенотипические особенности различных опухолей кровеносной системы (Preijers *et al.*, 2012; Тупицын *и др.*, 2015; Тупицын 2015). Иммунофенотипирование с помощью МА в онкогематологии выявляет наличие или отсутствие антигенов (маркеров) – кластеров дифференцировки CD лимфоцитов, гранулоцитов и бластных клеток по представленным на клеточных мембранах молекулам–маркерам. Каждому направлению и этапу дифференцировки опухолевых клеток крови соответствует экспрессия определенных молекул, которые могут быть обнаружены с помощью МА на мембранах, в цитоплазме или ядрах клеток из мазков и срезов, приготовленных из опухолевой ткани. Результаты иммунофенотипирования свидетельствуют о течении опухолевого процесса в организме: определение подкласса стволовых гемопоэтических клеток, классификация острых лейкозов/лимфом, определение стадии развития лимфоидных опухолей, выявление возможных рецидивов и оценка эффективности терапии (Freedman 2014; Будчанов 2016).

1.5.5. МА в энзимологии

В энзимологии с помощью МА были выявлены активные центры некоторых ферментов. Антитела могут ингибировать или увеличивать каталитическую активность, например, в случае щелочной фосфатазы вируса герпеса (Banks *et al.*, 1985). МА к гепараназе (эндо-D–глюкоронидазе), полученные Gingis-Velitski S., с соавт. увеличивали её функциональную активность (Gingis–Velitski *et al.*, 2007). МА, полученные Fujino T., с соавт., ингибировали функциональную активность цитохрома P–450, индуцированного фенобарбиталом, полностью предотвращая электронный транспорт NADH (Fujino *et al.*, 1990).

МА активно применяют в качестве «иммунологического микроскопа» с чрезвычайно высоким разрешением, используя их как зонды для выявления, локализации и мониторинга функционально важных структур. Например, в работе Subkowski T., с соавт. МА использованы для количественного определения и изучения мембраносвязанной металлопротеиназы ECE–1, фермента играющего ключевую роль в функционировании эндотелия сосудов (Subkowski *et al.*, 1998).

Матриксная металлопротеиназа 9 – один из регуляторов внеклеточного матрикса, участвующий в деградации белков. Этот фермент играет патологическую роль в различных воспалительных и онкологических заболеваниях, поэтому считается привлекательной терапевтической мишенью. С помощью МА были исследованы механизмы ее ингибирования, взаимодействие МА с предшественником фермента предотвращает его

активацию, а их связывание с активной формой ее аллостерически ингибирует (Appleby *et al.*, 2017).

Важную роль в метастазировании рака играет матриксная металлопротеиназа-14. Использование аминокислотной последовательности пептидного ингибитора этого фермента при конструировании антиген связывающего участка (CDR) МА позволило превратить низкоаффинный пептидный ингибитор в высоко аффинное антитело (Nam *et al.*, 2017).

В развитии тромбоза важны тиоизомеразы, присутствующие на поверхности тромбоцитов. Уровень экспрессии поверхностных тиоизомераз тромбоцитов PDI, ERp5 и ERp57 повышается после активации тромбоцитов. Ингибирование каталитической активности этих ферментов приводит к уменьшению функции тромбоцитов. С помощью МА исследована агрегация тромбоцитов, секреция гранул, мобилизация кальция и активация интегрина (Holbrook *et al.*, 2017).

Наиболее демонстративным вкладом в учение о ферментативном катализе является факт получения МА, обладающих каталитической активностью – абзимов (Suzuki 1994; Невинский *и др.*, 2000, 2001; Nevinsky *et al.*, 2002). Важным различием между ферментами и иммуноглобулинами является то, что фермент не комплементарен своему специфическому субстрату, как антитело антигену. Наиболее прочное связывание активного центра фермента и субстрата реализуется в переходном состоянии реакции. Активный центр фермента комплементарен не исходному субстрату, а переходному состоянию. Таким образом, антитело, комплементарное структуре переходного состояния реакции, катализирует ферментативную реакцию, ускоряя достижение переходного состояния. Детальный сравнительный анализ взаимодействий между синтетическим аналогом переходного состояния и абзимом дает ценную информацию о вкладе отдельных контактов в эффективность катализа и для проверки теоретических представлений о структуре переходного состояния. Получено большое количество абзимов, которые используются не только в научных целях, но и находят широкое практическое применение в медицине и биотехнологии (Suzuki 1994; Наградова 1996).

МА в сочетании с ферментами расширяют сферу биотехнологического применения последних. Например, задача создания ферментативных реакторов решается путём иммобилизации ферментов на твёрдой фазе с помощью МА, взаимодействующих с участками, отдалёнными от каталитических центров, при этом сохраняется энзиматическая активность (Gunaratna *et al.*, 1992).

Представленные примеры продемонстрировали эффективность использования МА для развития фундаментальной науки, неразрывно связанной с биотехнологией и медициной. С помощью МА можно решить сложные проблемы как фундаментальной, так и прикладной науки. Например, выделение и идентификация компонентов в сложных многокомпонентных смесях; локализация аналитов на внутриклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях; выявление активных центров функционально активных молекул.

1.6. ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИНОВЫХ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB, СЕКРЕТИРУЕМЫХ *LYSOBACTER* SP. XL1

1.6.1. Бактерия *Lysobacter* sp. XL1

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter* sp. штамм XL1 (ранее определенная как *Xantomonas campestris*, рекласифицированная на основе анализа нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S РНК, и отнесенная к роду *Lysobacter* (Ситкин и др., 2003) была впервые обнаружена в реке Оке в г. Пущино в 1975 году сотрудниками ИБФМ РАН (Кулаев 1997).

Аэробная бактерия *Lysobacter* sp. XL1 представляет собой неподвижные грамотрицательные ровные палочки с округлыми концами, одиночные, в парах или цепочках, не образующие спор, без жгутиков. Клетки, выращенные на агаризованных средах, имеют размер 0.5–0.7 x 2.0–5.0 мкм, в жидких – 0.3–0.5 x 3.0–8.0 мкм (Christensen P., et al., 1978). Колонии сильно ослизненные, кремового, розового или желто-коричневого цвета, не способные к скользящему движению. Температурный оптимум роста – 25–30°C при рН от 6,0 до 9,0. В качестве источника азота использует аммонийные соли, пептон и триптон, углерода – углеводы и триптон. На рисунке 3 представлены микрофотографии бактерии, полученные с помощью световой и электронной микроскопии.

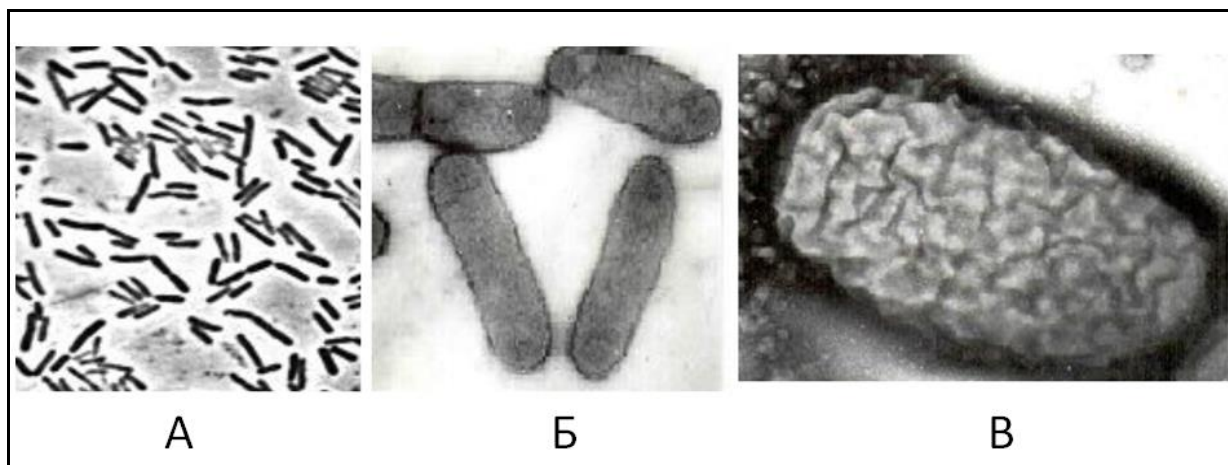


Рис. 3. Фотографии клеток бактерии. **А** – световая микроскопия, х 1320; **Б, В** – электронная микроскопия, х 72000, х 42000 (Степная 2012).

Пептидогликан *Lysobacter* sp. XL1, как и большинства грамотрицательных бактерий, имеет структуру A1 γ . Гликановая цепь состоит из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанной с тетрапептидной субъединицей L-аланин- γ -D-глутаминовая кислота-мезо-диаминопимелиновая кислота-D-аланин. Особенностью пептидогликанов типа A1 γ является отсутствие межпептидных мостиков и соединение гликановых цепей мезо-диаминопимелиновой кислотой в третьем положении одной субъединицы и D-аланина в четвертом положении другой субъединицы (Ситкин *и др.*, 2003).

Выделяют две группы бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 – внутриклеточные или автолитические и внеклеточные.

Внутриклеточные автолитические пептидогликангидролазы, гидролизующие собственный пептидогликан, принимают участие в процессах роста и деления бактерии, а также во внутренних структурных перестройках органелл клетки, давая материал для построения новых структур за счёт имеющихся старых (Кулаев *и др.*, 1984; Кулаев 1997). Выявлено 10 внутриклеточных (автолитических) пептидогликангидролаз (A1 – A10) различной локализации и субстратной специфичности (Цфасман *и др.*, 2007), которые в основном являются кислыми белками, активными при температуре оптимального роста бактерии (29°C), высоком значении ионной силы среды и щелочном значении pH, кроме эндопептидазы A7, представляющей собой щелочной белок. Установлена субстратная специфичность этих ферментов. A1, A8, и A10, проявляют глюкозаминидазную активность (по способности расщеплять субстрат для глюкозаминидаз – *p*-нитрофенил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- β -D-глюко-пиранозид (NADG)) (Цфасман *и др.*, 2007). Цитозольные ферменты

А4 и А9 являются мурамидазами (по расщеплению субстрата для мурамидаз – 3,4-динитрофенил-тетра-*N*-ацетил- β -*D*-хитотетраозид (DTAC) (Цфасман *и др.*, 2007; Ballardie *et al.*, 1972), а А3 и А6 являются *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин – амидазами (Цфасман *и др.*, 2007). Цитозольный фермент А5 проявляет диаминопимелиноил-аланин-эндопептидазную активность по отношению к пептидогликану *Lysobacter* sp. XL1 (по расщеплению пептидных связей пептидогликана и измерению количества высвобожденных NH_2 -групп (по методу Ghuysen и Strominger (Степная 2012)). Внутриклеточные ферменты локализованы в различных компартментах бактериальной клетки (ферменты А1–А7 обнаружены в цитозоле, А8 – в периплазме, А9, А10 – во фракциях клеточных стенок и мембран). В различных компартментах клетки обнаруживаются ферменты с одинаковой субстратной специфичностью. Например, глюкозаминидазы обнаружены в цитозоле, периплазме и мембранах; мурамидазы – в цитозоле и мембранах (Цфасман *и др.*, 2007).

Внеклеточные ферменты необходимы бактерии – “хозяину” для обеспечения пищей, энергией и защиты от конкурентов (Кулаев 2014). Ферменты представляют собой положительно заряженные термостабильные низкомолекулярные белки (21 – 29 кДа), проявляющие максимальную активность при щелочных значениях рН и низких значениях ионной силы (Степная *и др.*, 1996б; Цфасман *и др.*, 2007). AlpA (Л1) и AlpB (Л5) – эндопептидазы, обладающие двумя активностями: гидролизуют пептидогликан *S. aureus* как глицил-глицин-эндопептидазы и *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин-амидазы (Бегунова *и др.*, 2003; Васильева 2014; Кудрякова 2017) (рис. 4), Л2 – *N*-ацетилмурамоил-аланин-амидаза (Степная *и др.*, 1992; Бегунова *и др.*, 2003), Л3 – мурамидаза (Степная *и др.*, 1996), Л4 – эндопептидаза, проявляющая диаминопимелиноил-аланин эндопептидазную активность по отношению к пептидогликану *Lysobacter* sp. XL1 (Степная *и др.*, 2005).

1.6.2. Сериновые эндопептидазы AlpA и AlpB

Наиболее изученными из секретируемых внеклеточных ферментов *Lysobacter* sp. XL1 являются эндопептидазы AlpA и AlpB с молекулярными массами около 22 и 24 кДа, соответственно (Степная *и др.*, 1996; Муранова *и др.*, 2004; Vasilyeva *et al.*, 2014). AlpA и AlpB – термостабильные белки с температурными оптимумами 70°C и 80°C. Фермент AlpA сохраняет нативное состояние в достаточно широком диапазоне температур. Элементы его вторичной структуры сохраняются до 55°C, которая и является температурой полуинактивации для этого фермента. Для AlpB температура полуинактивации выше и равна 75°C, что свидетельствует о различиях в пространственной структуре (Tishchenko *et al.*, 2016).

Установлены структуры генов *alpA* и *alpB*, 1197 и 1200 н.о., соответственно. Размеры первичных транскриптов, вычисленные методом РНК-ДНК-гибридизации, составляют примерно 1500 н.о. Несмотря на близость расположения генов друг к другу, они не организованы в оперон, а транскрибируются независимо. Методом 5' RACE установлены стартовые точки транскрипции обоих генов. Для гена *alpA* 5'-нетранслируемая область составляет 134 н.о. и 140 н.о. для гена *alpB* (Lapteva *et al.*, 2012).

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов эндопептидаз AlpA и AlpB показало, что ферменты гомологичны друг другу на 61,5% и хорошо изученному ферменту α -литической протеазе *L. enzymogenes* на 78% и 58%, соответственно (Муранова *и др.*, 2004; Lapteva *et al.*, 2012).

Исследуемые ферменты относятся к классу сериновых протеаз (Степная *и др.*, 2005; Vasilyeva *et al.*, 2014). Активность ферментов AlpA и AlpB ингибируется фенолметилсульфонилфторидом, и не ингибируется этилендиаминтетрауксусной кислотой и *p*-хлормеркурийбензоатом, что исключает присутствие ионов металлов и тиоловых групп в активном центре ферментов, следовательно, они не относятся к металлоферментам. Фенолметилсульфонилфторид является специфическим необратимым ингибитором сериновых пептидаз, который взаимодействует с остатком серина в активных центрах сериновых протеаз. В аминокислотных последовательностях этих ферментов присутствуют каталитические триады аминокислотных остатков: His (H235 для AlpA, H234 для AlpB), Asp (D262 для AlpA, D261 для AlpB) и Ser (S343 для AlpA и AlpB), что подтверждает отношение ферментов AlpA и AlpB к семейству S1 сериновых протеаз (Fuhrmann *et al.*, 2004; Lapteva *et al.*, 2012).

Пространственная структура эндопептидаз AlpA и AlpB была изучена методом рентгеноструктурного анализа кристаллов (Tishchenko *et al.*, 2016; Кудрякова 2017). Для

третичной структуры этих ферментов характерна трипсинподобная укладка элементов вторичной структуры. Полипептидные цепи обеих эндопептидаз образуют два структурно различных гидрофобных домена, состоящих из антипараллельных β -цепей, между которыми расположен активный центр, представленный классической триадой аминокислот Ser–His–Asp. Подобная структура характерна для всех представителей семейства сериновых протеаз S1 клана PA. Было показано, что пространственные структуры AlpA и AlpB сходны между собой на 63% и близки структуре α -литической протеазы *L. enzymogenes*, при этом AlpA подобен на 84%, а AlpB на 60% (Fuhrmann *et al.*, 2004, 2006; Tishchenko *et al.*, 2016; Кудрякова 2017).

Подобно многим ферментам, секретлируемым грамотрицательными бактериями, эндопептидазы AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1, синтезируются в виде предшественников (Lapteva *et al.*, 2012). Предшественники белков (PreAlpA – 398 а.о., PreAlpB – 399 а.о.) содержат сигнальные пептиды (AlpA – 33 а.о., а AlpB – 28 а.о.), длинные N-концевые пропептиды (AlpA – 166 а.о., и AlpB – 166 а.о) и зрелые части (AlpA – 199 а.о., AlpB – 205 а.о) (Lapteva *et al.*, 2012). α -литическая протеаза из *L. enzymogenes*, также синтезируется как препрофермент, включающий сигнальный пептид (33 а.о), N-концевой пропептид (166 а.о) и зрелую часть (198 а.о) (Silen *et al.*, 1988).

Переход предшественника в активную форму происходит путем ограниченного протеолиза его белковой цепи, в результате чего формируется пространственная структура зрелой части, что приводит к сближению аминокислотных остатков активного центра и к появлению протеолитической активности (Серкина *и др.*, 2001). Предполагается, что пропептиды в неактивном состоянии непосредственно после синтеза ингибируют протеазную активность, далее в периплазматическом пространстве способствуют формированию функциональной активной третичной структуры фермента, выполняя функцию шаперона при сворачивании белковой глобулы – фолдинге (Серкина *и др.*, 2001).

При изучении α -литической протеазы было показано, что пропептид ингирует активность фермента в составе предшественника и способствует правильному сворачиванию зрелой нативной формы, действуя как катализатор фолдинга, стабилизирующий переходное состояние и направляющий сворачивание (Sauter *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1998; Voggs *et al.*, 1996). Гомология α -литической протеазы из *L. enzymogenes* с AlpA и AlpB позволяет предположить, что пропептиды этих ферментов также играют важную роль в фолдинге и секреции функционально активных зрелых форм.

Гомологичная AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 α -литическая протеаза из *L. enzymogenes*, использует секреторный механизм II типа (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*,

1992). На примере этого фермента Boggs и Agard предложили модель двухстадийной секреции внеклеточных протеаз (рис. 6) (Boggs *et al.*, 1996).

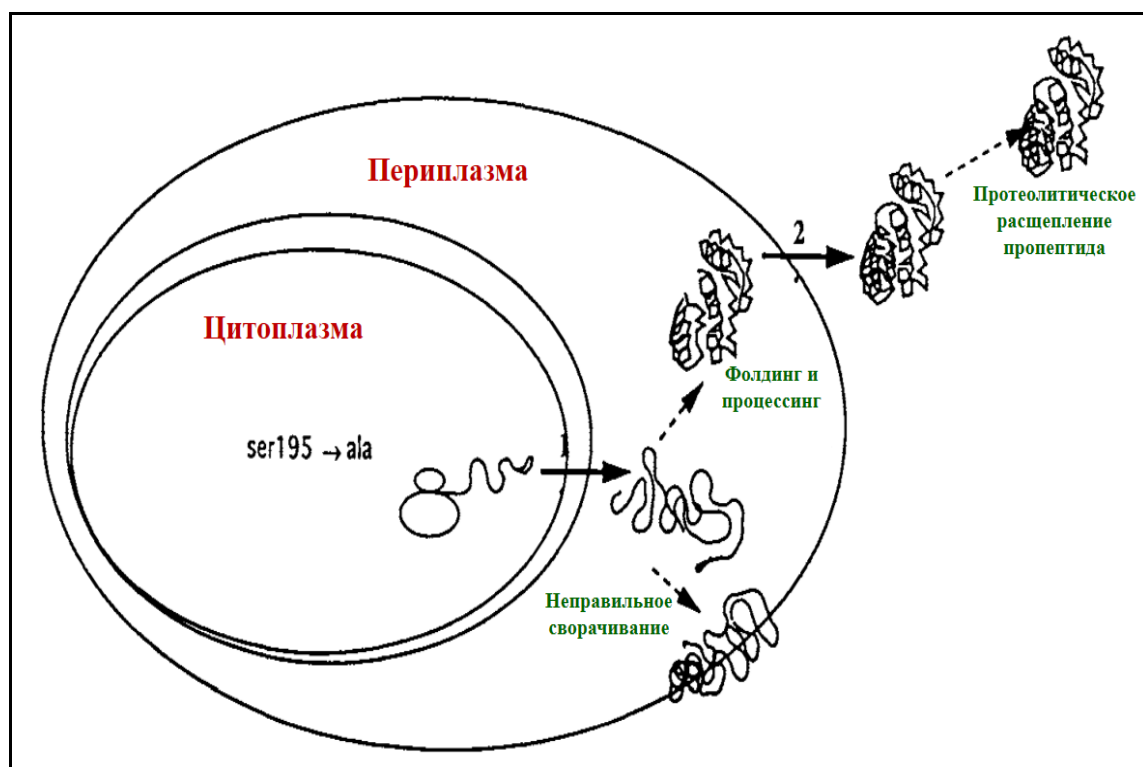


Рис. 6. Созревание α -литической протеазы (Boggs *et al.*, 1996).

Согласно модели Boggs и Agard, вначале препрофермент, пользуясь сигнальным пептидом, транспортируется через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство, где сигнальный препептид отщепляется специальной сигнальной пептидазой. В периплазме происходит сворачивание белка и его расщепление в месте соединения пропептида и зрелой формы протеазы. Пропептид и зрелый домен остаются нековалентно связанными друг с другом, образуя комплекс, который взаимодействует со специальными белками секреторного аппарата внешней мембраны и секретируется во внешнюю среду, после чего пропептид, выполнив свои основные функции, разрушается (Boggs *et al.*, 1996).

Секреция ферментов AlpA и AlpB осуществляется по-разному. Основываясь на сходном типе секреции, а также на высокой гомологии AlpA с α -литической протеазой *L. enzymogenes*, предполагается, что процесс секреции AlpA также состоит из двух этапов (рис. 7): (1) препрофермент проникает в периплазму через цитоплазматическую мембрану с процессингом препептида и (2) отщепление пропептида с образованием зрелого фермента

и его транслокация через внешнюю мембрану, которая требует, по-видимому, систему секреции II типа (Tishchenko *et al.*, 2016).

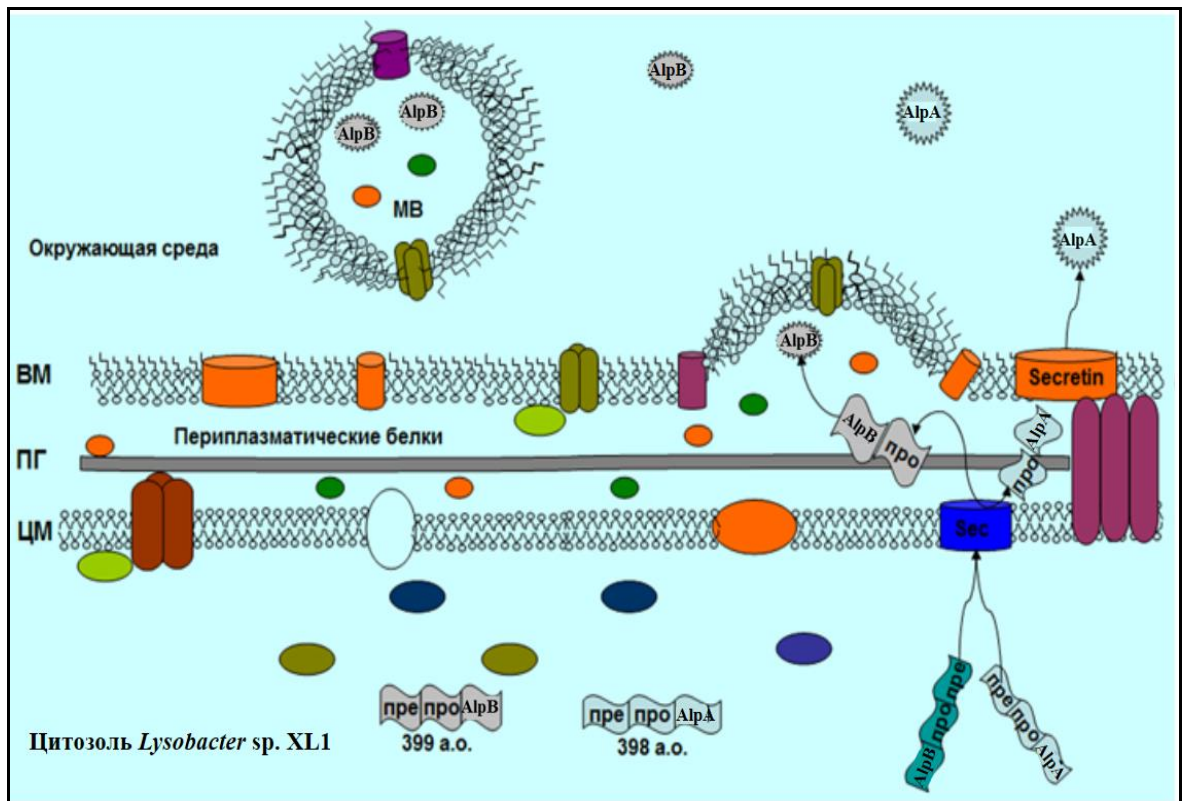


Рис. 7. Механизм секреции бактериолитических ферментов AlpA и AlpB *Lysobacter sp. XL1* из цитозоля в окружающую среду (Васильева 2010). **BM** – внешняя мембрана; **ЦМ** – цитоплазматическая мембрана; **ПГ** – пептидогликан; **MB** – мембранные везикулы; препроAlpA и препроAlpB – предшественники AlpA и AlpB, соответственно.

Эндопептидаза AlpB секретируется с помощью наружных мембранных везикул. Секреция белков посредством внешне-мембранных везикул является частью двухстадийной системы секреции II типа, обеспечивающей транспорт белков через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. Везикулы *Lysobacter sp. XL1* являются обособленными, замкнутыми, сферическими структурами с двойной мембраной, электронно-плотным внутренним содержимым и средним диаметром от 50 до 250 нм. По-видимому, так же, как и в случае AlpA, препептид способствует транслокации через цитоплазматическую мембрану посредством Sec-механизма, профермент AlpB трансформируется в зрелую форму, после чего захватывается везикулами по мере их образования (рис. 7) (Vasilyeva *et al.*, 2008, 2013; Васильева *и др.*, 2009; Kudryakova *et al.*, 2015, 2016).

1.6.3. Лизоамидаза.

На основе культуральной жидкости бактерии *Lysobacter* sp. XL1 разработан комплексный ферментный антибактериальный препарат лизоамидаза, обладающий широким антимикробным спектром действия в отношении патогенных микроорганизмов устойчивых к антибиотикам. Лизоамидаза была включена в реестр фармацевтических препаратов Российской Федерации в качестве лекарственного средства для местного применения (Tishchenko *et al.*, 2016). Литические свойства лизоамидазы обусловлены ферментами, входящими в ее состав, которые разрушают клеточные стенки бактерий, дрожжей, грибов и простейших (Кулаев 1984, 1997, 2014; Степная 2012).

Степная с соавт., предложили схему действия внеклеточного ферментного комплекса лизоамидаза, в которой фиксация положительно-заряженных литических ферментов – компонентов лизоамидазы является необходимым условием эффективного гидролиза связей пептидогликана и лизиса бактерии-мишени (рис. 8) (Степная *и др.*, 2004).

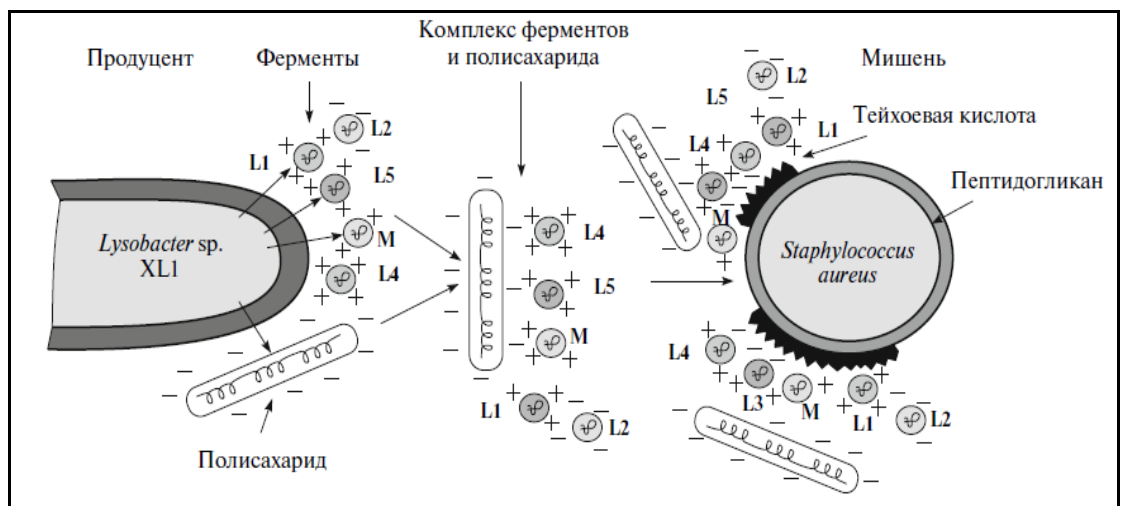


Рис. 8. Схема образования и функционирования фермент-полисахаридного комплекса *Lysobacter* sp. XL1 на грамположительные бактерии-мишени (Степная *и др.*, 2004; Кулаев 2014).

Бактерия – продуцент секретирует с окружающую среду положительно заряженные бактериолитические ферменты и отрицательно заряженный полисахарид, которые взаимодействуют друг с другом, образуя фермент-полисахаридный комплекс. Ферменты комплекса фиксируются на поверхности клеточной стенки бактерии-мишени за счет электростатического взаимодействия с анионными полимерами их клеточной стенки, что является необходимым условием эффективного гидролиза связей пептидогликана и лизиса бактерии-мишени (Степная *и др.*, 2004).

Внеклеточные литические гомологичные эндопептидазы AlpA и AlpB, секретируемые *Lysobacter* sp. XL1, близки по структуре и функциональной активности. Их иммунохимическое изучение предпочтительно проводить с помощью неперекрестных МА, направленных против различающихся уникальных для исследуемых белков эпитопов. МА могут быть эффективным инструментом при исследовании нерешенных вопросов секреции ферментов AlpA и AlpB, таких как: где и когда происходит полное отщепление пропептидов исследуемых ферментов, где происходит окончательное созревание функционально активных форм – в периплазме или в процессе транслокации через внешнюю мембрану. На основе МА возможно разработать количественный анализ лизоамидазы, определив содержание в нем отдельных литических ферментов. Полученные результаты будут использованы при создании новых антимикробных препаратов на основе рекомбинантных ферментов.

Подводя итог, следует отметить, что использование МА для иммунохимического исследования гомологичных ферментов AlpA и AlpB, является целесообразным. Так как уникальные свойства МА и методы идентификации, разработанные на их основе, позволят выявлять эти ферменты в любой сложнокомпонентной смеси. Успех иммунохимического подхода в первую очередь определяется качеством используемых антител. Несмотря на широкое применение МА в научно–исследовательской работе, на практике их получение к конкретному антигену представляет собой сложную самостоятельную научную задачу, что также относится к объектам данного исследования, для которых характерно сходство первичной и пространственной структур.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. НЕПРЯМОЙ ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Для определения относительного содержания специфических антител в сыворотках крови иммунных животных, в супернатантах гибридных клеток, асцитных жидкостях и очищенных препаратах МА был использован непрямой тИФА. Антигены (ProA, ProB, AlpA) на поверхность лунок планшетов для ИФА («Costar», США) сорбировали из концентрации 1 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6). AlpB иммобилизовали в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6), содержащем 0,0004% SDS после предварительного кипячения в течение 20 минут, в 0,1% SDS. Сорбцию проводили в течение ночи при 4°C. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% (w/v) раствором желатина в PBST в течение 30 мин. Затем в лунки планшета вносили исследуемые образцы. Иммунные сыворотки и асцитные жидкости предварительно разводили в PBST от 1:1000. Инкубацию с антигеном проводили 1 ч. при 20°C. Далее планшеты отмывали PBST не менее 6 раз, добавляли конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши («Sigma», США) с пероксидазой хрена в PBST, в разведении согласно инструкции производителя, инкубировали 40 мин. Для детекции использовали 4 мМ раствор *орто*-фенилендиамина («Sigma», США) – субстрата пероксидазы в цитрат–фосфатном буфере (26 мМ лимонная кислота, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 5,0), содержащем 0,003% (v/v) H₂O₂. После развития окраски реакцию останавливали добавлением равного объема 10% (v/v) серной кислоты и определяли оптическое поглощение при 490 нм с помощью мультипланшетного ридера Anthos 2020. Значение оптического поглощения в лунках без добавления специфических антител, соответствующее неспецифическому связыванию конъюгата с иммобилизованным антигеном (отрицательный контроль) вычитали из оптического поглощения в экспериментальной лунке.

2.2. ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ ЛИНИИ Balb/C ПРОПЕПТИДАМИ И ЗРЕЛЫМИ ФОРМАМИ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB *LYSOBACTER SP. XL1*

В работе использовали мышей линии Balb/C. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления, при свободном доступе к воде и пище. Исследования на животных проводили в соответствии с международными и российскими рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных.

Для иммунизации животных в качестве антигенов использовали рекомбинантные пропептиды (ProA, ProB) и зрелые формы (AlpA, AlpB), предоставленные лабораторией биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ им. Г.К. Скрыбина. Инъекции

проводили 2 – 3-х месячным мышам линии Balb/C, массой 20 – 25 г интраперитонеально по 10 мкг в объеме $0,20 \pm 0,05$ мл в расчете на одну мышь.

Иммунизацию проводили с использованием адьюванта Фрейнда. Первую инъекцию проводили в полном, последующие – в неполном адьюванте Фрейнда («Sigma», США). Перед иммунизацией антигены разводили в PBS, добавляли равный объем адьюванта Фрейнда, интенсивно перемешивали до образования стойкой водно–масляной эмульсии. Иммунизации проводили с интервалом две недели. Протоколы иммунизации животных представлены в таблицах 1 и 2.

В случае зрелой формы эндопептидазы AlpA использовали две схемы иммунизации. Первая схема совпадала с таковой для ProA и ProB. Согласно второй схеме в расчете на одно животное вводили 15 мкг антигена (первая инъекция) и 10 мкг (вторая инъекция) в объеме 200 мкл. Иммунизацию проводили подкожно в задние лапки, по 100 мкл в каждую.

Анализ сывороток иммунных животных проводили тИФА. Титром считали разведение сыворотки, при котором значение оптического поглощения в экспериментальной лунке превышало фоновое на два стандартных отклонения. В случае использования *орто*–фенилендиамина в качестве субстрата – значение A_{490} .

Таблица 1. Протокол иммунизации ProA, ProB, AlpA (схема 1) и AlpB.

Дата иммунизации	Доза антигена на одну мышь	Способ введения антигена
1-ый день	10 мкг, ПАФ	Внутрибрюшинно
14-ый день	10 мкг, НАФ	Внутрибрюшинно
28-ой день	10 мкг, НАФ	Внутрибрюшинно
42-ой день	10 мкг, НАФ	Внутрибрюшинно
56-ой день	10 мкг, НАФ	Внутрибрюшинно
63-ий день	Забор крови из хвостовой вены мыши	

Таблица 2. Протокол иммунизации эндопептидазой AlpA (схема 2).

Дата иммунизации	Доза антигена на одну мышь	Способ введения антигена
1-ый день	15 мкг, ПАФ	Подкожно, лапки
10-ый день	10 мкг, НАФ	Подкожно, лапки
13-ый день	Забор крови из хвостовой вены мыши	

После анализа сывороток крови, особям, демонстрирующим наибольшее значение титра, за три дня до процедуры гибридизации проводили бустерную иммунизацию.

Антигены (ProA, ProB, AlpA и AlpB) разводили в PBS и вводили интраперитонеально в количестве 10 мкг, в объёме 0,2 мл на мышшь.

2.3. ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ ЛИНИИ Balb/C ПЕПТИДАМИ ИЗ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ AlpB *LYSOBACTER SP. XL1*

2.3.1. Конъюгирование пептидов с KLH

Для получения МА против AlpB использовали пептиды, соответствующие участкам аминокислотной последовательности AlpB, конъюгированные с KLH. Конъюгацию проводили с помощью глутаральдегида. К 50 мг KLH добавляли 1 мл бидистиллированной воды, смесь подвергали ультразвуковой дезинтеграции, далее растворяли покачиванием в течение 4 часов при 4°C. Раствор KLH диализовали против 2-х литров 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,8 в течение ночи при 4°C и осветляли центрифугированием 10 000 g («Beckman TJ-6», США). К растворенному KLH добавляли 5 мг пептида. Сшивающий реагент (глутаральдегид) добавляли до концентрации 0,1%, после чего проводили инкубацию в течение 12 часов, мягко перемешивая, контролируя pH лакмусовой бумагой, при закислении раствор нейтрализовали щелочью. В результате получали конъюгаты пептидов с KLH, аликвоты препаратов хранили при -20°C (Avrameas *et al.*, 1969).

2.3.2. Иммунизация конъюгатами пептидов с KLH

С целью получения максимального иммунного ответа к зрелой форме эндопептидазы AlpB проводили подбор оптимальной схемы иммунизации пептидами, конъюгированными с KLH. Для иммунизации использовали три партии мышей линии Balb/C. Двух-трех месячных мышей иммунизировали интраперитонеально конъюгатами пептидов с KLH. Животным вводили 5, 10 и 20 мкг пептида, конъюгированные с 50, 100 и 200 мкг KLH в расчете на одно животное. Для первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, для двух следующих – неполный. Далее продолжали инъекции в PBS. Интервал между инъекциями составлял 2 недели. Было проведено не менее 6 иммунизаций. В таблице 3 представлена схема иммунизации конъюгатами пептидов с KLH.

Анализ иммунных сывороток оценивали тИФА по взаимодействию специфических антител с иммобилизованным AlpB. Иммобилизацию AlpB проводили тремя способами: 1) в 0,05M Na-карбонатном буфере при pH 13,4; 2) в 0,05 M Na-карбонатном буфере, pH 9,6, содержащем 2,5% фенола; 3) в 0,05 M Na-карбонатном буфере, pH 9,6, содержащем 0,0004% SDS с предварительным кипячением образца в 0,1% SDS.

Титром также считали такое разведение сыворотки, при котором «сигнал» превышает «фон» на два стандартных отклонения.

Таблица 3. Протокол иммунизации конъюгатами пептидов с KLH

Дата иммунизации	Взаимодействие сыворотки с иммобилизованным AlpB (титр) в ИФА <i>Доза конъюгата на одну мышь, (мкг пептида/мкг KLH)</i>			Способ введения антигена
	5/50	10/100	20/200	
1-ый день	–	–	–	Внутрибрюшинно, ПАФ
14-ый день	–	–	–	Внутрибрюшинно, НАФ
28-ой день	1:1 000	1:8 000	1:4 000	Внутрибрюшинно, НАФ
42-ой день	1:16 000	1:32 000	1:32 000	Внутрибрюшинно, PBS
56-ой день	1:16 000	1:32 000	1:32 000	Внутрибрюшинно, PBS
63-ий день	Забор крови из хвостовой вены мыши			

После анализа сывороток тИФА за три дня до процедуры гибридизации проводили бустерную иммунизацию препаратами пептидов, содержащими 100 мкг KLH и 10 мкг пептида, в объёме 0,2 мл на мышь.

2.4. ПОЛУЧЕНИЕ МА ПРОТИВ ПРОПЕПТИДОВ И ЗРЕЛЫХ ФОРМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB *LYSOBACTER SP.XL1*

2.4.1. Приготовление фидерного слоя макрофагов мыши

Перитонеальные макрофаги мыши использовали в качестве фидерного слоя. Макрофаги секретируют разнообразные ростовые факторы, поглощают дебрис, «мертвые» клетки, токсичные вещества, адаптируя ростовую среду, что приводит к пролиферации гибридом.

Для выделения перитонеальных макрофагов мышь усыпляли парами хлороформа или эфира и обрабатывали 70%-м этиловым спиртом. Закрепляли на препаровальном столике, делая надрезы вдоль лапок, высвобождая брюшную полость. Стерильным шприцем внутрибрюшинно вводили холодную среду ДМЕМ («Invitrogen», США), массируя пинцетом брюшную полость в течение 1 – 2 минут. Шприцем извлекали перитонеальную жидкость. Подсчитывали количество перитонеальных макрофагов в камере Горяева, не учитывая лимфоциты и эритроциты. Макрофаги центрифугировали 10

мин., 1000 об/мин на центрифуге («Heraeus Sepatech», США), ресуспендировали в среде ДМЕМ, содержащей 20% FCS («Invitrogen», США) и рассеивали на 96-луночные планшеты («Costar», США) за сутки до гибридизации.

2.4.2. Культивирование клеток мышинной миеломы SP2/0

Клеточная линия SP2/0 (ATCC № CRL1581) – миелома мыши (*Mus musculus*, В-лимфоциты) (Schulman *et al.*, 1978), морфологически подобная лимфобластам и растущая в суспензионной культуре. Эти клетки дефектны по ферменту ГГФРТ (гипоксантин–гуанин–фосфорибозилтрансферазе), что обуславливает их чувствительность к среде ГАТ («Sigma», США) и устойчивость к антиметаболиту 8–азагуанину.

Клетки мышинной миеломы SP2/0 размораживали, отмывали от среды для криоконсервации клеток средой ДМЕМ, не содержащей сыворотку, центрифугировали 10 мин., 1000 об./мин., на центрифуге («Heraeus Sepatech», США), ресуспендировали в жидкой питательной среде ДМЕМ, содержащей 5% FCS, и переносили во флаконы с фидерным слоем из макрофагов. Культивирование проводили при плотности клеток в культуре от 5×10^4 до 5×10^5 . Смену ростовой среды проводили каждые 2 – 4 дня.

При культивировании часть миеломных клеток SP2/0 теряет устойчивость к 8–азагуанину и становится способной расти и размножаться в среде ГАТ. При использовании таких измененных клеток для гибридизации, они будут размножаться в селективной среде, тормозя рост и маскируя вновь образовавшиеся гибридомные клетки. Поэтому, за несколько дней до процедуры гибридизации с иммунными лимфоцитами не менее двух раз питательную среду меняли на среду, содержащую 130 мкМ 8–азагуанина («Sigma», США) для удаления ревертантных клеток, содержащих «нормальный» уровень ГГФРТ, способных расти в среде ГАТ, т.е., для селекционного удаления клеток с «диким» фенотипом. Клетки наращивали до необходимого количества, добавляя по мере необходимости питательную среду, содержащую 5% FCS. Для гибридизации клетки миеломы собирали, центрифугировали (10 мин., 1000 об/мин, «Heraeus Sepatech», США), удаляли супернатант, ресуспендировали в питательной среде без сыворотки. Количество миеломных клеток определяли с помощью камеры Горяева.

2.4.3. Замораживание клеток

Для криоконсервирования гибридомных или плазмцитомных клеточных линий наращивали 5 – 10 млн. клеток в полной ростовой среде ДМЕМ. Клетки отмывали от ростовой среды при помощи центрифугирования 10 мин 1000 об./мин. («Heraeus Sepatech»,

США), супернатант удаляли. Далее осадок клеток суспендировали в среде для криоконсервации, содержащей 10% ДМСО («Sigma», США) и 90% FCS, суспензию переносили в криопробирки. Пробирки маркировали и замораживали в плотных пенопластовых контейнерах при температуре -70°C . Хранили в жидком азоте.

2.4.4. Получение иммунных спленоцитов мыши

Иммунную мышь усыпляли парами хлороформа, обрабатывали 70% этиловым спиртом, закрепляли на препаровальном столике. Стерильными инструментами вскрывали брюшную полость и стерильно извлекали селезенку либо подколенные лимфоузлы, которые переносили в чашку Петри с жидкой питательной средой ДМЕМ. Пинцетом измельчали ткань селезенки и лимфоузлов и переносили в центрифужную пробирку. Суспензию клеток центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 10 мин. («Heraeus Sepatech», США). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в питательной среде, количество клеток определяли, считая в камере Горяева.

2.4.5. Гибридизация клеток миеломы и лимфоцитов

Готовили суспензии лимфоцитов и миеломных клеток. После подсчета клеток отбирали их необходимое количество а затем смешивали две суспензии в пробирке (соотношение лимфоцитов к миеломным клеткам 10:1) и центрифугировали 10 мин., 1000 об./мин., («Heraeus Sepatech», США). После центрифугирования супернатант осторожно декантировали. Гибридизацию иммунных лимфоцитов и клеток миеломы осуществляли полиэтиленгликолем. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл раствора 50% раствора полиэтиленгликоля («Sigma», США) и перемешивали в течение 1 мин, стараясь распределить клетки в виде монослоя по стенкам пробирки. Через 1 мин по каплям добавляли питательную среду без сыворотки в течение 10 минут, постоянно перемешивая содержимое пробирки. Далее гибридизационную смесь центрифугировали (10 мин, 1000 об./мин., «Heraeus Sepatech», США), супернатант удаляли, клетки суспендировали в необходимом количестве среды ДМЕМ, содержащей 20% FCS, и селективной среды ГАТ, в которой выживают образовавшиеся гибридомы, чему способствуют особенности метаболизма, наследованные от родительских предшественников. Не слившиеся клетки такими свойствами не обладают, в результате чего происходит их массовая гибель. Клеточную суспензию переносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов (по 100 мкл в лунку) с предварительно приготовленным фидерным слоем перитонеальных

макрофагов и культивировали во влажной атмосфере при 5% CO² и 37°C (Köhler *et al.*, 1975).

2.4.6. Культивирование первичных гибридом в среде ГАТ

В процессе культивирования заменяли селективную среду ГАТ на ростовую среду с добавлением ГТ («Sigma», США), а далее – на ростовую среду. Первую смену селективной среды проводили на 3 сутки. Далее замену осуществляли по мере ее кондиционирования и закисления, ориентируясь на изменение цвета среды с красного на желтый (кислотно–основной индикатор – феноловый красный).

В ходе культивирования планшеты просматривали под микроскопом, оценивали морфологию растущих гибридных клеток, их пролиферативную активность. По мере необходимости осуществляли частичную смену среды в лунках. В лунках, где гибридные клоны имели достаточный размер для тестирования, отбирали надклеточные супернатанты, в которых проверяли содержание специфических антител против искомого антигена непрямым тИФА. Клетки из лунок, давших положительный сигнал в тИФА, наращивали в 24–х луночных культуральных планшетах, а затем во флаконах, каждый из которых содержал фидерный слой из макрофагов. По мере роста клеток надклеточные супернатанты неоднократно тестировали тИФА с целью отбора стабильных клонов-продуцентов МА.

2.4.7. Клонирование гибридом методом лимитирующих разведений

Гибридомы из лунок, давших положительный сигнал в тИФА, дважды клонировали. Для этого использовали 96–луночные культуральные планшеты с заранее приготовленным фидерным слоем перитонеальных макрофагов мыши. Клетки, которые необходимо клонировать, должны быть в логарифмической фазе роста. Суспензию гибридом с плотностью 10 клеток в мл высевали в культуральные планшеты по 100 мкл в лунку в питательной среде ДМЕМ, содержащей 20% FCS.

Через 7 дней проверяли культуральные планшеты на предмет наличия клонов и осуществляли частичную смену среды в лунках по мере необходимости. По мере роста клонов надклеточные супернатанты тестировали методом непрямого тИФА. Из каждого клонирования выбирали по 3 положительных клон, наращивали в необходимом количестве клетки индивидуальных клонов и для одного из них повторяли процедуру клонирования. После проведения клонирования и реклонирования гибридные клетки

отобранных клонов наращивали и замораживали в среде для криоконсервации по $0,5 - 1 \times 10^6$ клеток на ампулу, хранили при температуре -70°C или в жидком азоте.

2.4.8. Нарботка МА в асцитной жидкости мышей линии Balb/C

Гибридомы – продуценты МА, которые нужно наработать в препаративном количестве, наращивали в культуральных флаконах в питательной среде, содержащей 10% FCS. В логарифмической фазе роста клетки концентрировали центрифугированием (10 мин. 1000 об./мин., «Heraeus Sepatech», США) и суспендировали в 0,5 – 1 мл PBS. Суспензию гибридом вводили в перитонеальную полость мышей линии Balb/C, которые предварительно получили инъекции пристана (2,6,10,14–тетраметилпентадекана) («Sigma», США) повышающего способность гибридом расти в брюшной полости, по 0,2 мл, из расчета 1 – 3 млн. клеток на мышь. Гибридомные клетки вводили не ранее чем через 7 дней после введения пристана. Рост асцитной опухоли наблюдался через 5 – 10 дней после введения клеток примерно в 95% случаев.

Мышей со сформировавшейся асцитной опухолью усыпляли в парах хлороформа и шприцем отбирали асцитную жидкость и центрифугировали 10 мин., 1000 об./мин., («Heraeus Sepatech», США). Супернатант отбирали и хранили при -20°C до анализа и выделения иммуноглобулинов (Peters & Baumgarten 1992).

2.4.9. Определение типов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов

Определение типов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов проводили методом ТИФА с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши «Rapid ELISA mouse mAb Isotyping Kit» («Thermo scientific», США) согласно инструкции производителя. Для изотипирования использовали кондиционную среду гибридом, культивированных в течение 3 дней.

2.4.10. Очистка МА из асцитной жидкости методом аффинной хроматографии на белок А–агарозе

Для очистки иммуноглобулинов класса G был использован рекомбинантный белок А, конъюгированный с агарозой («ThermoFisher Scientific Pierce», США). Асцитные жидкости размораживали на водяной бане при $+37^\circ\text{C}$, центрифугировали 3000 об./мин. в течение 30 минут («Heraeus Sepatech», США). Супернатанты декантировали и разбавляли в 4 раза стартовым буферным раствором для аффинной хроматографии на белок А–агарозе (1,5 М глицин, 3 М NaCl, pH 8,9). Разбавленные асцитные жидкости выдерживали в

течение 1 ч. при комнатной температуре и осветляли центрифугированием при 3000 об./мин в течение 30 мин. Супернатанты декантировали и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,4 мкм. Разбавленные и профильтрованные асцитные жидкости наносили на уравновешенную стартовым буфером хроматографическую колонку с минимальной скоростью. После нанесения колонку с белок А–агарозой отмывали стартовым буфером. Антитела с носителя элюировали последовательно: 0,4 М раствором глицин–HCl (pH 4,0) и 0,4 М раствором глицин–HCl (pH 2,5). Элюаты собирали и немедленно нейтрализовали 1 М раствором Tris–HCl (pH 8,0). Растворы антител диализовали против PBS для удаления примесей из препаратов антител (Peters & Baumgarten 1992).

2.4.11. Определение концентрации белков

Концентрацию рекомбинантных антигенов (ProA, ProB, AlpA, AlpB) измеряли по методу Бредфорд (Bradford 1976), по поглощению при длине волны 592 нм на спектрофотометре Genesys 10 UN («Termo scientific», США).

Концентрацию очищенных иммуноглобулинов определяли на спектрофотометре Genesys 10 UN («Termo scientific», США) по поглощению при длине волны 280 нм, для расчета концентрации использовали весовой коэффициент экстинкции 0,74 (Hay & Westwood 2002).

2.4.12. Определение $K_{\text{афф}}$ иммуноглобулинов

$K_{\text{афф}}$ определяли по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987). Для определения $K_{\text{афф}}$ антиген сорбировали на ИФА–планшеты по 50 нг и по 20 нг на лунку в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6), инкубировали в течение ночи при +4°C. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% раствором желатина в PBST в течение 20 мин. Далее вносили последовательные разведения МА от концентрации 40 мкг/мл до 0,01 мкг/мл в объеме 50 мкл на лунку и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Далее реакцию проводили так же, как описано для метода непрямого тИФА. $K_{\text{афф}}$ антител вычисляли по формуле:

$$K_{\text{афф}} = (n-1)/2(n[Ab]' - [Ab]),$$

где $[Ab]'$ – концентрация антител, соответствующая их 50% связыванию от максимального при сорбции 20 нг антигена на лунку; $[Ab]$ – концентрация антител, соответствующая их 50% связыванию от максимального при сорбции 50 нг антигена на лунку. Отношение концентраций антигена выражали буквой n , в данном случае $n = 2,5$.

2.5. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ФОРМЫ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ AlpA

Рекомбинантный препарат AlpA денатурировали 10% ТХУ в течение ночи, при +4°C, далее центрифугировали 10 000 g, 10 мин («Beckman TJ-6», США). Осадок отмывали 4 раза холодным этиловым спиртом при тех же оборотах, далее суспендировали в PBS и иммунизировали мышей линии Balb/C (10 мкг антигена на одно животное). Перед инъекцией суспензию антигена в PBS эмульгировали с равным объемом адьюванта. Первую иммунизацию проводили в ПАФ, две следующие в НАФ, последнюю в PBS. Интервал между инъекциями составлял две недели. Сорбцию денатурированного AlpA для анализа титра сывороток тИФА проводили после кипячения фермента в течение 5 мин в 0,1% SDS. Титр сыворотки по взаимодействию с иммобилизованным из концентрации 1 мкг/мл, денатурированным AlpA, составил 1:500 000.

2.6. «СЭНДВИЧ»–ИФА НА ОСНОВЕ МА К ПРОПЕПТИДАМ И ЗРЕЛЫМ ФОРМАМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB.

2.6.1. Конъюгирование антител с биотином

Антитела биотинилировали, используя раствор N-гидроксисукцинимидного эфира биотина («Sigma», США) в ДМСО с концентрацией 1 мг/мл. Эфир биотина добавляли с 20-кратным молярным избытком. Смесь инкубировали 4 часа при комнатной температуре. Для удаления не прореагировавшего реагента смесь диализовали против PBS в течение ночи. Определение активности биотинилированных МА проводили методом непрямого тИФА по взаимодействию с иммобилизованным на пластик антигеном. Реакцию проявляли стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена («Sigma», США) в разведении согласно инструкции производителя. Для визуализации реакции также использовали *орто*-фенилендиамин (Hay & Westwood 2002).

2.6.2. «Сэндвич»–ИФА

В лунки планшетов для ИФА вносили МА «захвата» с концентрацией 10 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6) по 100 мкл на лунку и иммобилизовали в течение ночи при +4°C. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% раствором желатина в PBST в течение 30 мин, далее в экспериментальные лунки добавляли препараты исследуемых молекулярных форм эндопептидаз AlpA и AlpB (ProA, ProB, зрелые формы AlpA и AlpB) и биотинилированные антитела детекции (MAbio) в конечной концентрации 10 мкг/мл. В случае зрелой формы AlpB предварительно проводили денатурацию

добавлением 8 М NaOH до 0,16 М с последующей инкубацией в течение 7 минут при комнатной температуре и нейтрализацией 4 М Трис–HCl pH 7,0 до концентрации 0,5 М. Нейтрализацию контролировали лакмусовой индикаторной полоской. В контрольные лунки ИФА–планшета добавляли только биотинилированные антитела детекции (отрицательный контроль). Образовавшиеся иммунные комплексы обрабатывали конъюгатом пероксидазы со стрептавидином согласно инструкции производителя.

Также, как и в случае непрямого тИФА после каждой стадии планшеты отмывали избытком PBST не менее 6 раз. Детекцию проводили после обработки *орто*–фенилендиамином так же, как и в случае непрямого тИФА, измеряя оптическое поглощение при 490 нм. Эффективность реакции оценивали по соотношению «сигнал/фон» (отношение оптического поглощения в экспериментальных лунках к поглощению в контроле). Реакцию останавливают при достижении оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.

При подборе детектирующих пар антител в экспериментальные лунки планшета вносили искомый фермент в концентрации 100 нг/мл. При построении калибровочной кривой и определении минимальной детектируемой концентрации аналита фермент вносили в последовательных разведениях от 100 до 1×10^{-3} нг/мл.

Анализ содержания ProA, ProB и AlpA в образцах клеточных фракций и культуральных жидкостей проводили без дополнительных обработок. Исследуемые образцы вносили непосредственно в экспериментальные лунки, в случае необходимости для попадания в линейный диапазон измерения проводили разбавление образцов PBST.

При определении зрелой формы AlpB в клеточных фракциях образцы предварительно денатурировали добавлением NaOH до концентрации 0,16 М в течение семи минут и нейтрализовали 4 М Трис–HCl–буфером, pH 7,0.

При определении зрелой формы фермента AlpB в культуральной жидкости использовали последовательную денатурацию кислотой и щелочью. Образцы культуральных жидкостей обрабатывали 10% ТХУ в присутствии 0,2% Tween 20 в течение ночи при 4°C. Смесь центрифугировали 10 мин при 10 000 g («Beckman TJ–6», США). Осадки отмывали 4 раза холодным этиловым спиртом, высушивали и растворяли в буфере PBST, содержащем 0,16 М NaOH. Далее смесь нейтрализовали и проводили количественное определение AlpB.

Каждый эксперимент количественного анализа клеточной фракции сопровождали положительным и отрицательным контролями. В качестве положительного контроля для подтверждения калибровочного графика использовали 2 – 3 заведомо известных

концентраций исследуемого анализата. Отрицательным контролем служило неспецифическое связывание конъюгата стрептавидин пероксидазы с МА_{bio} и антителами «детекции». Значение оптической плотности в лунках отрицательного контроля вычитали из оптического поглощения экспериментальных лунок.

2.7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Электрофоретический анализ очищенных МА, а также клеточных фракций и культуральных жидкостей проводили в 12% полиакриламидном геле в присутствии β-меркаптоэтанола и SDS по методу Лэммли (Laemmly 1970) в камере типа Bio-Rad Mini Protean Tetra System («Bio-Rad», США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали «Prism Ultra Protein Ladder» (3,5–245 кДа, США). Электрофорез в концентрирующем геле проводили при силе тока 20 мА, в разделяющем – 100 мА. Гель окрашивали Coomassie G250 («ПанЭко», США).

2.8. ИММУНОБЛОТТИНГ

Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в присутствии β-меркаптоэтанола в 12% разделяющем геле, как описано ранее. Для получения иммуноэлектрофореграммы содержимое геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL («ГМВН», ФРГ) в течение 15 ч при силе тока 20 мА в буфере для переноса (25 мМ Трис–НСl, 0,25 М глицин, 0,1% додецилсульфат натрия, 20% метанол, рН 8,3). После переноса центры неспецифической сорбции блокировали 1% (w/v) раствором желатина в PBST (30 мин). Далее мембраны инкубировали в течение 2 ч: 1) с сывороткой мыши, полученной после иммунизации денатурированным AlpA, в разведении 1:10 000; 2) с МА против ProA – ProA–1 в концентрации 10 мкг/мл; 3) с МА против AlpB – P2AlpB–8 в концентрации 1 мкг/мл; 4) с МА против ProB – ProB–10 в концентрации 10 мкг/мл в PBST. После инкубации с антителами мембраны обрабатывали 1 ч конъюгатом пероксидазы хрена с кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши в разведении согласно рекомендации производителя, в PBST. На каждой стадии нитроцеллюлозные мембраны тщательно отмывали PBST. Сигналы визуализировали на рентгеновской пленке с помощью люминесцентного ECL–субстрата («ГМВН», ФРГ) (Burnett 1981; Остерман 1986).

2.9. ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ *LYSOBACTER SP. XL1*

Клетки *Lysobacter sp. XL1* выращивали на жидкой среде LB (600 мл), рН 7,5, при 29°C при перемешивании на качалке в течение 20 ч, что соответствует началу

стационарной фазы роста (Руденко *и др.*, 2014; Vasilyeva *et al.*, 2014), и отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 4 500 g в течение 20 мин. Полученный осадок трижды промывали 0,01 М Трис–HCl, pH 8,0. Периплазматическую фракцию клеток получали осмотическим шоком по методу Носсала и Хэппела с модификациями (Nossal *et al.*, 1966; Ситкин *и др.*, 2003). Для этого осадок клеток суспендировали в 33 mM Трис–HCl, pH 8,0, содержащем 40% сахарозу и 0,1 mM ЭДТА. Оптическая плотность суспензии клеток была равна 40 о.е. при 540 нм, что соответствовало $2,5 \times 10^{10}$ клеток в 1 мл. После 10 мин инкубации при комнатной температуре клетки центрифугировали при 18 000 g в течение 5 мин и отделяли надосадочную жидкость, которая представляла собой периплазматическую фракцию.

После осмотического шока клетки суспендировали в 50 mM Трис–HCl, pH 8,0, замораживали при -70°C и затем разрушали продавливанием под давлением 9 атмосфер на прессе, разработанном в ИБФМ РАН. Полученную массу центрифугировали при 8 000 g в течение 10 мин для удаления неразрушенных клеток. Далее гомогенат центрифугировали при 120 000 g в течение 1 ч. Надосадочная жидкость представляла собой цитоплазматическую фракцию, а осадок – клеточные стенки и мембраны. Фракцию мембран промывали дважды 50 mM Трис–HCl, pH 8,0, с последующим центрифугированием при той же скорости.

2.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Бактериолитическую активность определяли турбидиметрически по уменьшению поглощения при 540 нм суспензии автоклавированных клеток *Staphylococcus aureus* 209–P. Реакционная смесь для определения общей бактериолитической активности содержала 0,05 мл культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 и один мл суспензии клеток *S. aureus* 209–P в 0,01 М Трис–HCl буфере (pH 8,0). Смесь инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Реакцию останавливали, помещая пробирки в лед, и измеряли оптическую плотность при 540 нм. Уменьшение поглощения клеточной суспензии *S. aureus* на 0,01 при 37°C в течение 1 мин считали за одну единицу литической активности (ЛЕ) (Vasilyeva *et al.*, 2008).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ
3.1. ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ ГИБРИДОМНЫХ
КЛОНОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МА К ПРОПЕПТИДАМ И ЗРЕЛЫМ ФОРМАМ
ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB *LYSOBACTER SP. XL1*

3.1.1. Получение и иммунохимическая характеристика МА к ProA и ProB

3.1.1.1. Получение МА к пропептидам

Аминокислотные последовательности ProA (169 а.о.) и ProB (166 а.о.) также, как и зрелые формы, гомологичны друг другу на 60,4%. Значительное подобие первичной структуры пропептидов ProA и ProB предполагает использование МА для их исследования, узнающих уникальные эпитопы, характерные для индивидуальных пропептидов. Сравнение первичных структур, исследуемых пропептидов выявило около тридцати различающихся участков, содержащих не более трех аминокислот (Lapteva *et al.*, 2012). Часть из них входит в состав теоретически предсказанных эпитопов (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>), что позволило надеяться на получение специфичных МА (рис. 9).

ProA (1)	<u>AFAA</u> <u>DEV</u> <u>SPE</u> <u>LK</u> <u>FAM</u> <u>QR</u> <u>DL</u> <u>GI</u> <u>FP</u> <u>GQ</u> <u>IA</u> <u>QY</u> <u>LQ</u> <u>TE</u> <u>KL</u> <u>AR</u> <u>TQ</u> <u>AAA</u> <u>IER</u> <u>DL</u> <u>GS</u> <u>Q</u> <u>FA</u>
ProB (1)	--- <u>TD</u> <u>GL</u> <u>NPT</u> <u>LK</u> <u>LAM</u> <u>QR</u> <u>DL</u> <u>GI</u> <u>SS</u> <u>AQ</u> <u>VA</u> <u>QM</u> <u>VQ</u> <u>AD</u> <u>RI</u> <u>AT</u> <u>TQ</u> <u>EAA</u> <u>IR</u> <u>RT</u> <u>LG</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>YA</u>
ProA (53)	<u>GS</u> <u>WI</u> <u>ER</u> <u>NAD</u> <u>GS</u> <u>FK</u> <u>VVA</u> <u>AT</u> <u>AG</u> <u>AR</u> <u>KA</u> <u>SA</u> <u>IG</u> <u>GV</u> <u>EL</u> <u>RS</u> <u>VR</u> <u>HS</u> <u>LK</u> <u>QL</u> <u>ON</u> <u>SMA</u> <u>QL</u> <u>DAA</u>
ProB (50)	<u>GS</u> <u>WV</u> <u>ER</u> <u>NDD</u> <u>GS</u> <u>YR</u> <u>VVA</u> <u>AT</u> <u>SG</u> <u>AQ</u> <u>KS</u> <u>VAV</u> <u>AG</u> <u>VE</u> <u>LR</u> <u>HV</u> <u>RS</u> <u>LK</u> <u>QL</u> <u>ND</u> <u>SMA</u> <u>AL</u> <u>DRD</u>
ProA (105)	<u>SN</u> <u>AR</u> <u>VK</u> <u>GI</u> <u>SK</u> <u>PLD</u> <u>GV</u> <u>Q</u> <u>SW</u> <u>YVD</u> <u>PF</u> <u>SN</u> <u>AV</u> <u>VVR</u> <u>VD</u> <u>Q</u> <u>GAS</u> <u>ER</u> <u>AV</u> <u>DF</u> <u>VAV</u> <u>SG</u> <u>AD</u> <u>AGA</u>
ProB (102)	<u>ARR</u> <u>RV</u> <u>PG</u> <u>I</u> <u>SK</u> <u>LR</u> <u>SG</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>SW</u> <u>YVD</u> <u>PT</u> <u>IN</u> <u>SV</u> <u>VV</u> <u>SV</u> <u>AP</u> <u>GA</u> <u>DE</u> <u>EA</u> <u>ID</u> <u>F</u> <u>VAV</u> <u>SG</u> <u>AD</u> <u>ISS</u>
ProA (157)	<u>VR</u> <u>IE</u> <u>EV</u> <u>PG</u> <u>TL</u> <u>Q</u> <u>TS</u>
ProB (154)	<u>IR</u> <u>VE</u> <u>EA</u> <u>VG</u> <u>TP</u> <u>Q</u> <u>TT</u>

Рис. 9. Сравнение первичных структур пропептидов бактериолитических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter sp. XL1*, с помощью программы AlignX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Подчеркнуты теоретически рассчитанные эпитопы (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>).

Для получения МА в качестве антигенов использовали препараты рекомбинантных пропептидов ProA и ProB. Мышей иммунизировали интраперитонеально в полном или неполном адъювантах Фрейнда с двухнедельным интервалом не менее 6 раз.

Титры сывороток иммунных мышей определяли методом непрямого тИФА на планшетах с иммобилизованными пропептидами из концентрации 1 мкг/мл. Максимальный титр составлял 1:100 000. Как и предполагалось теоретически, вследствие значительной гомологии первичных структур антигенов, иммунные сыворотки демонстрировали высокую степень перекрестной реактивности по отношению к обоим антигенам – пропептидам. Для получения гибридом–продуцентов специфических МА, извлекали спленоциты тех мышей, сыворотки которых максимально взаимодействовали с антигеном, используемым для иммунизации, по сравнению с другими особями экспериментальной группы. При получении МА против ProA, титр иммунной сыворотки при взаимодействии с ProA составлял 1:100 000 и 1:50 000 – при взаимодействии с ProB; при получении МА против ProB, титр иммунной сыворотки при взаимодействии с ProB составлял 1:100 000 и 1:50 000 – при взаимодействии с ProA. Титры свидетельствовали о формировании достаточного пула плазматических клеток для получения гибридомных клеточных линий, стабильно продуцирующих МА, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Получение гибридом, продуцирующих МА к пропептидам эндопептидаз AlpA и AlpB, осуществляли с помощью гибридомной технологии, гибридизуя спленоциты с клетками миеломной линии SP2/0 с помощью полиэтиленгликоля в качестве агента, разжижающего клеточные мембраны, по методу Келлера и Мильштейна (Köhler *et al.*, 1975). Гибридные клоны выращивали в среде ДМЕМ, содержащей ГАТ и 20% FCS. Отбор гибридом, секретирующих специфичные антитела, проводили непрямым тИФА по взаимодействию с иммобилизованными соответствующими пропептидами. В ходе культивирования оценивали морфологию и пролиферативную активность растущих гибридных клеток, синтез антител и способность его сохранения на высоком уровне. В результате было отобрано по 20 гибридомных клеточных линий – продуцентов антител к ProA и к ProB, которые были дважды клонированы методом лимитирующих разведений. По результатам оценки пролиферативной активности и стабильности продукции антител индивидуальных клонов были отобраны стабильные гибридомы, секретирующие МА против пропептидов. Эти клоны были использованы для наработки МА *in vivo* в перитонеальных полостях мышей линии Balb/C, предварительно инъецированных пристаном.

Было получено 12 стабильных гибридных клонов, секретирующих МА против ProA и 12 – против ProB.

3.1.1.2. Иммунохимическая характеристика МА к пропептидам

Методом непрямого тИФА по взаимодействию с иммобилизованными нативными антигенами проверяли иммуноперекрёстную реактивность полученных МА. Только два антитела к ProA – ProA–1 и ProA–2 из двенадцати не обладали иммуноперекрёстной реактивностью с ProB и со зрелыми формами эндопептидаз AlpA и AlpB. Остальные десять МА эффективно взаимодействовали как с ProA, так и с ProB. Таким образом, в качестве инструмента исследования оказались пригодны только МА ProA–1 и ProA–2. Все двенадцать МА, полученные против ProB, не обладали иммуноперекрёстной реактивностью с ProA и со зрелыми формами эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемыми *Lysobacter* sp. XL1. Поэтому все полученные антитела против ProB были использованы для дальнейшего исследования.

Методом иммуноблоттинга была проверена способность не перекрестных МА к ProA и ProB взаимодействовать с денатурированными формами пропептидов. МА ProA–1 и ProA–2 в ходе иммуноблоттинга с рекомбинатным препаратом ProA взаимодействовали на нитроцеллюлозной мембране с белковой полосой с молекулярной массой близкой 20 кДа. Эта белковая полоса совпадала с полосой на картине электрофоретического разделения препарата ProA, используемого для иммунизации. При этом МА к ProA не взаимодействовали с денатурированным ProB и со зрелыми формами AlpA и AlpB. Автографы, полученные с использованием ProA–1 и ProA–2, не отличались друг от друга, в качестве примера на рисунке 8А представлен иммуноблоттинг для ProA–1.

Двенадцать МА против ProB взаимодействовали с рекомбинатным препаратом ProB, окрашивали на нитроцеллюлозной мембране белковую полосу с молекулярной массой около 20 кДа, которая соответствовала полосе ProB. Автографы, полученные с использованием МА к ProB, не отличались друг от друга, в качестве примера на рисунке 8Б представлен иммуноблоттинг для МА ProB–6. При этом МА к ProB также не взаимодействовали с денатурированным ProA и зрелыми формами. Таким образом, полученные антитела к ProA и к ProB не обладали иммуноперекрёстной реактивностью с денатурированными антигенами в иммуноблоттинге.

Взаимодействие МА с соответствующим ему денатурированным антигеном свидетельствует о направленности антител против конформационно–независимых или линейных эпитопов.

Иммуноблоттингом было также показано что, МА узнавали соответствующую денатурированную форму предшественника эндопептидаз AlpA или AlpB (PreAlpA с молекулярной массой около 40 кДа, PreAlpB с молекулярной массой около 41 кДа, рис. 10).

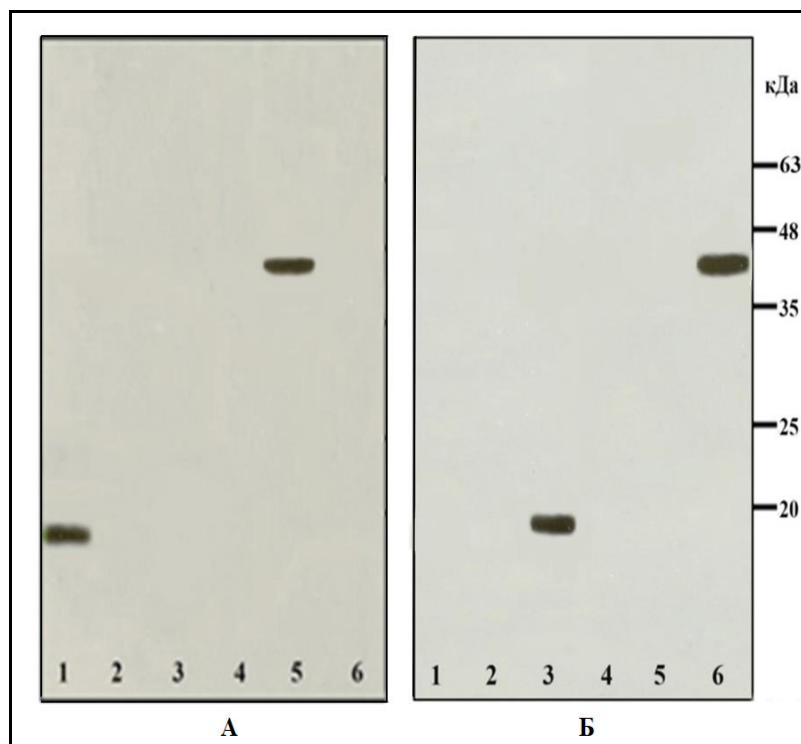


Рис. 10. Иммуноблоттинг с МА (А) – к ProA (ProA–1), (Б) – к ProB (ProB–6). 1 – ProA, 2 – зрелая форма AlpA, 3 – ProB, 4 – зрелая форма AlpB, 5 – PreAlpA, 6 – PreAlpB.

Все МА, продуцируемые полученными гибридными клонами, были изотипированы. Результаты изотипирования МА представлены в таблице 4. Все антитела относились к иммуноглобулинам класса G подклассу 1, имели в своем составе легкую цепь κ. Изотипические характеристики полученных антител позволили использовать для их очистки аффинную хроматографию на белок А–агарозе. Степень чистоты препаратов МА оценивалось электрофоретически и составляла не менее 95%. В результате очистки выделены электрофоретически гомогенные препараты антител, пригодные для получения их биотинилированных форм. В качестве примера на рисунке 11 представлены электрофореграммы МА, составляющих детектирующие пары.

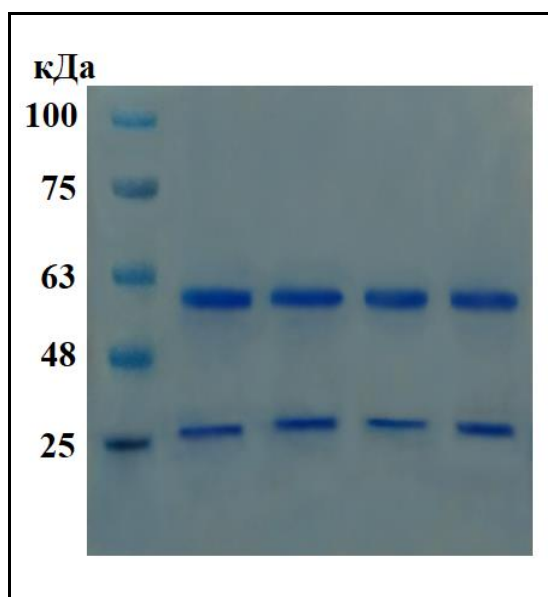


Рис. 11. Электрофореграмма МА к ProA и ProB в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS и β -меркаптоэтанола. **1** – смесь маркеров молекулярной массы, **2** – ProA–1, **3** – ProA–2, **4** – ProB–1, **5** – ProB–11.

Выход МА составлял не менее 1 мг на 1 мл асцитной жидкости. Антигенсвязывающую активность полученных препаратов МА оценивали непрямым тИФА по взаимодействию с иммобилизованными соответствующими пропептидами. Для определения степени сродства МА к антигенам были вычислены их $K_{афф}$ по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987). Для этой цели проводили неконкурентный тИФА, в котором антитела взаимодействовали с иммобилизованным из различных концентраций антигеном. При этом МА вносили в последовательных двукратных разведениях от концентрации $2,666 \times 10^{-7}$ М до $1,27 \times 10^{-13}$ М. Сигмоидный характер кривой зависимости оптического поглощения продуктов ферментативной реакции от концентрации МА в логарифмических координатах позволял определить концентрации антител, соответствующие 50% связыванию от максимального. На рисунках 12 и 13 представлены в качестве примера кривые титрования антител ProA–2 и ProB–4 для определения $K_{афф}$ при различных концентрациях иммобилизованных антигенов – ProA и ProB, соответственно.

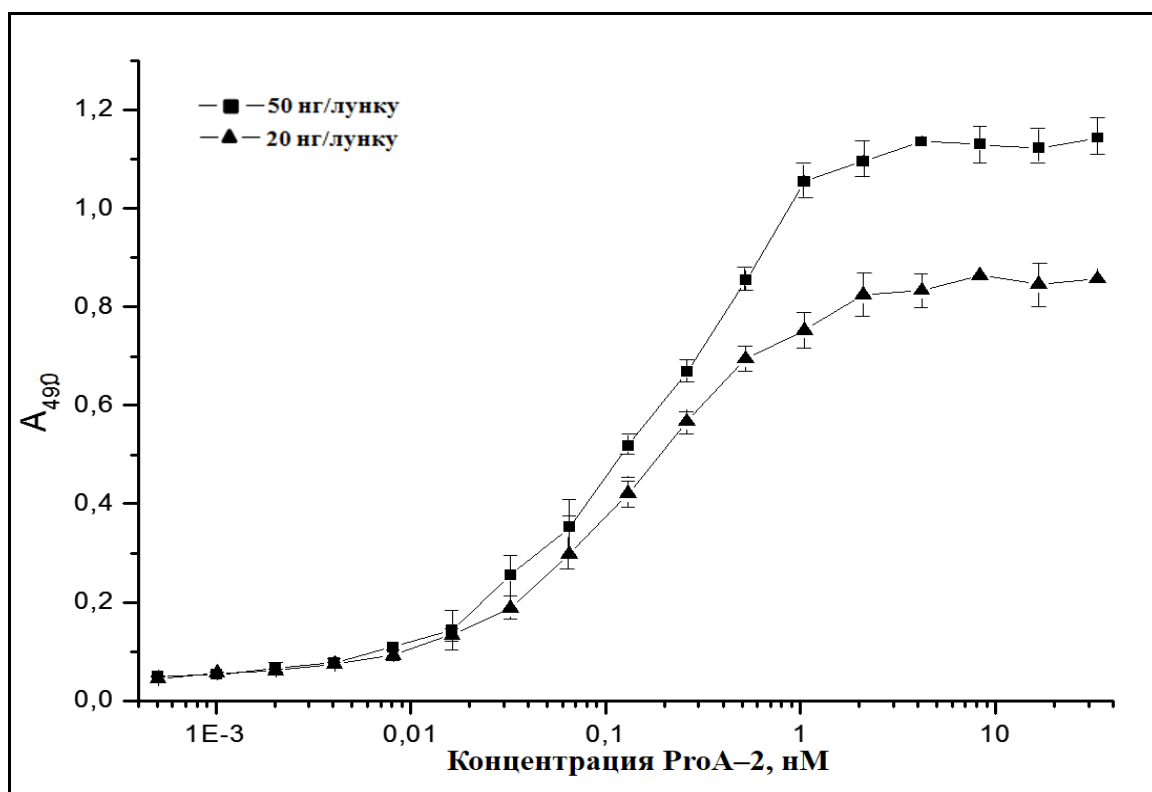


Рис. 12. Кривые титрования МА ProA-2 для определения $K_{\text{афф}}$ по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987) при загрузке ProA – 50 и 20 нг/лунку.

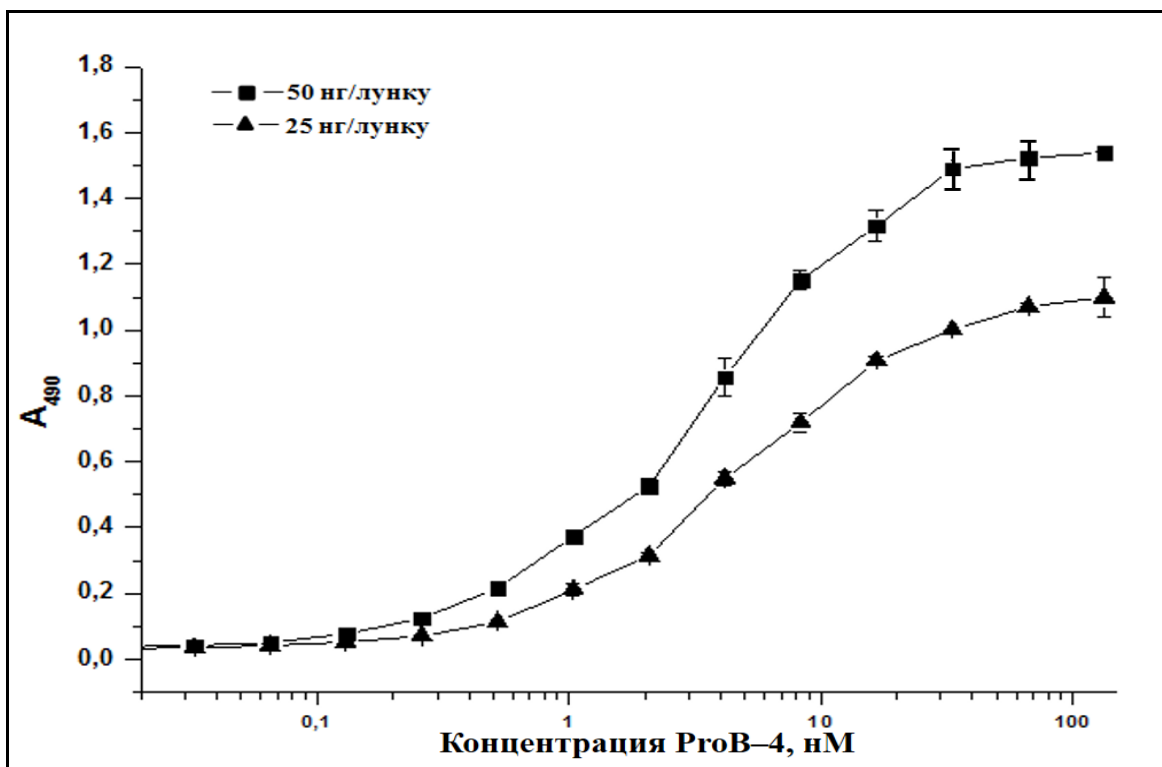


Рис. 13. Кривые титрования МА ProB-4 для определения $K_{\text{афф}}$ по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987) при загрузке ProB – 50 и 25 нг/лунку.

Полученные результаты показали, что МА обладали высоким сродством к антигену. Значения $K_{\text{афф}}$ МА против ProA составили: $3,5 \times 10^9$ и $2,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$; против ProB варьировали от $1,5 \times 10^8$ до $2,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Данные по иммунохимической характеристике МА против ProA и ProB суммированы в таблице 4.

Таблица 4. Иммунохимическая характеристика МА против ProA и ProB *Lysobacter* sp.XL1

Название антитела	$K_{\text{афф}}, \text{M}^{-1}$	Тип тяжелой и легкой цепи	Взаимодействие антител с антигенами, ИФА			
			ProA	ProB	AlpA	AlpB
ProA-1	$3,5 \times 10^9$	IgG1(κ)	+	-	-	-
ProA-2	$2,9 \times 10^9$	IgG1(κ)	+	-	-	-
ProB-1	$2,0 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-2	$8,2 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-3	$1,5 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-4	$2,2 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-5	$6,1 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-6	$2,2 \times 10^9$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-7	$8,9 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-8	$1,5 \times 10^9$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-10	$1,4 \times 10^9$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-11	$4,3 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-12	$1,0 \times 10^9$	IgG1(κ)	-	+	-	-
ProB-13	$5,3 \times 10^8$	IgG1(κ)	-	+	-	-

3.1.2. Получение и характеристика МА к зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB

3.1.2.1. Получение МА к зрелой форме AlpA

Получение МА к зрелым формам эндопептидаз AlpA (199 а.о.) и AlpB (205 а.о.) было осложнено высокой гомологией ферментов. Сравнение первичных структур зрелых форм AlpA и AlpB, представленное на рисунке 14, выявило в первичных последовательностях этих ферментов только пять различающихся участков размером три и более аминокислотных остатка (Lapteva *et al.*, 2012).

AlpA	(1)	VNVLGGIEYSINN-----ATLCSVGF SVTRGATKGFVTAGHC	GGVGAIVRI
AlpB	(1)	ATVQGGIEYRMPLPDGRVGLCSVGF PVTKGTIKGFATAGHCAKAGQSVQI	
		1	50
		Пептид №1	
AlpA	(47)	GGTOVGSFAARVFPGNDRAWVSVGSAHTLQGAVSNYSGGTIAIRGSAEAA	
AlpB	(51)	SGVNVGTFETASHFPNTDRAWVTIGAAHTLLGSVTNYTGGSVAVKGS TEAA	
		51	100
AlpA	(97)	IGAAVCRSGRTTGYRCGNITAKNVTANY-AEGAVRGLTQGNACMRGDSG	
AlpB	(101)	IGAAVCRSGRTTQYKCGTITAKNVTVNYGTLGTVSGLTRANNCTGRGDSG	
		101	150
AlpA	(146)	GSWFTSAGQAQGVMSGGNVQS-NGNCGIPASQRS SLFERVGPILSQYGL	
AlpB	(151)	GSWITAAGQAQGLTSGGNLPAGQNDNCSVPTSQRQTYFERINPVL SQYGL	
		151	200
		Пептид №2	
AlpA	(195)	SLVTS	
AlpB	(201)	ALVTS	
		201	

Рис. 14. Сравнение первичных структур эндопептидаз AlpA и AlpB с помощью программы AlignX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Подчеркнуты теоретически рассчитанные (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>) эпитопы, указаны последовательности синтезированных пептидов, квадратами отмечены различающиеся участки аминокислотных последовательностей.

С использованием алгоритма расчета антигенных детерминант (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>), были теоретически предсказаны эпитопы ферментов AlpA и AlpB. Аминокислотная последовательность большинства из них совпадала в первичных структурах зрелых форм ферментов (рис. 14). Только один различающийся участок с 39 по 45 аминокислотный остаток (по нумерации в молекуле AlpA) входил в состав теоретической антигенной

детерминанты на обеих молекулах. Анализ аминокислотных последовательностей показал низкую вероятность получения не перекрестных МА к линейным эпитопам. Однако отличия в первичной структуре могут способствовать формированию различающихся конформационных эпитопов, на которые теоретически возможно получить специфические МА.

Для получения гибридом, секретирующих не перекрестные МА к эндопептидазе AlpA, использовали два способа введения антигена и две схемы иммунизации рекомбинантным препаратом зрелой формы фермента. Титры иммунных сывороток, так же, как и в случае пропептидов, определяли с помощью непрямого ИФА при сорбции антигена из концентрации 1 мкг/мл. Максимальный титр составлял 1:256 000 при подкожной иммунизации и более 1:1 000 000 при внутрибрюшинной инъекции антигена. Однако при подкожной иммунизации иммунная сыворотка, полученная после иммунизации AlpA, несмотря на меньшие значения титра, практически не взаимодействовала с эндопептидазой AlpB. Гибридомы, секретирующие МА против зрелой формы фермента AlpA, так же, как и в случае пропептидов, получали по методу Келлера и Мильштейна (Köhler *et al.*, 1975).

Иммунные спленоциты, полученные от животного, иммунизированного интраперитонеально согласно схеме иммунизации №1 с максимальным относительным содержанием специфических антител против AlpA в сыворотке (титр составлял 1:2 000 000) и минимальным содержанием антител против AlpB (1:1 000 000), использовали для гибридизации с миеломными клетками. Было получено 15 гибридных клонов, демонстрирующих положительный сигнал в ИФА, но в конечном результате только два из них секретировали МА (AlpA-1 и AlpA-2), не обладающие перекрестной реактивностью с AlpB.

Согласно схеме иммунизации №2 мышей линии Balb/C иммунизировали подкожно, в задние лапки. Для получения гибридом использовали лимфоциты из подколенных лимфоузлов. В результате было получено еще тринадцать стабильных клонов-продуцентов МА против AlpA.

3.1.2.2. Получение МА к зрелой форме AlpB

При анализе антиген связывающей активности иммунных сывороток было выяснено, что эндопептидаза AlpB не иммобилизуется на пластик для ИФА в стандартных условиях (0,05М бикарбонатный буфер pH 9,6). Поэтому были подобраны специальные условия сорбции этого фермента на иммунопланшеты: 1) с pH 13,4; 2) с добавлением

фенола; 3) с предварительным кипячением в SDS. Иммунизацию антигена при анализе иммунных сывороток проводили всеми разработанными методами.

Варьирование способов иммунизации рекомбинантным препаратом зрелой формы эндопептидазы AlpB не привело к получению не перекрестных МА. МА, полученные после иммунизации AlpB, одинаково узнавали оба фермента. Поэтому, для получения МА, специфически узнающих только AlpB, и предотвращения иммуноперекрестных реакций для иммунизации использовались пептиды, аминокислотная последовательность которых соответствовала максимально отличающимся от AlpA фрагментам первичной структуры AlpB, т.е., являлась уникальной только для этого фермента (рис. 14).

Были синтезированы два пептида: №1 EYRMPLPDGRVGLK, содержащий аминокислотные остатки с 8 до 20 и №2 KLPAGQNDNCSVP, содержащий аминокислотные остатки с 169-ого по 180-ый в первичной последовательности фермента AlpB (рис. 14). Заряженные аминокислоты в составе выбранных пептидов предполагали их гидрофильные свойства, а также вероятное расположение выбранных аминокислотных последовательностей на поверхности белковой глобулы. В пространственной структуре гомологичной ферментам AlpA и AlpB α -литической протеазы из *Lysobacter enzymogenes* участки аминокислотной последовательности, соответствующие выбранным пептидам, располагались на поверхности [PDB 2ALP] (Fujinaga *et al.*, 1985). Участки, соответствующие последовательностям выбранных пептидов, полностью совпадали в первичных структурах α -литической протеазы из *L. enzymogenes* и AlpA, что предполагает сходство их пространственных структур, что и было показано в работе Тищенко с соавт. (Tishchenko *et al.*, 2016).

При синтезе к С-концу первого и к N-концу второго пептида были добавлены остатки лизина для введения NH₂-групп, необходимые для последующей конъюгации с белком-носителем. Для придания иммуногенных свойств пептиды конъюгировали с KLH глутаровым альдегидом (Avrameas *et al.*, 1969). Полученные конъюгаты использовали для иммунизации мышей линии Balb/C.

Сыворотки крови животных, полученные после иммунизации конъюгатом KLH с пептидом №1, взаимодействовали с ферментом при всех используемых условиях сорбции. Иммунные сыворотки, полученные после иммунизации конъюгатом KLH с пептидом №2, взаимодействовали с ферментом, сорбированным после кипячения образца (денатурации) в присутствии SDS. Т.е., антитела узнавали только денатурированный образец AlpB, что свидетельствовало о недоступности линейной антигенной детерминанты в пространственной структуре нативного белка.

На рисунке 15 представлена пространственная структура AlpB на которую с помощью программы Chimera 1.11.2 были наложены аминокислотные последовательности пептидов №1 и №2. Участок аминокислотной последовательности, соответствующий пептиду №1 оказался экспонирован на поверхности белка. Участок первичной структуры, соответствующий пептиду №2 не локализован в пространственной структуре AlpB (Кудрякова 2017).

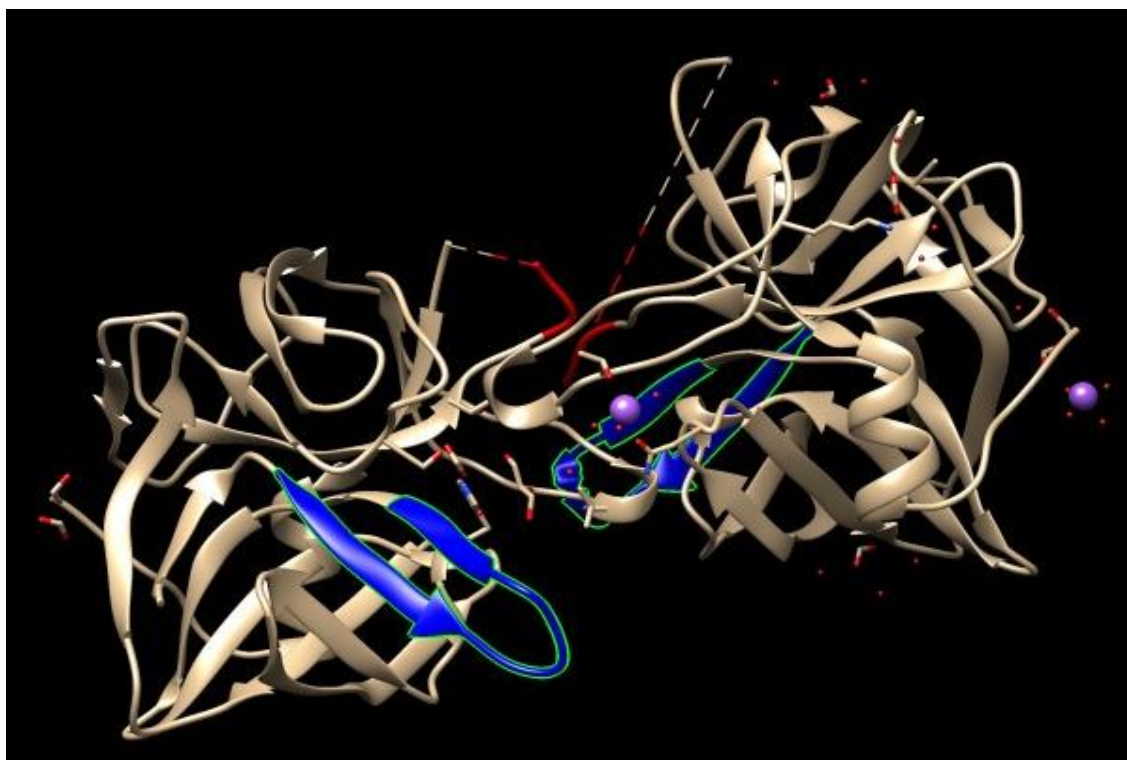


Рис. 15. Структура молекулы белка AlpB в ассиметричной части ячейки (Кудрякова 2017). Наложение аминокислотных последовательностей пептидов на структуру AlpB. Синим цветом изображен пептид №1, красным – пептид №2.

В результате иммунизации максимальные титры сывороток животных, иммунизированных как пептидом №1, так и пептидом №2, были достигнуты после введения 10 и 20 мкг конъюгированного пептида в расчете на одно животное и составили 1:32 000. Селезенки иммунных животных, сыворотки которых демонстрировали наибольшее содержание антител к AlpB, были использованы для гибридизации с миеломными клетками линии SP2/0. Отбор гибридомных клонов, секретирующих МА, проводили по взаимодействию надклеточных супернатантов с иммобилизованным на пластик рекомбинантным препаратом AlpB в 0,05M Na-карбонатном буфере, pH 9,6, содержащем 0,0004% SDS с предварительным кипячением в 0,1% SDS.

В результате было получено 1 МА после иммунизации конъюгированным с KLH пептидом №1: P1A_{1pB}-6. После иммунизации конъюгированным с KLH пептидом №2 было получено 4 МА: P2A_{1pB}-4, P2A_{1pB}-5, P2A_{1pB}-8, P2A_{1pB}-9.

3.1.2.3. Иммунохимическая характеристика МА к зрелым формам

Иммуноперекрестная реактивность МА к A_{1pA} по отношению к эндопептидазе A_{1pB} была проверена в условиях максимальной сорбции A_{1pB} подобранных при взаимодействии с иммунной сывороткой. Ни одно из этих условий сорбции нельзя считать нативным. Показано, что при этих условиях сорбции A_{1pB}, полученные МА против фермента A_{1pA} не взаимодействовали с эндопептидазой A_{1pB}.

Все полученные МА против зрелой формы A_{1pA} не взаимодействовали с денатурированной формой эндопептидазы A_{1pA}, что было проверено методом иммуноблоттинга, а также непрямого тИФА с использованием иммобилизованного денатурированного A_{1pA}. Это свидетельствовало о направленности антител против конформационных эпитопов фермента и об их способности специфически взаимодействовать только с нативной формой эндопептидазы A_{1pA}. Также показано, что ни одно из 15 полученных МА к A_{1pA} не обладало иммуноперекрестной реактивностью с нативными пропептидами эндопептидаз A_{1pA} и A_{1pB}.

Все полученные антитела к эндопептидазе A_{1pB} узнавали только фермент A_{1pB} и не обладали иммуноперекрестной реактивностью по отношению к гомологичной эндопептидазе A_{1pA} и пропептидам.

МА к зрелым формам ферментов A_{1pA} и A_{1pB} характеризовали также, как и антитела к пропептидам. Иммунохимическая характеристика полученных антител к зрелым формам представлена в таблице 5. Было проведено изотипирование МА, согласно которому, все антитела относились к иммуноглобулинам класса G. МА, полученные к эндопептидазе A_{1pA}, имели в своем составе тяжелую цепь $\gamma 1$, за исключением антител A_{1pA}-8 и A_{1pA}-11.1, тяжелая цепь которых – $\gamma 2a$ и антитела A_{1pA}-16, имеющего в своем составе тяжелую цепь $\gamma 2b$. Все антитела, полученные к A_{1pA} и A_{1pB}, имели в своем составе легкую цепь κ , за исключением антител A_{1pA}-2 и A_{1pA}-19, имеющих в своем составе легкую цепь λ . Все МА, полученные к эндопептидазе A_{1pB}, принадлежали к подклассу IgG1. Так же, как и в случае МА против пропептидов из асцитных жидкостей аффинной хроматографией на белок А-агарозе были получены препараты МА к A_{1pA} и A_{1pB}. Содержание иммуноглобулинов в препаратах, оцененное с помощью электрофореза,

составляло не менее 95%, в качестве примера на рисунке 16 представлены электрофореграммы МА, составляющих детектирующие пары.

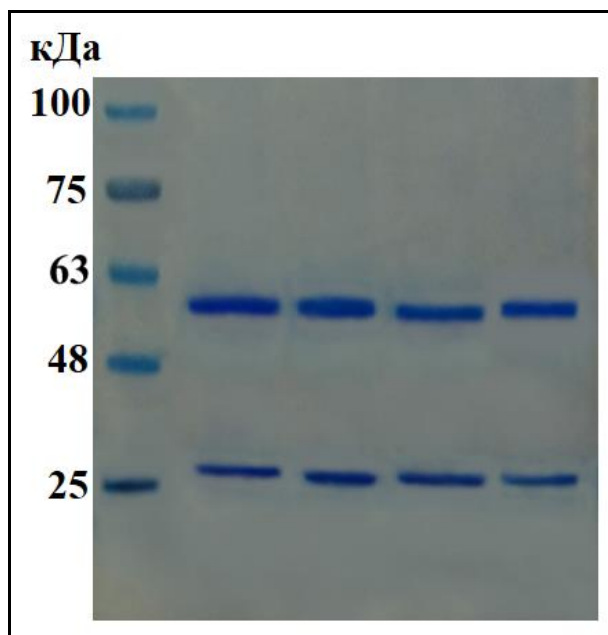


Рис. 16. Электрофореграмма МА к AlrA и AlrB в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS и β -меркаптоэтанола. **1** – смесь маркеров молекулярной массы, **2** – AlrA-18, **3** – AlrA-21, **4** – P1AlrB-6, **5** – P2AlrB-4.

Определены $K_{\text{афф}}$ МА. Значения $K_{\text{афф}}$ антител, приведенные в таблице 5, свидетельствуют о высокой степени связывания полученных МА со зрелыми формами ферментов. Значения $K_{\text{афф}}$ антител против AlrA варьировали в пределах от $1,1 \times 10^7$ – $5,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, при этом значения $K_{\text{афф}}$ у пяти антител были выше 10^9 M^{-1} . Значения $K_{\text{афф}}$ МА против AlrB варьировали от $1,5 \times 10^7$ – $3,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. На рисунке 17 приведены кривые титрования антитела AlrA-18 для определения $K_{\text{афф}}$.

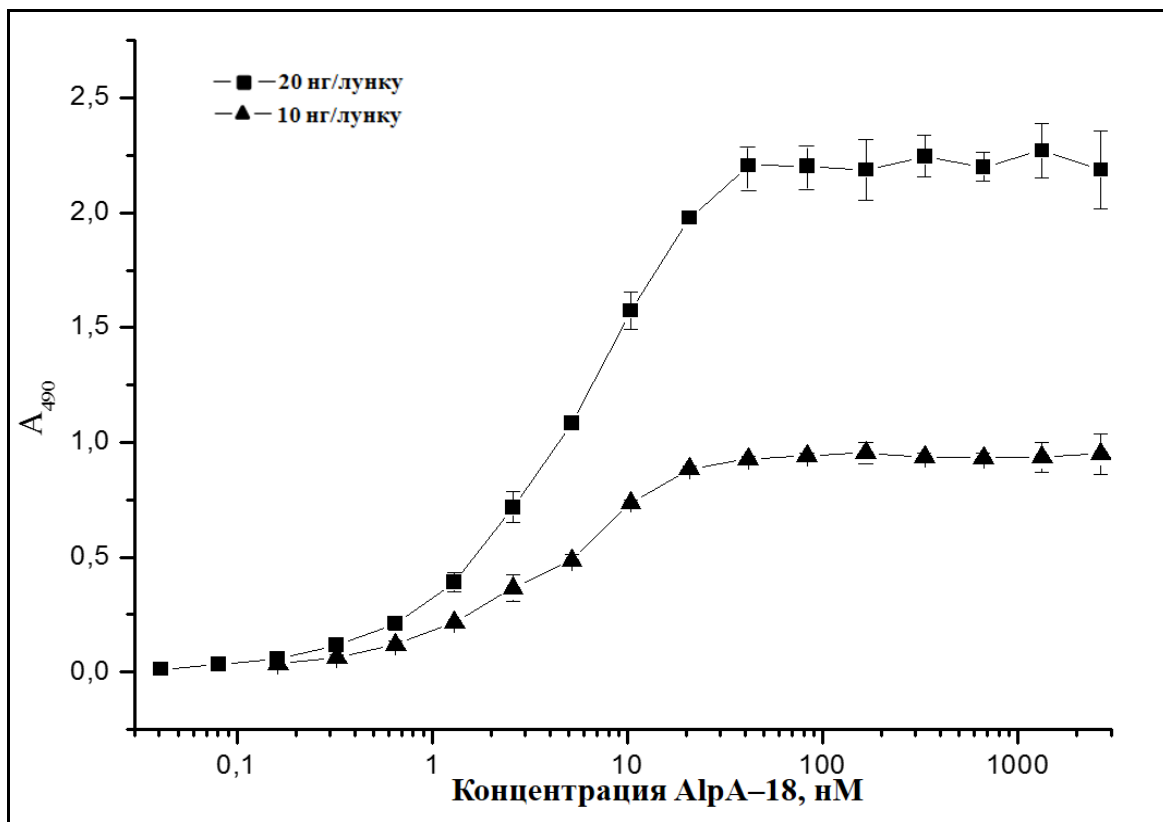


Рис. 17. Кривые титрования МА AlpA-18 для определения $K_{афф}$ по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987) при загрузке по ферменту 20 и 10 нг/лунку.

Таблица 5. Иммунохимическая характеристика МА против зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp.XL1.

Название антитела	$K_{афф}$, M^{-1}	Тип тяжелой и легкой цепи	Взаимодействие антител с антигенами, ИФА			
			AlpA	AlpB	ProA	ProB
AlpA-1	$1,1 \times 10^9$	IgG1(κ)	+	-	-	-
AlpA-2	$2,2 \times 10^9$	IgG1(λ)	+	-	-	-
AlpA-8	$8,7 \times 10^8$	IgG2a(κ)	+	-	-	-
AlpA-9	$3,0 \times 10^9$	IgG1(κ)	+	-	-	-
AlpA-11.1	$7,4 \times 10^8$	IgG2a(κ)	+	-	-	-
AlpA-11.6	$1,3 \times 10^8$	IgG1(κ)	+	-	-	-
AlpA-13	$1,4 \times 10^9$	IgG1(κ)	+	-	-	-
AlpA-14	$5,5 \times 10^9$	IgG1(κ)	+	-	-	-

Продолжение Таблицы 5						
AlpA–15	$7,3 \times 10^8$	IgG1(κ)	+	–	–	–
AlpA–16	$8,4 \times 10^7$	IgG2b(κ)	+	–	–	–
AlpA–17	$3,6 \times 10^8$	IgG1(κ)	+	–	–	–
AlpA–18	$4,0 \times 10^8$	IgG1(κ)	+	–	–	–
AlpA–19	$7,5 \times 10^8$	IgG1(λ)	+	–	–	–
AlpA–20	$4,8 \times 10^8$	IgG1(κ)	+	–	–	–
AlpA–21	$7,5 \times 10^8$	IgG1(κ)	+	–	–	–
P1AlpB–6	$2,0 \times 10^7$	IgG1(κ)	–	+	–	–
P2AlpB–4	$3,2 \times 10^8$	IgG1(κ)	–	+	–	–
P2AlpB–5	$5,8 \times 10^7$	IgG1(κ)	–	+	–	–
P2AlpB–8	$3,0 \times 10^8$	IgG1(κ)	–	+	–	–
P2AlpB–9	$1,5 \times 10^7$	IgG1(κ)	–	+	–	–

Таким образом, были получены не перекрестные высоко специфические МА, направленные против уникальных эпитопов зрелых форм ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

3.2. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОПЕПТИДОВ И ЗРЕЛЫХ ФОРМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB LYSOBACTER SP. XL1 НА ОСНОВЕ ПОЛУЧЕННЫХ МА

Для количественного определения содержания зрелых форм ферментов AlpA и AlpB и их пропептидов в сложных биологических смесях были разработаны детектирующие тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА на основе специфических, полученных в данной работе МА. При этом аналитические методы для количественного определения пропептидов эндопептидаз AlpA и AlpB и зрелой формы AlpA разрабатывались для нативной формы белка, а анализ зрелой формы эндопептидазы AlpB – денатурированной.

В основе «сэндвич»–ИФА лежит использование МА к отдаленно расположенным на поверхности белковой глобулы эпитопам, что позволяет им одновременно взаимодействовать с молекулой антигена, не препятствуя друг другу. Такой подход дает возможность детектировать искомый белок в многокомпонентных препаратах, таких как

клеточные лизаты, препараты клеточных фракций, культуральные жидкости и т.п. (рис. 18).

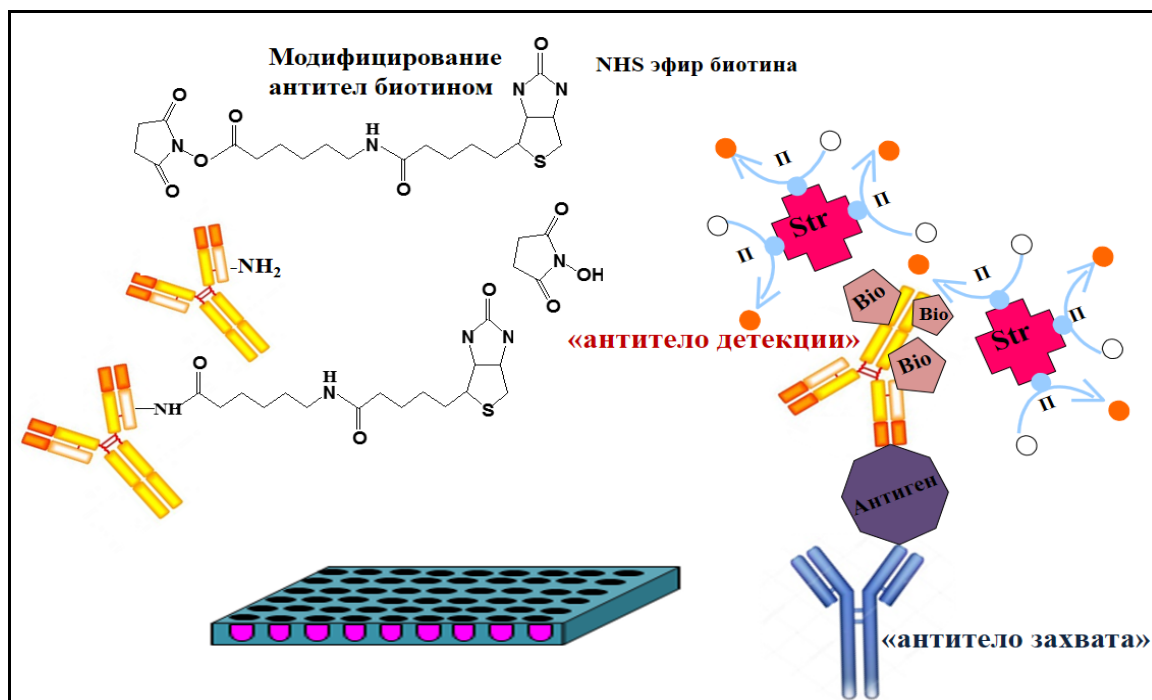


Рис. 18. Схема детекции пропептидов и зрелых форм AlrA и AlrB в биологической смеси методом «сэндвич»-ИФА

Для создания тест-систем количественного определения пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlrA и AlrB в формате твердофазного «сэндвич»-ИФА были проверены все возможные сочетания МА друг с другом, где каждое антитело было использовано как в качестве антитела «захвата» (нижнего), так и в качестве антитела «детекции» (верхнего). В случае разработки тест-системы для определения AlrB в каждом сочетании использовали одно из антител к пептиду №1, а другое – к пептиду №2.

В качестве антител детекции использовали их биотинилированные формы (MA_{bio}). Образовавшиеся в ходе реакции иммунные комплексы выявляли конъюгатом пероксидазы со стрептавидином, взаимодействующим с верхними биотинилированными детектирующими антителами. Детекцию проводили после обработки растворимым хромогенным субстратом для пероксидазы – *орто*-фенилендиамином с максимумом поглощения при 490 нм. Эффективность детектирующей пары антител по выявлению искомого анализата оценивали по соотношению «сигнал/фон» (отношение оптической плотности в экспериментальных лунках с добавленным антигеном к оптической плотности в лунках без добавления антигена). Детектирующей парой антител считали такое сочетание

МА, при котором значение соотношения «сигнал/фон» было не менее двух. При выборе детектирующей пары предпочтение отдавалось парам с наименьшим неспецифическим взаимодействием антител «детекции» с иммобилизованными антителами «захвата».

Пределом детекции, определяемым тест-системой, считали концентрацию аналита, соответствующую значению оптической плотности при длине волны 490 нм, достоверно превышающую показатель фоновой оптической плотности тест-системы на два стандартных отклонения.

3.2.1 Разработка тест-систем для количественного определения ProA, ProB и зрелой формы эндопептидазы AlpA

При разработке тест-систем для количественного определения пропептидов и зрелой формы AlpA были проверены: 2 сочетания антител против ProA, 132 – против ProB и 210 – против зрелой формы AlpA. В результате для пропептидов было выявлено 72 пары МА, для которых значение соотношения «сигнал/фон» было больше трех. Для 30 пар МА против AlpA наблюдалось соотношение «сигнал/фон» больше двух. Многие из проверенных сочетаний МА не выявляли антиген, что можно объяснить стерическим экранированием эпитопов при их близком расположении на поверхности белковой глобулы. Число возможных перспективных вариантов сокращалось также вследствие высокой неспецифической сорбции некоторых антител при их использовании в качестве «детектирующих».

МА ProA-1 и ProA-2 детектировали антиген в обоих сочетаниях, в которых каждое из антител использовалось как в качестве верхнего («захвата»), так и нижнего («детекции»). Этот факт свидетельствует о том, что эпитопы этих МА пространственно удалены на поверхности белковой глобулы ProA и, следовательно, не препятствуют взаимодействию друг друга с антигеном. Для каждого из этих сочетаний определяли минимальную детектируемую концентрацию антигена (табл. 6 и 7). В качестве «рабочего» сочетания для определения содержания ProA была выбрана «детектирующая пара» ProA-2 + Pro-1bio, которая демонстрировала меньшее значение предела определения, которое равнялось 1,5 нг/мл.

В случае «сэндвич»-ИФА с МА против ProB было выявлено, что все детектирующие пары антител, выявляющие ProB в реакционной смеси, включают в свой состав либо ProB-1, либо ProB-5 в сочетании с любым другим антителом панели. При этом ProB-1 и ProB-5 могут выступать как в качестве антител «захвата», так и антител «детекции». В то же время ProB-1 и ProB-5 детектировали антиген в сочетании друг с

другом. Эти данные свидетельствуют о том, что эпитопы MA ProB-1 и ProB-5 пространственно удалены на поверхности белковой глобулы антигена, а также удалены от эпитопов оставшихся 10 MA полученной панели. Таким образом, на поверхности пространственной структуры ProB существует как минимум три антигенных участка, доступных для взаимодействия с полученными MA, схематичный пример их расположения на белковой поверхности представлен на рисунке 19.

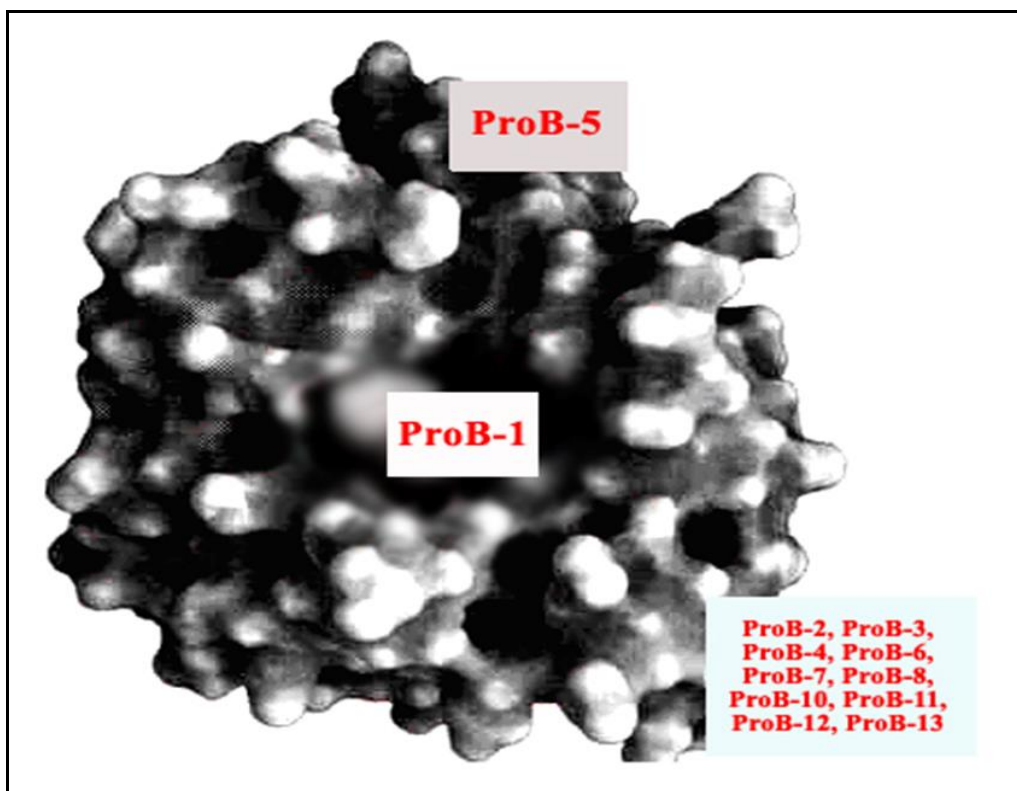


Рис. 19. Условная схема расположения эпитопов MA против ProB на поверхности ProB.

Соотношение «сигнал/фон» у пар антител к ProB варьировало в широких пределах от 3 до 16. В таблице 6 были приведены сочетания MA к ProB, которые демонстрировали соотношение «сигнал/фон» более 10. Антитела, в том числе и MA ProB-5, которые демонстрировали высокую неспецифическую сорбцию (высокое значение оптической плотности в контроле) в дальнейшей работе не использовались.

Таблица 6. Список детектирующих пар МА для определения ProA и ProB в формате «сэндвич»–ИФА

№ п/п	Антитело «захвата» (нижнее)	Антитело «детекции» (верхнее, bio)	Соотношение «сигнал/фон»	Предел детекции, нг/мл
1	ProA–1	ProA–2bio	10	3
2	ProA–2	ProA–1bio	15	1,5
3	ProB–4	ProB–1bio	10	0,2
4	ProB–4	ProB–5bio	10	н.о
5	ProB–5	ProB–1bio	16	н.о
6	ProB–5	ProB–2bio	16	н.о
7	ProB–5	ProB–3bio	16	н.о
8	ProB–5	ProB–10bio	16	н.о
9	ProB–5	ProB–11bio	16	н.о
10	ProB–5	ProB–13bio	12	н.о
11	ProB–6	ProB–1bio	16	0,2
12	ProB–7	ProB–5bio	10	н.о
13	ProB–8	ProB–5bio	16	н.о
14	ProB–1	ProB–2bio	10	0,8
15	ProB–1	ProB–8bio	10,5	0,2
16	ProB–1	ProB–10bio	16	0,2
17	ProB–1	ProB–11bio	16	0,2
18	ProB–1	ProB–13bio	11	0,4

н.о. – не определяли

Для пар с наиболее высоким соотношением «сигнал/фон» определяли минимальную детектируемую концентрацию антигена (табл. 6 и 7). Пять детектирующих пар МА против ProB выявляли антиген с минимальной концентрацией 0,2 нг/мл, а некоторые пары имели более высокий предел детекции (пары 14 и 18). Для дальнейшей работы была выбрана пара ProB–1 + ProB–11bio, так как в этом случае наблюдались наименьшие фоновые значения, соотношение «сигнал/фон» равнялось 16, а предел детекции – 0,2 нг/мл.

Таблица 7. Список детектирующих пар МА для определения зрелой формы эндопептидазы AlpA в формате «сэндвич»–ИФА

№	Антитело «захвата» (нижнее)	Антитело «детекции» (верхнее, bio)	Соотношение «сигнал/фон»	Предел детекции, нг/мл
1	AlpA–9	AlpA–17bio	6,5	н.о
2	AlpA–14	AlpA–1bio	3,4	н.о
3	AlpA–15	AlpA–2bio	3,8	н.о
4	AlpA–17	AlpA–9bio	18,1	0,4
5	AlpA–17	AlpA–11.1bio	17,5	0,4
6	AlpA–17	AlpA–11.6bio	9,0	н.о
7	AlpA–17	AlpA–13bio	21,3	0,4
8	AlpA–17	AlpA–14bio	Больше 30	0,4
9	AlpA–17	AlpA–19bio	8,05	н.о
10	AlpA–17	AlpA–21bio	7,7	н.о
11	AlpA–18	AlpA–9bio	7,2	н.о
12	AlpA–18	AlpA–11.1bio	8,5	н.о
13	AlpA–18	AlpA–11.6bio	8,6	н.о
14	AlpA–18	AlpA–13bio	7,6	н.о
15	AlpA–18	AlpA–14bio	9,0	н.о
16	AlpA–18	AlpA–19bio	5,5	н.о
17	AlpA–18	AlpA–21bio	Больше 30	0,2
18	AlpA–20	AlpA–11.1bio	1,9	н.о
19	AlpA–20	AlpA–11.6bio	2,0	н.о
20	AlpA–20	AlpA–13bio	2,0	н.о
21	AlpA–20	AlpA–14bio	1,9	н.о

н.о. – не определяли

Анализ взаимодействия МА со зрелой формой эндопептидазы AlpA в «сэндвич»-ИФА (табл. 7) свидетельствует о наличии более чем 5 конформационных эпитопов на поверхности белковой глобулы эндопептидазы. Пять детектирующих пар МА (AlpA-17 + AlpA-9bio, AlpA-17 + AlpA-11.1bio, AlpA-17 + AlpA-13bio, AlpA-17 + AlpA-14bio, AlpA-18 + AlpA-21bio) выявляли AlpA при соотношении «сигнал/фон» более 17,5 (табл. 7). Для каждой из этих пар антител была проверена иммуноперекрестная реактивность по отношению к гомологичной эндопептидазе AlpB. С этой целью в экспериментальные лунки добавляли эндопептидазу AlpB. Ни одна из исследованных пар антител не выявляла фермент AlpB даже в следовых количествах. Следовательно, МА против AlpA, составляющие детектирующие пары, не обладали иммуноперекрестной реактивностью по отношению к нативному ферменту AlpB.

Как и в случае пропептидов для пар с наиболее высоким соотношением «сигнал/фон» определяли минимальную детектируемую концентрацию антигена (табл. 7). Пары МА: AlpA-17 + AlpA-9bio, AlpA-17 + AlpA-11.1bio, AlpA-17 + AlpA-13bio, AlpA-17 + AlpA-14bio выявляли зрелую форму эндопептидазы AlpA вплоть до концентрации 0,4 нг/мл. Для пары AlpA-18 + AlpA-21bio наименьшее определяемое значение концентрации AlpA равнялось 0,2 нг/мл. Поэтому эта пара МА была выбрана в качестве инструмента количественного определения фермента AlpA.

Для выбранных пар были построены калибровочные кривые для определения концентрации пропептидов и зрелой формы эндопептидазы AlpA, представленные на рисунках 20, 21 и 22. Линейные диапазоны составили: для ProA – 1,5 – 100 нг/мл; для ProB – 0,2 – 6,25 нг/мл; для зрелой формы AlpA – 0,2 нг/мл – 3,1 нг/мл. Ошибка измерений при определении ProA и ProB составляла 6,0%, при определении зрелой формы AlpA – 5%.

Если при использовании тест-системы поглощение A_{490} исследуемого образца превышало область линейного диапазона, то эксперимент повторяли с разбавлением препарата с целью попадания в линейный диапазон для более точного определения.

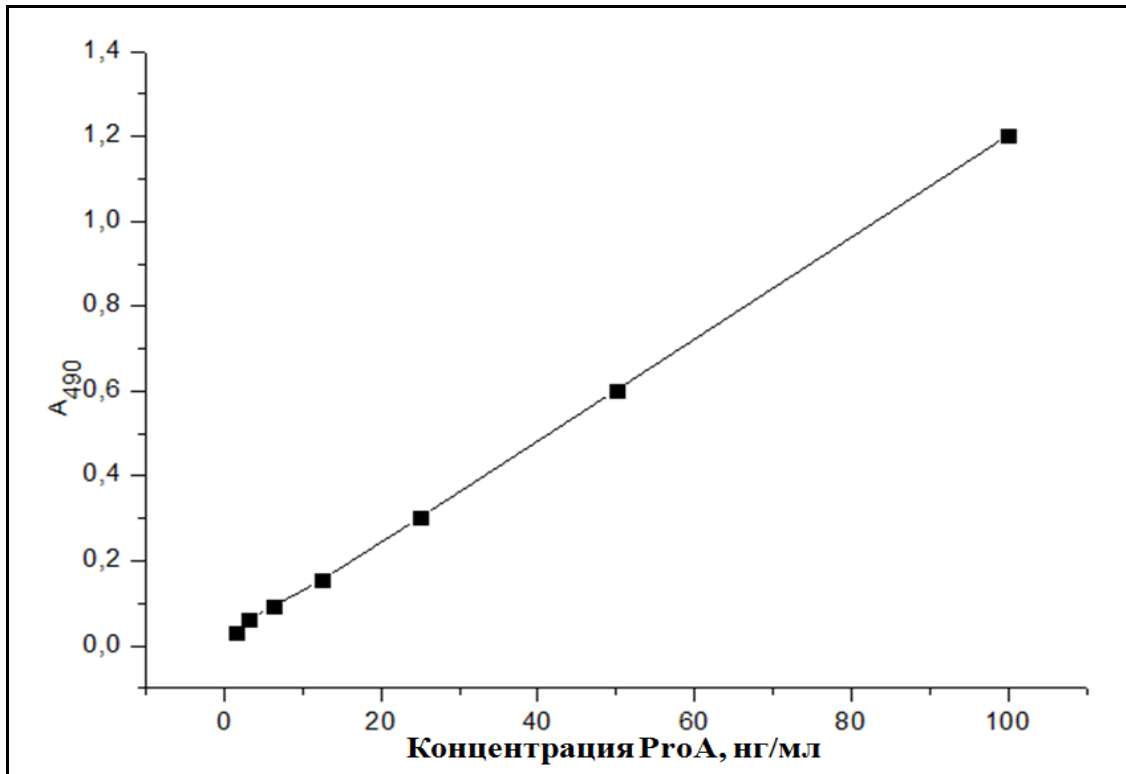


Рис. 20. Калибровочный график для определения концентрации ProA с помощью пары МА ProA–2 + ProA–1bio.

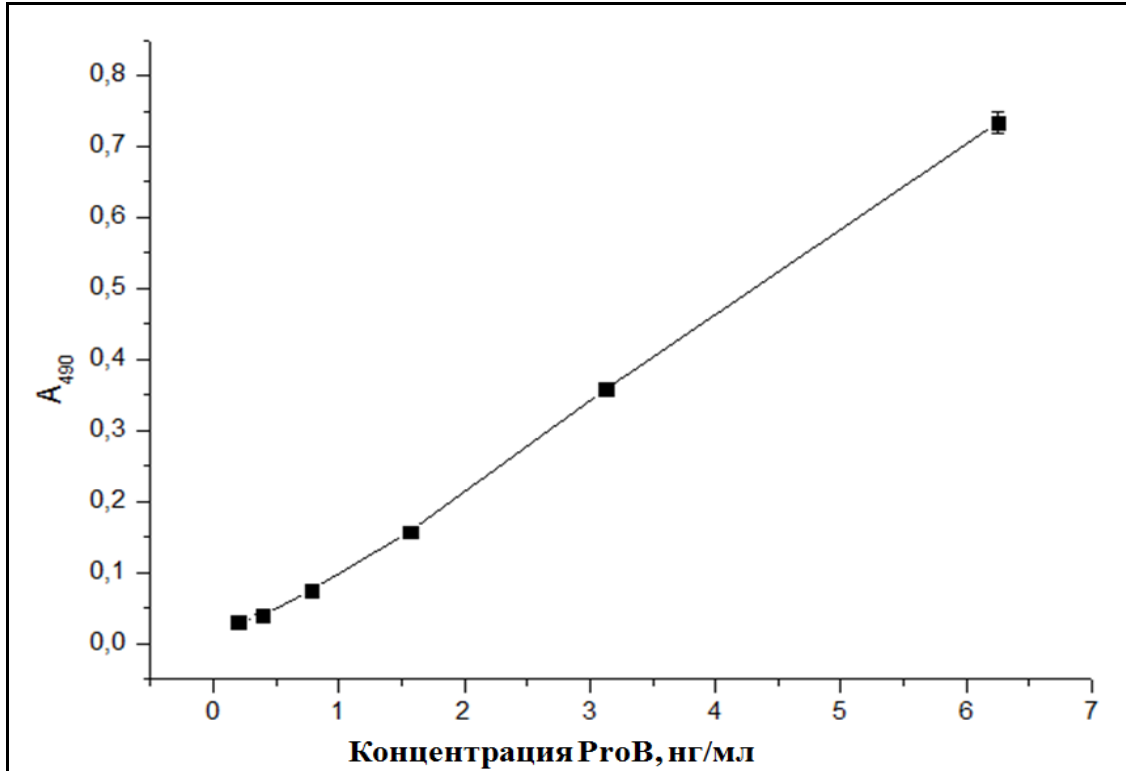


Рис. 21. Калибровочный график для определения концентрации ProB с помощью пары МА ProB–1 + ProB–11bio.

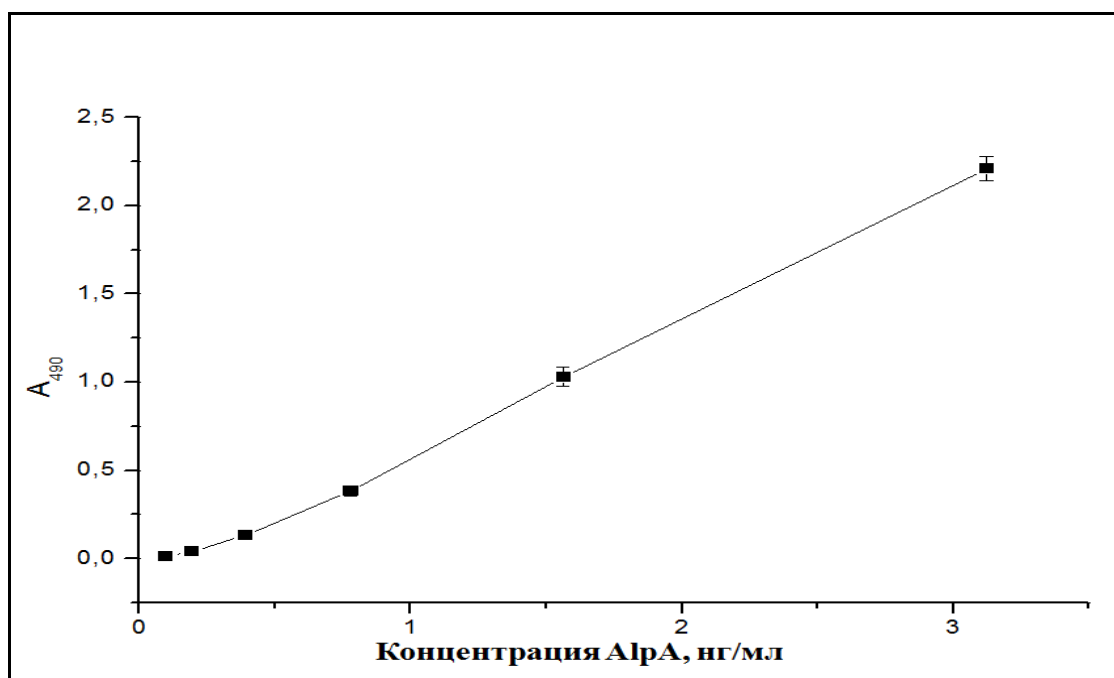


Рис. 22. Калибровочный график для определения концентрации зрелой формы фермента AlrA с помощью пары МА AlrA–18 + AlrA–21bio.

3.2.2. Разработка тест–системы для количественного определения зрелой формы эндопептидазы AlrB

Было выявлено, что МА, полученные к пептиду №1, взаимодействовали с AlrB при всех подобранных условиях сорбции, а антитела, полученные к пептиду №2, взаимодействовали только с белком, обработанным SDS. Поэтому тест–систему для количественного определения фермента AlrB, возможно было разработать только для определения денатурированной формы белка. Сложные биологические смеси, такие как культуральные жидкости и клеточные лизаты, представляют собой концентрированные белковые растворы, склонные к агрегации, поэтому требуют особых условий денатурации. Применение детергентов, в том числе и SDS, в «сэндвич»–ИФА невозможно, так как внесение их в тест–систему приводит к денатурации не только антигена, но и составляющих тест–систему антител. Денатурация щелочью с последующей нейтрализацией 4 М раствором Трис–HCl, pH 7,0 позволила денатурировать белки в концентрированных растворах без агрегации и внесения детергентов. Ионная сила в нейтральном растворе составила 0,5 М, что уменьшало возможные неспецифические взаимодействия антител и не препятствовало их работе.

Было проанализировано 4 сочетания МА, в каждом из которых одно из антител было к пептиду №1, а другое – к пептиду №2, результаты представлены в таблице 8. Для этих пар МА соотношение «сигнал/фон» было одинаковым и равным 11.

Таблица 8. Список детектирующих пар МА для определения зрелой формы эндопептидазы AlpB в формате «сэндвич»–ИФА

№	Антитело «захвата» (нижнее)	Антитело «детекции» (верхнее, bio)	Соотношение «сигнал/фон»	Предел детекции, нг/мл
1	P1AlpB-6	P2AlpB-4bio	11	3,0
2	P1AlpB-6	P2AlpB-5bio	11	3,0
3	P1AlpB-6	P2AlpB-8bio	11	3,0
4	P1AlpB-6	P2AlpB-9bio	11	3,0

Пары МА P1AlpB-6 + P2AlpB-4bio, P1AlpB-6 + P2AlpB-5bio, P1AlpB 6 + P2AlpB-8bio, P1AlpB-6 + P2AlpB-9bio выявляли денатурированный фермент AlpB одинаково вплоть до концентрации 3 нг/мл. Эти антитела не связывались друг с другом в отсутствие фермента, и перекрестно не взаимодействовали с пропептидами и зрелой формой AlpA. На рисунке 23 представлена калибровочный график определения концентрации зрелой формы AlpB при использовании пары P1AlpB-6 + P2AlpB-4bio. Линейный диапазон определения составил 3–100 нг/мл, ошибка измерения – 5%.

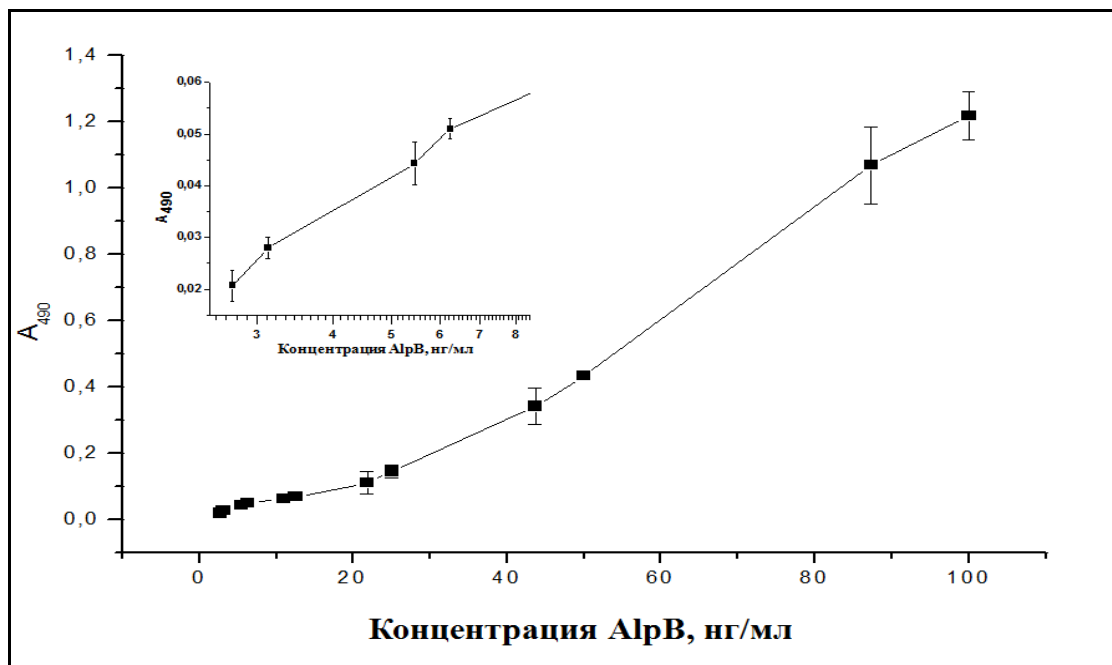


Рис. 23. Калибровочный график для определения концентрации зрелой формы фермента AlpB с помощью пары МА P1AlpB-6 +P2AlpB-4bio. В верхнем левом углу приведен участок калибровочного графика, соответствующий области низких концентраций фермента AlpB от 1 до 8 нг/мл.

Таким образом, разработанные тест–системы на основе МА, позволяют количественно с высокой чувствительностью выявлять пропептиды и зрелые формы внеклеточных эндопептидаз AlpA и AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1 (Руденко *и др.*, 2014; Karatovskaya *et al.*, 2016).

Данные методы пригодны для количественной оценки содержания ProA, ProB, AlpA и AlpB в клеточных фракциях бактерии, а также в культуральной жидкости при их биотехнологической наработке.

3.3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ AlpA И AlpB *LYSOBACTER* SP. XL1, В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ

Для количественной оценки содержания пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB в культуральных жидкостях, клеточных фракциях и в препарате лизоамидазы были применены разработанные в формате «сэндвич»–ИФА аналитические методы.

Используемый обычно турбидиметрический метод определения бактериолитической активности в культуральной жидкости или в препаратах лизоамидазы оценивает суммарный литический эффект, но не позволяет определить содержание конкретных литических ферментов. Разработанные в данной работе методы с высокой чувствительностью выявляют индивидуальные ферменты AlpA и AlpB в сложных биологических смесях, например, в культуральной жидкости, и могут быть применены для стандартизации антимикробных препаратов на основе AlpA и AlpB.

3.3.1. Определение молекулярных форм AlpA и AlpB в культуральных жидкостях

Количественное определение содержания пропептидов и зрелых форм ферментов AlpA и AlpB проводили, используя калибровочные графики. Было проведено определение исследуемых молекулярных форм ферментов в клеточных фракциях, разработанным «сэндвич»–ИФА, для 5 биологических экспериментов. Каждый эксперимент характеризовался определенным уровнем литической активности (ЛЕ/мл) и оптической плотностью (A_{540}), что отражало концентрацию бактериальных клеток в культуре. Например, в биологическом эксперименте №1 с оптической плотностью 2,2 содержание AlpA в культуральной жидкости после 12 часов культивирования составило 14 ± 1 нг/мл, при этом уровень литической активности составлял 4 ЛЕ/мл. После 20 часов культивирования, в начале стационарной фазы, с оптической плотностью около 4,5

содержание AlpA с уровнем литической активности около 140 ЛЕ/мл в культуральной жидкости составило 410 ± 10 нг/мл (табл. 9) (Руденко *и др.*, 2017).

Так как МА, полученные к AlpB, узнавали только денатурированную форму белка, фермент AlpB в культуральной жидкости не выявлялся в стандартных условиях. Для его выявления оказалось недостаточно обработки только щелочью, потребовалась последовательная обработка кислотой и щелочью. Недоступность AlpB для антител, по-видимому, объясняется тем, что фермент секретируется в составе внешнемембранных везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008). Используя данный подход, в культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 в биологическом эксперименте №1 было обнаружено 4 ± 1 нг/мл фермента AlpB после 12 часов культивирования и 98 ± 5 нг/мл после 20 часов культивирования.

Очевидно, что концентрация исследуемых ферментов определяется концентрацией бактерии–продуцента, которая пропорциональна оптической плотности культуры. Поэтому после определения концентрации исследуемых молекулярных форм, данные представляли в виде соотношения суммарного количества определяемого белка в данной фракции к суммарному количеству оптических единиц бактериальной суспензии конкретного биологического эксперимента (нг/ A_{540}). Такой способ представления количественных данных по содержанию определяемого белка был использован для всех исследуемых молекулярных форм в клеточных фракциях.

В культуральной жидкости пропептиды не были выявлены (Руденко *и др.*, 2017).

В культуральной жидкости была выявлена нативная форма зрелого фермента AlpA.

На диаграммах (рис. 24) представлены результаты определения содержания ферментов AlpA и AlpB в зависимости от литической активности бактериальной культуры. Представленные данные свидетельствуют о том, что содержание эндопептидаз AlpA и AlpB коррелирует с уровнем литической активности. Более высокому уровню литической активности соответствует более высокое содержание ферментов. Однако не наблюдается прямой пропорциональной зависимости, что можно объяснить сложным составом литического комплекса, секретируемого *Lysobacter* sp. XL1, в состав, которого входят и другие ферменты, обладающие литической активностью.

Повышенный уровень продукции эндопептидазы AlpA по отношению к AlpB соответствует данным о более высоком уровне синтеза мРНК AlpA, чем AlpB в клетках *Lysobacter* sp. XL1 (Lapteva *et al.*, 2012).

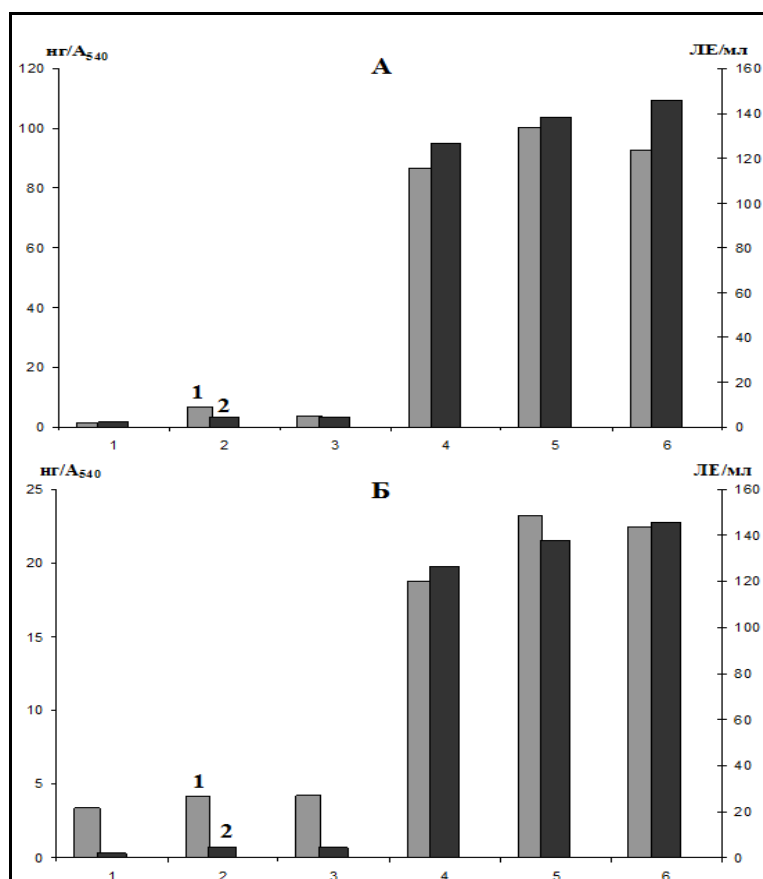


Рис. 24. Содержание зрелых форм AlpA (А) и AlpB (Б) (1, нг/А₅₄₀) в сравнении с уровнем литической активности культуры *Lysobacter* sp. XL1 (2, ЛЕ/мл) в культуральных жидкостях *Lysobacter* sp. XL1. 1 – 3 – биологические эксперименты после 12 часов культивирования, 4 – 6 – биологические эксперименты после 20 часов культивирования.

Определение содержания ферментов в культуральных жидкостях показало возможность оценки уровня секреции эндопептидаз AlpA и AlpB бактерий.

3.3.2. Определение молекулярных форм AlpA и AlpB в клеточных фракциях

Определение концентрации пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1 также проводили «сэндвич»–ИФА на основе МА (табл. 9) (Руденко и др., 2017). В этих экспериментах использовали бактериальную культуру после 20 часов культивирования.

Как и в случае культуральных жидкостей после определения концентрации соответствующей молекулярной формы по калибровочной кривой данные представляли в виде величины нг/А₅₄₀.

Были исследованы цитоплазматическая, периплазматическая и мембранная фракции бактерий *Lysobacter* sp. XL1.

В цитоплазматической фракции ProA, ProB и зрелая форма AlpA не были выявлены, а зрелая форма AlpB не определялась. Учитывая, что метод для количественного анализа содержания фермента AlpB разработан для денатурированной формы, при анализе клеточных фракций, в качестве контроля использовали фракции из клеток *E. coli*, полученные аналогичным способом, что и фракции *Lysobacter* sp. XL1, в которые вносили определенное количество фермента AlpB. Далее проводили те же манипуляции, что и с исследуемыми образцами из *Lysobacter* sp. XL1. Разработанная тест–система количественно выявляла внесенный фермент в периплазматической и мембранной фракциях. Модельные эксперименты с денатурированной цитоплазматической фракцией, полученной аналогичным способом из *E. coli*, и внесением заведомо известного количества AlpB показали, что «сэндвич»–ИФА не выявляет этот фермент в цитоплазме. По-видимому, положительно заряженный в щелочных условиях денатурации фермент AlpB (Lapteva *et al.*, 2012), экранируется электростатическим взаимодействием с ДНК.

В модельных экспериментах в не денатурированной цитоплазматической фракции *E. coli* внесенные ProA, ProB и AlpA количественно детектировались.

В мембранной фракции также не было выявлено зрелых форм ферментов и соответствующих пропептидов.

Как и следовало предположить, именно в периплазматической фракции были обнаружены молекулярные формы исследуемых ферментов. Известно, что в периплазме происходит фолдинг и расщепление предшественника в месте соединения пропептида и зрелой формы (Boggs *et al.*, 1996). В таблице 9 обобщены данные по количественному содержанию молекулярных форм в клеточных фракциях (Руденко *и др.*, 2017).

Таблица 9. Содержание пропептидов и зрелых форм ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1, в культуральной жидкости и клеточных фракциях

Название клеточной фракции	ProA, нг/А540	AlpA, нг/А540	ProB, нг/А540	AlpB, нг/А540
Культуральная жидкость	0	96,33±3,89	0	22,84±0,03
Цитоплазма	0	0	0	н.о
Мембраны	0	0	0	0
Периплазма	0,92±0,10	0,07±0,02	0,14±0,05	0,36±0,10

Приведены данные, рассчитанные на одну единицу оптической плотности культуры при 540 нм (нг/А540), трех независимых биологических экспериментов с уровнем литической активности культуры около 140 ЛЕ/мл, н.о – не определяли.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что зрелые формы ферментов содержатся в периплазматической фракции и культуральной жидкости, а их пропептиды обнаруживаются только в периплазме.

В периплазматической фракции показано повышенное содержание зрелой формы AlpB, по сравнению с AlpA в отличие от их соотношения в культуральной жидкости. Этот факт можно объяснить удержанием AlpB в этом компартменте, что может быть связано с особенностями секреции этого фермента. Известно, что AlpB секретируется в окружающую среду посредством везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008). Иммуноцитохимические исследования Кудряковой с соавт. показали, что накопление AlpB происходит в определенных локусах периплазмы, прилежащих к участкам внутренней стороны наружной мембраны, которые впоследствии образуют мембранные везикулы (Kudryakova *et al.*, 2015). AlpA, используя II тип секреции, проходит периплазматическую стадию, довольно быстро, не накапливаясь в периплазме. Повышенное содержание пропептида AlpA, возможно, связано с особенностями его деградации в периплазме, как это показано для α -литической протеазы *L. enzymogenes* (Cunningham *et al.*, 2004). Экспорт зрелой формы AlpA осуществляется настолько быстро, что соответствующий пропептид не успевает деградировать, о чем свидетельствует на порядок более высокое содержание ProA в периплазме, чем содержание зрелой формы фермента.

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ AlpA И AlpB В КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ *LYSOBACTER SP. XL1* МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

Для определения локализации молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB в различных клеточных фракциях также использовали иммуноблоттинг, в котором, исследуемые белки детектировали полученными в данной работе антителами.

Количество препаратов клеточных фракций, нанесенных на дорожку при электрофоретическом разделении, а также антител, используемых для выявления антигенов, подбирали экспериментально. Несмотря на то что, иммуноблоттинг является качественным методом для рационального сопоставления результатов иммуноблоттинга и «сэндвич»-ИФА количество препаратов, нанесенных на одну дорожку, выражали в единицах оптической плотности бактериальной суспензии (A_{540}).

Эндопептидазы AlpA и AlpB, как уже отмечалось, синтезируются в виде неактивных предшественников (PreAlpA и PreAlpB, соответственно) или препробелков, состоящих из сигнального пептида, пропептида и зрелой формы (Lapteva *et al.*, 2012). Для определения локализации их молекулярных форм в компартментах клетки и за ее пределами

иммуноблоттингом были использованы антитела, специфически узнающие денатурированные формы как пропептидов, так и зрелых форм. Полученные в данной работе МА против ProA, ProB и зрелой формы AlpB взаимодействовали с денатурированными антигенами. Исключение составили конформационные МА, полученные к зрелой форме AlpA, которые не взаимодействовали с денатурированным белком. Поэтому для иммуноблоттинга были получены поликлональные антитела мыши к денатурированному обработкой кислотой ферменту AlpA (Руденко и др., 2017).

На рисунке 25 представлены результаты иммуноблоттинга, в виде фотографий рентгеновских пленок с белковыми полосами, окрашенными антителами против пропептидов и зрелых форм AlpA и AlpB.

В цитоплазматической фракции обнаружены предшественники AlpA и AlpB, что соответствует локализации белкового синтеза в этом компартменте бактериальной клетки. Предшественники выявлялись антителами, как против зрелых форм ферментов, так и против пропептидов. Для AlpA использовали поликлональные антитела мыши к денатурированному ферменту и ProA-1. Для AlpB – P2AlpB-8 и ProB-10 (рис. 23).

В мембранной фракции ни предшественник, ни зрелая форма фермента, ни соответствующий пропептид не выявлялись иммуноблоттингом, также, как и в «сэндвич»-ИФА (рис. 25, табл. 9).

При анализе периплазматической фракции с помощью антител против денатурированной формы AlpA выявлена только зрелая форма фермента. МА против ProA выявили в периплазматической фракции пропептид и белковые фрагменты более низкого молекулярного веса. Что касается AlpB, в периплазматической фракции *Lysobacter* sp. XL1 обнаружены предшественник и зрелая форма (детекция МА P2AlpB-8). Иммуноблоттинг с использованием МА ProB-10 подтвердил наличие предшественника и продемонстрировал наличие ProB (рис. 25).

В культуральной жидкости иммуноблоттингом идентифицированы только зрелые формы ферментов.

Таким образом, иммуноблоттинг, в отличие от «сэндвич»-ИФА, позволил определить локализацию предшественников, которые были выявлены в цитоплазматической фракции, а PreAlpB и в периплазме. Иммуноблоттингом и количественным «сэндвич»-ИФА показаны следующие согласующиеся результаты: а) наличие зрелых форм ферментов AlpA и AlpB в периплазме и культуральной жидкости, б) отсутствие зрелых форм ферментов AlpA и AlpB в мембранной и цитоплазматической

фракциях, в) наличие ProA и ProB в периплазме, г) отсутствие ProA и ProB в культуральной жидкости, цитоплазматической и мембранной фракциях (рис. 25).

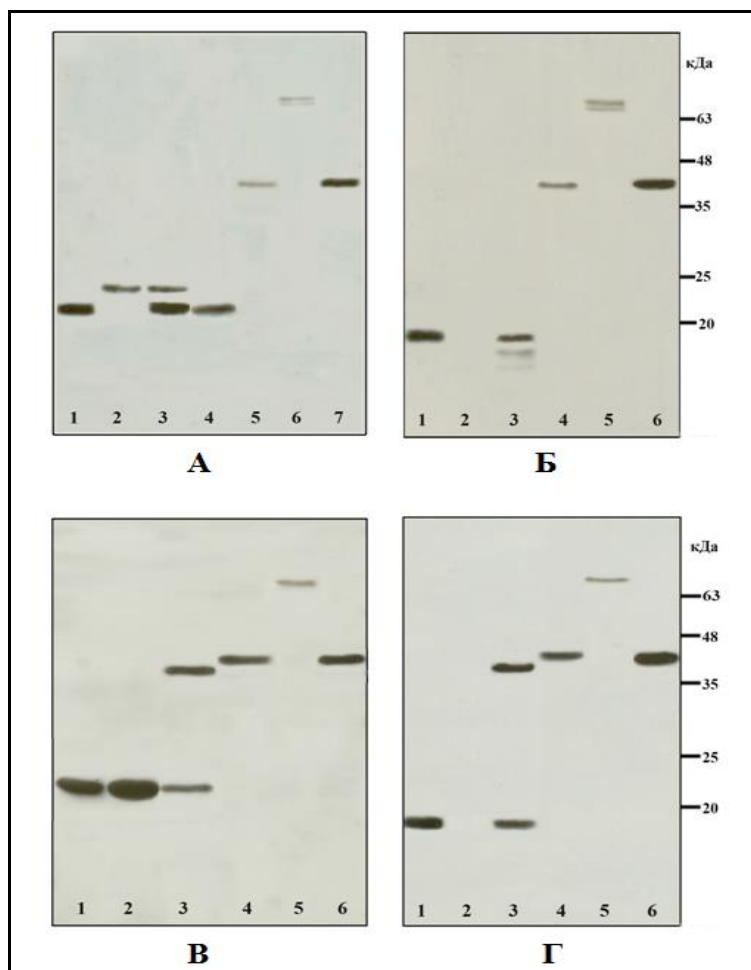


Рис. 25. Иммуноблоттинг клеточных фракций *Lysobacter* sp. XL1: **А)** с использованием поликлональных антител мыши против денатурированного AlpA. **1** – AlpA (10 нг), **2** – AlpB (10 нг), **3** – культуральная жидкость (аликвота, соответствующая 0,08 A_{540}), **4** – периплазматическая фракция (20 A_{540}); **5** – цитоплазматическая фракция (2 A_{540}), **6** – мембранная фракция (10 A_{540}), **7** – PreAlpA (10 нг); **Б)** с использованием МА ProA–1 против ProA. **1** – ProA (10 нг), **2** – культуральная жидкость (0,08 A_{540}), **3** – периплазматическая фракция (3 A_{540}), **4** – цитоплазматическая фракция (2 A_{540}), **5** – мембранная фракция (10 A_{540}), **6** – PreAlpA (10 нг); **В)** с использованием МА P2AlpB–8 против AlpB. **1** – AlpB (1 нг), **2** – культуральная жидкость (0,08 A_{540}), **3** – периплазматическая фракция (4 A_{540}), **4** – цитоплазматическая фракция (1 A_{540}), **5** – мембранная фракция (10 A_{540}), **6** – PreAlpB (1 нг); **Г)** с использованием МА ProB–10 против ProB. **1** – ProB (10 нг), **2** – культуральная жидкость (0,08 A_{540}),

3 – периплазматическая фракция (30 A_{540}), 4 – цитоплазматическая фракция (3 A_{540}), 5 – мембранная фракция (10 A_{540}), 6 – PreAlpB (10 нг).

Количество препаратов клеточных фракций, нанесенных на дорожку при электрофоретическом разделении, выражали в единицах оптической плотности бактериальной суспензии (A_{540}).

На основании полученных результатов составлена схема, представленная на рисунке 26, на которой отображено распределение молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB внутри и за пределами клетки. Данные позволяют сделать некоторые выводы относительно механизма секреции ферментов AlpA и AlpB в окружающую среду. Показано, что клетки *Lysobacter* sp. XL1 в ранней стационарной фазе роста продуцируют гораздо больше зрелой формы AlpA, чем AlpB. Фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве перед дальнейшим экспортом в окружающее пространство в составе внешнемембранных везикул. Эндопептидаза AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазме. Показано, что окончательное созревание исследуемых ферментов происходит в периплазме, за пределы клетки попадают только зрелые формы ферментов без пропептидов. Полученные результаты согласуются с описанными способами секреции: фермент AlpA непосредственно транслоцируется через внешнюю мембрану, AlpB – с помощью внешнемембранных везикул.

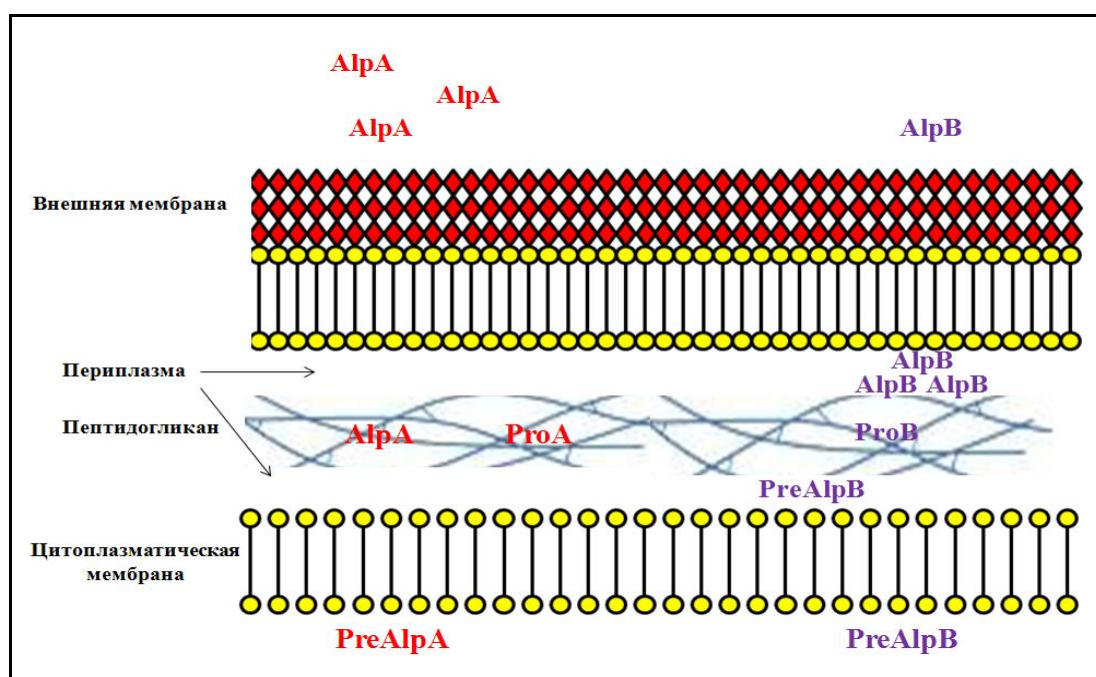


Рис. 26. Локализация молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1.

3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ AlpA И AlpB В ЛИЗОАМИДАЗЕ

Литическая активность антимикробного препарата лизоамидаза обусловлена бактериолитическими ферментами различной специфичности (эндопептидазы – AlpA, AlpB, Л4; амидаза – Л2; и мурамидаза – Л3), секретлируемыми *Lysobacter* sp. XL1 (Степная и др., 1992, 1996а, 1996б, 2005; Vasilyeva *et al.*, 2014). Состав препарата лизоамидаза непостоянен и зависит от многих факторов, например, качественного и количественного состава компонентов питательной среды. При его производстве в промышленных масштабах необходима стандартизация. Определить содержание каждого из ферментов по измерению литической активности культуральной жидкости невозможно, так как при этом измеряется общая бактериолитическая активность, в которую вносит вклад каждый из ферментов. Оценка содержания фермента по результатам его очистки является очень трудоемкой и сложной. Данная задача достаточно легко решается с помощью разработанных в данной работе методов на основе МА.

Метод «сэндвич»–ИФА на основе полученных МА был использован для количественного анализа ферментов AlpA и AlpB в препарате лизоамидаза. Подготовка проб для этих анализов проходила без каких–либо дополнительных манипуляций. Непосредственно перед использованием сухой порошок препарата лизоамидазы в случае измерения концентрации AlpA растворяли в PBST, в случае AlpB – в 0,16 М NaOH, PBST. В одном миллиграмме сухого образца препарата лизоамидазы, содержание AlpA составляло $4,66 \pm 0,23$ мкг, а содержание AlpB – $1,43 \pm 0,07$ мкг. Таким образом, была продемонстрирована пригодность разработанных тест–систем для количественного определения исследуемых ферментов в препарате лизоамидаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена иммунохимическому исследованию топографии молекулярных форм внеклеточных сериновых эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1. Аминокислотные последовательности этих ферментов гомологичны друг другу, что предполагает для их исследования использование МА, узнающих уникальные эпитопы. Были получены коллекции гибридомных клеток – продуцентов моноклональных антител к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, с использованием разнообразного арсенала иммунохимических подходов, таких как различные схемы иммунизации, пептидные конъюгаты. Была проведена полная иммунохимическая характеристика полученных МА, продемонстрировано отсутствие иммуноперекрестной реактивности.

Для количественного определения содержания пропептидов и зрелых форм ферментов AlpA и AlpB в сложных биологических смесях были разработаны детектирующие тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА на основе специфических, полученных в данной работе МА. Такой метод позволил детектировать искомые белки в многокомпонентных препаратах (клеточные лизаты, препараты клеточных фракций, культуральные жидкости и т.п.). Было проведено количественное определение содержания молекулярных форм AlpA и AlpB в культуральных жидкостях и клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1.

Показано, что окончательное созревание исследуемых ферментов происходит в периплазме, за пределы клетки попадают только зрелые формы. AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве, где показано его повышенное содержание, по сравнению с AlpA в отличие от их соотношения в культуральной жидкости. В отличие от AlpA, в периплазме детектирован предшественник AlpB.

Важным прикладным направлением работы является возможность использования разработанных тест–систем для стандартизации и контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов *Lysobacter* sp. XL1, что было продемонстрировано для количественного определения ключевых компонентов AlpA и AlpB в лизоамидазе.

ВЫВОДЫ

1. Получены неперекрестные моноклональные антитела к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1: 2 против ProA, 12 против ProB, 15 против зрелой формы AlpA, 5 против зрелой формы AlpB. Для получения моноклональных антител к AlpB использовали пептиды, первичная структура которых максимально отличалась от AlpA.
2. На основе полученных моноклональных антител разработаны тест-системы в формате «сэндвич»–ИФА для количественного определения молекулярных форм эндопептидаз AlpA и AlpB.
3. Детекция иммуноблоттингом и количественный «сэндвич»–ИФА показали распределение молекулярных форм AlpA и AlpB в компартментах бактериальной клетки. AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, AlpB накапливается в периплазме для секреции в составе внешнемембранных везикул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что окончательное созревание исследуемых ферментов происходит в периплазме, за пределы клетки попадают только зрелые формы ферментов без пропептидов. В культуральной жидкости показан повышенный уровень продукции AlpA по сравнению с AlpB.
4. Проведена оценка количественного содержания индивидуальных ферментов AlpA и AlpB в антимикробном препарате лизоамидаза с целью его стандартизации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев Г.И. Моноклональные антитела // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – №1. – с.16 – 20.
2. Бегунова Е.А., Степная О.А., Лысанская В.Я., Кулаев И.С. Специфичность действия препаратов лизоамидазы на клеточные стенки *Staphylococcus aureus* 209P // *Биохимия*. – 2003. – Т.68. – №7. – с.896 – 901.
3. Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела: от создания до клинического применения // *Клиническая онкогематология*. – 2016. – Т.9. – №3. – с.237 – 244.
4. Васильева Н.В. Роль внешнемембранных везикул в секреции бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp: дисс. ...канд. биол. наук. Пущино, 2010 г. С.86.
5. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Внешнемембранные везикулы *Lysobacter* sp // *Доклады Академии наук*. – 2009. – Т.426. – №2. – с.257 – 260.
6. Вербов В.Н. Принципы твердофазного иммуноферментного анализа. Твердофазный иммунный анализ // *Сборник научных трудов, Изд. института им. Л. Пастера*. – 1998. – Т.64. – с.3 – 27.
7. Втюрина И.Ю., Курятов А.Б., Киселев А.В., Хорошилова Н.Н., Овечкина Г.В., Абдулаев Н.Г., Цетлин В.И., Василев Р.Г. Иммунохимическое изучение бактериородопсина с помощью моноклональных антител // *Биологические мембраны*. – 1984. – Т.1. – №11. – с.1161 – 1170.
8. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. Учебное пособие. М.: Высшая школа. 1991. 288 с.
9. Казачинская Е.И., Никонорова Ю.В., Локтев В.Б. Моноклональные антитела и рекомбинантные белки для иммунодиагностики болезни, вызванной вирусом Эбола // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2015. – №3. – с.58 – 64.
10. Казачинская Е.И., Иванова А.В., Сорокин А.В., Качко А.А., Субботина Е.Л., Разумов И.А., Локтев В.Б. Моноклональные антитела и рекомбинантные белки филовирусов. Иммунохимические свойства и оценка возможности их использования для иммунодиагностики. // *Медицинская иммунология*. – 2010. – №3. – Т.12. – с.177 – 190.
11. Кудрякова И.В. Биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1: дисс. ...канд. биол. наук. Пущино, 2017 г. С.80.
12. Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // *Вестник АМН СССР*. – 1984. – Т.8. – с.64 – 69.

13. Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // *Соросовский образовательный журнал. Биология.* – 1997. №3. – с.23 – 31.
14. Кулаев И.С. Исследование бактериолитических ферментов на примере литического комплекса *Lysobacter* sp. XL1 // *Вестник Российской академии наук.* – 2014. – Т.84. – №1. – с.45 – 48.
15. Кулаев И.С., Северин А.И., Абрамочкин Р.В. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // *Вестн. АМН СССР.* – 1984. – Т.8. – с.64 – 69.
16. Лихошерстов Л.М., Сенченкова С.Н, Книрель Ю.А., Шашков А.С., Шibaев В.Н., Степная О.А., Кулаев И.С. Структура кислого полисахарида, входящего в состав бактериолитического комплекса лизоамидаза // *Биохимия.* – 1995. – Т.60. – №3. – с.617 – 624.
17. Муранова Т.А., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Структурные исследования и идентификация внеклеточной бактериолитической эндопептидазы Л1 *Lysobacter* sp. XL 1 // *Биохимия.* – 2004. – Т.69. – №5. – с.617 – 622.
18. Наградова Н.К. Каталитические антитела // *Соросовский образовательный журнал.* – 1996. – №8. – с.23 – 31.
19. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // *Биохимия.* – 2000. – №65. – с.1473 – 1487.
20. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Бунева В.Н. Каталитически активные антитела и их возможная биологическая функция // *Вестник РАМН.* – 2001. – №2. – с.38 – 45.
21. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука. 1986. 245 с.
22. Павлов К. А., Гурина О. И., Антонова О. М., Семенова А. В., Чехонин В. П. Клонирование и экспрессия кДНК нейронспецифической енолазы человека в *Escherichia coli* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2011. – №8. – с.166 – 169.
23. Пашков В.С., Мареева Т.Ю., Балашова Т.А., Вычалковский А.А., Самохвалова Л.В., Байдакова Л.К., Родионов И.Л., Несмеянов В.А. Сохранение конформации

- фрагмента Val69–Gly72 бактериородопсина при его функционировании // *Биоорганическая химия*. – 2002. – Т.28. – №2. – с.109 – 117.
24. Разумов И.А., Гилева И.П., Васильева М.А., Непомнящих Т.С., Мишина М.Н., Беланов Е.Ф., Кочнева Г.В., Коновалов Е.Е., Щелкунов С.Н., Локтев В.Б. Нейтрализующие моноклональные антитела перекрестно реагируют с белками слияния вирусов экстремелии (ГЕН 129L) и натуральной оспы (ГЕН A30L) // *Мол. Биология* – 2005. – Т.39. – №6. – с.1046 – 1054.
25. Руденко Н.В., Каратовская А.П., Цфасман И.М., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение внутри и внеклеточной локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 // *Биоорганическая химия*. – 2017. – Т.43. – № 5. – с.501 – 506.
26. Руденко Н.В., Цфасман И.М., Латыпов О.Р., Ледова Л.А., Красовская Л.А., Каратовская А.П., Бровко Ф.А., Васильева Н.В., Степная О.А. Определение пропептидов литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 методом сэндвич–иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител // *Биоорганическая химия*. – 2014. – Т.40. – № 3. – с.297 – 304.
27. Серкина А.В., Шевелев А.Б., Честухина Г.Г. Структура и функции предшественников бактериальных протеиназ // *Биоорганическая химия*. – 2001. – Т.27. – №5. – с.323 – 346.
28. Ситкин Б., Лысанская В., Цфасман И., Степная О., Кулаев И. Структура пептидогликана бактерии *Lysobacter* sp. – продуцента внеклеточных бактериолитических ферментов // *Микробиология*. – 2003. – Т.72. – №1. – с.136 – 137.
29. Степная О.А. Литические ферменты *Lysobacter* sp.: дис. ... д. б. наук. Пушкино, 2012 г. с.82.
30. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Бактериолитический ферментный препарат лизоамидаза: выделение и некоторые физико–химические свойства внеклеточной мурамидазы бактерии *Xanthomonas* sp. // *Биохимия*. – 1996а. Т.61. – №4. – с.648 – 655.
31. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Бактериолитический ферментный препарат лизоамидаза: очистка и некоторые свойства бактериолитической пептидазы Л1 // *Биохимия*. – 1996б. Т.61. – №.4. – с.656 – 663.
32. Степная О. А., Бегунова Е. А., Цфасман И. М., Тульская Е. М., Стрешинская Г. М., Наумова И.Б., Кулаев И.С. Роль анионных полимеров клеточных стенок

- грамположительных бактерий-мишеней в механизме действия на них внеклеточных бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. // Микробиология. – 2004. – Т.73. – №4. – с.479 – 485.
33. Степная О.А., Кудрявцева А.И., Северин А.И., Крупянко В.И., Козловский А.Г., Кулаев И.С. Ферменты бактериолитического препарата лизоамидаза. Некоторые свойства бактериолитической протеиназы Л2 // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1992. – Т.28. – №5. – с.666 – 673.
34. Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С. Бактериолитический комплекс лизоамидаза. Определение природы взаимодействия ферментов и полисахарида, входящих в состав комплекса // *Биохимия*. – 1993. – Т.58. №10. – с.1523 – 1528.
35. Степная О.А., Северин А.И., Кулаев И.С. Некоторые физико–химические свойства литической протеазы Л2 ферментного препарата лизоамидаза, выделенного из бактерии семейства *Pseudomonadaceae* // *Биохимия*. – 1986. – Т.51. – №6. – с.909 – 915.
36. Степная О.А., Цфасман И.М., Логвина И.А., Рязанова Л.П., Муранова Т.А., Кулаев И.С. Выделение и характеристика новой внеклеточной бактериолитической эндопептидазы *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия*. – 2005. – Т.70. – №9. – с.1250 – 1257.
37. Степная О.А., Цфасман И.М., Чайка И.А., Муранова Т.А., Кулаев И.С., Внеклеточный дрожжелитический фермент бактерии *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия*. – 2008. – Т.73. – № 3. – с.381 – 387.
38. Тоневицкий А.Г., Гребенюк Е.С., Давыдов Я.И., Докрунова А.А., Тоневицкий Е.А. Анализ копийности рибосомального белка L7/L12 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2009. – №5. – с.516 – 520.
39. Тупицын Н.Н. Иммунология клеток крови. В кн.: Гематология. Национальное руководство. Под ред. О.А. Рукавицына. М.: ГЭОТАР – Медиа. 2015. 69 – 79 с.
40. Тупицын Н.Н., Гривцова Л.Ю., Купрышина Н.А. Иммунодиагностика опухолей крови на основании многоцветных (8 цветов панелей) европейского консорциума по проточной цитометрии (EURO–FLOW) // *Иммунология гемопоза*. – 2015. – Т.13. – №1. – с.31 – 62.
41. Филиппова М.А., Фейзханова Г.У., Зубцова Ж.И., Стомахин А.А., Рубина А.Ю., Гришин Е.В. Биочип для многопараметрического экспресс–анализа биотоксинов // *Доклады Академии Наук*. – 2011. – Т.436. – №4. – с.553 – 558.
42. Цфасман И.М., Ситкин Б.В., Лысанская В.Я., Степная О.А., Кулаев И.С. Субстратная специфичность и некоторые физико–химические свойства

- автолитических ферментов бактерии *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия*. – 2007. – Т.72 – с.760 – 765.
43. Цфасман И.М., Степная О.А., Бажанова Н.В., Кулаев И.С. Внутриклеточная глюкозаминидаза бактерии *Xanthomonas campestris* ИБФМ В-124: очистка и некоторые свойства // *Биохимия*. – 2000. – Т.65. – №. 9. – с.57 – 62.
44. Чумак Н.Е., Степная О.А., Черменская Т.С., Несмеянова М.А., Кулаев И.С. Особенности секреции бактериолитических ферментов и полисахарида у бактерии семейства *Pseudomonadaceae* // *Микробиология*. – 1995. – Т.64. – №1. – с.55 – 62.
45. Abdul-Karim R.M., Cowey C.L. Challenging the standard of care in advanced melanoma: focus on pembrolizumab // *Cancer Manag Res*. – 2017. – V.9. – p.433 – 442.
46. Abe C., Hirano K., Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – V.37. – p.3693 – 3697.
47. Adams G.P., Weiner L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer // *Nat Biotechnol.* – 2005. – V.23. – p.1147 – 1157.
48. AlDallal S.M. Ofatumumab – a valid treatment option for chronic lymphocytic leukemia patients // *Ther Clin Risk Manag.* – 2017. – V.13. – p.905 – 907.
49. Amino N., Hidaka Y. Various types of immunoassay // *Nihon Rinsho.* – 1995. – V.53. – №9. – p.2107 – 2111.
50. Andreakos E., Taylor P.C., Feldmann M. Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases // *Curr Opin Biotechnol.* – 2002. – V.13. – p.615 – 620.
51. Anderson J.C., Cheng E., Roeske M., Marchildon P., Peacock J., Shaw R.D. Detection of serum antibodies to *Helicobacter pylori* by an immunochromatographic method // *Am. J. Gastroenterol.* – 1997. – V.92. – p.1135 – 1139.
52. Appleby T.C., Greenstein A.E., Hung M., Liclican A., Velasquez M., Villaseñor A.G., Wang R., Wong M.H., Liu X., Papalia G.A., Schultz B.E., Sakowicz R., Smith V., Kwon H.J. Biochemical characterization and structure determination of a potent, selective antibody inhibitor of human MMP9 // *J Biol Chem.* – 2017. – V.292. – №16. – p.6810 – 6820.
53. Appelbaum F.R., Bernstein I.D. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia // *Blood.* – 2017. – pii: blood-2017-09-797712.
54. Aranha A.A., Amer S., Reda E.S., Broadley S.A., Davoren P.M. Autoimmune thyroid disease in the use of alemtuzumab for multiple sclerosis: A Review // *Endocrine Practice.* – 2013. – V.19. – №5. – p.1 – 25.

55. Arthur J.M., Janech M.G., Varghese S.A., Almeida J.S., Powell T.B. Diagnostic and prognostic biomarkers in acute renal failure // *Contrib. Nephrol.* – 2008. – V.160. – p.53 – 64.
56. Audet J., Wong G., Wang H., Lu G., Gao G.F., Kobinger G., Qiu X. Molecular characterization of the monoclonal antibodies composing ZMAb: a protective cocktail against Ebola virus // *Sci Rep.* – 2014. – V.4. – p.6881.
57. Avrameas S., Ternynck T., Guesdon J.L. Coupling of enzymes to antibodies and antigens // *Scand. J. Immunol.* – 1978. – V.8. – Suppl 7. – p.7 – 23.
58. Ballardie F.W., Capon B. 3,4-Dinitrophenyl tetra-N-acetyl-P-D-chitotetraoside a good chromophoric substrate for hen's egg-white lysozyme // *J. Chem. Soc. Commun.* – 1972. – V.14. – p.828 – 829.
59. Banks L.M., Halliburton I.W., Purifoy D.J., Killington R.A., Powell K.L. Studies on the herpes simplex virus alkaline nuclease: detection of type–common and type–specific epitopes on the enzyme // *The Journal of General Virology.* – 1985. – V.66. – p.1 – 14.
60. Banchereau J., Rousset F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation // *Adv Immunol.* – 1992. – V.52. – p.125 – 262.
61. Bartal A.H., Hirshaut Y. (1987) Methods of hybridoma formation. Humana Press: Clifton, N.J., USA. – p.480
62. Bastian L.A., Nanda K., Hasselblad V., Simel D.L. Diagnostic efficiency of home pregnancy test kits. A meta–analysis // *Arch. Fam. Med.* – 1998. – V.7. – p.465 – 469.
63. Beatty J.D., Beatty D.G., Vlahos W.G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non–competitive enzyme immunoassay // *J. Immunol. Methods.* – 1987. – V.100. – p.173 – 179.
64. Becquart P., Mahlako~iv T., Nkoghe D., Leroy E.M. Identification of continuous human B–cell epitopes in the VP35, VP40, nucleoprotein and glycoprotein of Ebola virus // *PLoS One.* – 2014. – V.9. – p. e96360.
65. Bennett R.W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme–linked immunosorbent assay–based methodology // *J Food Prot.* – 2005. – V.68. – №6. – p.1264 – 1270.
66. Bhandari P.R., Pai V.V. Novel applications of Rituximab in dermatological disorders // *J Indian Dermatol Online.* – 2014. – V.5. – №3. – p.250 – 259.
67. Bhat S., Bhatia S., Sood R., Bhatnagar H., Pateriya A., Venkatesh G. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Nucleoprotein of Avian Influenza

- Virus // *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*. – 2013. – V.32. – №6. – p.413 – 418.
68. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of chlamydia trachomatis infections // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1997. – V.10. – p.160 – 184.
69. Blake C., Gould B.J. Use of enzymes in immunoassay techniques. A review // *Analyst.* – 1984. – V.109. – p.533.
70. Boffetta P. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma // *Ann Oncol.* – 2011. – V.22. – Suppl 4. – p.27 – 31.
71. Boggs A.F., Agard D.A. Bacterial extracellular secretion transport of α -lytic protease across the outer membrane of *E. coli* // *Membrane Protein Transport.* – 1996. – V3. – p.165 – 179.
72. Boulianne G.L., Hozumi N., Shulman M.J. Production of functional chimaeric mouse/human antibody // *Nature.* – 1984. – V.312. – p.643 – 646.
73. Boyd J.E., James K. (1989). Human monoclonal antibodies: Their potential, problems, and prospects. In: *Monoclonal Antibodies: Production and Application*. (Mizrahi A. ed.) Alan R. Liss, Inc.: New York. p.1 – 43.
74. 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.
75. Bratkovic T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application // *Cell Mol Life Sci.* – 2010. – V.67. – p.749 – 767.
76. Brodeur M., Tsang B.P. High yield monoclonal antibody production in ascites // *J Immunol Methods.* – 1986. – V.86. – p.239 – 241.
77. Burnett W. N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A // *Analytical Biochemistry.* – 1981. – V.112. – №1. – p.195 – 203.
78. Cai S., Bressler N.M. Aflibercept, bevacizumab or ranibizumab for diabetic macular oedema: recent clinically relevant findings from DRCR.net Protocol T // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2017. – V.28. – №6. – p.636 – 643.
79. Cang S., Mukhi N., Wang K., Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy // *J Hematol Oncol.* – 2012. – V.5. – №1. – p.64.
80. Carette J.E., Raaben M., Wong A.C., Herbert A.S., Obernosterer G., Mulherkar N., Kuehne A.I., Kranzusch P.J., Griffin A.M., Ruthel G., Dal Cin P., Dye J.M., Whelan S.P.,

- Chandran K., Brummelkamp T.R. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1 // *Nature*. – 2011. – V.477. – p.340 – 343.
81. Carter P.J. Potent antibody therapeutics by design // *Nat Rev Immunol*. – 2006. – V.6. – p.343 – 357.
82. Catalfamo M., Wilhelm C., Tcheung L., Proschan M., Friesen T., Park J.H., Adelsberger J., Baseler M., Maldarelli F., Davey R., Roby G., Rehm C., Lane C. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL–7 // *J Immunol*. – 2011. – V.186. – №4. – p.2106 – 2116.
83. Castillo–Trivino T., Braithwaite D., Bacchetti P., Waubant E. Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review // *PLoS One*. – 2013. – V.8. – №7. – e66308.
84. Cerquozzi S., Owen C. Clinical role of obinutuzumab in the treatment of naive patients with chronic lymphocytic leukemia. // *Biol Targ Ther*. – 2015. – V.9. – p.13 – 22.
85. Christensen P., Cook F. Lysobacter, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1978. – V.28. – p.367 – 393.
86. Clackson T., Lowman H.B. (2004) Phage display: A practical approach. Oxford University Press: USA. – p.61 – 83.
87. Cobleigh M.A., Vogel C.L., Tripathy D., Robert N.J., Scholl S., Fehrenbacher L., Wolter J.M., Paton V., Shak S., Lieberman G., Slamon D.J. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti–HER2 monoclonal antibody in women who have HER2–overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease // *J Clin Oncol*. – 1999. – V.17. – №9. – p.2639 – 2648.
88. Cognein P., Costa A., Giacosa A. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: evaluation of a rapid, miniaturized immunochromatographic test // *Eur. J. Cancer. Prev*. – 1994. – V.3. – p.457 – 463.
89. Cole L.A. Human chorionic gonadotropin tests // *Expert Rev. Mol. Diagn*. – 2009. – V.9. – №7. – p.721 – 747.
90. Cong J., Thompson V.F., Goll D.E. Immunoaffinity purification of the calpains // *Protein Expression and Purification*. – 2002. – V.25. – p.283 – 290.
91. Coons S.J. A look at the purchase and use of home pregnancy–test kits // *Am.Pharm*. – 1989. – V.29. – p.46 – 48.
92. Copur M.S., Ramaekers R., Crockett D. Ipilimumab Adjuvant Therapy in Melanoma // *N Engl J Med*. – 2017. – V.376. – №4. – p.398 – 399.

93. Creaser C.S., Feely S.J., Houghton E., Seymour M. Immunoaffinity chromatography combined online with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of corticosteroids // *J. Chromatogr.* – 1998. – V.794. – p.37 – 43.
94. Crowther J.R. (1995) ELISA Theory and Practice. Humana Press.: Totowa, NJ. – p.214.
95. Cummings M.C., Lukehart S.A., Marra C., Smith B.L., Shaffer J., Demeo L.R., Castro C., McCormack W.M. Comparison of methods for the detection of *Treponema pallidum* in lesions of early syphilis // *Sex. Transm. Dis.* – 1996. – V.23. – №5. – p.336 – 369.
96. Danese S., Colombel J.F., Reinisch W., Rutgeerts P.J. Review article: infliximab for Crohn's disease treatment—shifting therapeutic strategies after 10 years of clinical experience // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2011. – V.33. – p.857 – 869.
97. Davies A.J., Rohatiner A.Z., Howell S., Britton K.E., Owens S.E., Micallef I.N., Deakin D.P., et al. Tositumomab and iodine I 131 tositumomab for recurrent indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *J Clin Oncol.* – 2004. – V.22. – p.1469 – 1479.
98. de Geus B., Hendriksen C. *In vivo* and *in vitro* production of monoclonal antibodies—Introduction // *Res Immunol.* – 1998. – V.149. – p.533 – 534.
99. De Santis M.C., Bonfantini F., Di Salvo F., Fiorentino A., Riboldi V.M., Di Cosimo S., Bianchi G.V., Gennaro M., Cosentino V., Sant M., Pignoli E., Valdagni R., Lozza L. Trastuzumab and Hypofractionated Whole Breast Radiotherapy: A Victorious Combination? // *Clin Breast Cancer.* – 2017. – pii: S1526 – 8209. – p.30283 – 30285.
100. Del Prete M., Giampieri R., Faloppi L., Bianconi M., Bittoni A., Andrikou K., Cascinu S. Panitumumab for the treatment of metastatic colorectal cancer: a review // *Immunotherapy.* – 2015. – V.7. – №7. – p.721 – 738.
101. Dimitrov D.S., Marks J.D. Therapeutic antibodies: current state and future trends—is a paradigm change coming soon? // *Methods Mol Biol.* – 2009. – V.525. – p.1 – 27.
102. Dong J., Sereno A., Aivazian D., Langley E., Miller B.R., Snyder W.B, Chan E., Cantele M., Morena R., Joseph I.B.J.K., Boccia A., Virata C., Gamez J., Yco G., Favis M., Wu X., Graff C.P., Wang Q., Rohde E., Rennard R., Berquist L., Huang F., Zhang Y., Gao S.X., Ho S.N., Demarest S.J., Reff M.E., Hariharan K., Glaser S.M. A stable IgG-like bispecific antibody targeting the epidermal growth factor receptor and the type I insulin-like growth factor receptor demonstrates superior anti-tumor activity // *MAbs.* – 2011. – V.3. – p.273 – 288.
103. Donzeau M., Knappik A. Recombinant monoclonal antibodies // *Methods Mol Biol.* – 2007. – V.378. – p.14 – 31.

104. Dübel S. Recombinant therapeutic antibodies // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2007. – V.74. – p.723 – 729.
105. Eder M., Lütz–Meindl U. Analyses and localization of pectin–like carbohydrates in cell wall and mucilage of the green alga *Netrium digitus* // *Protoplasma.* – 2010. – V.243. – p.25 – 38.
106. Ehle H., Horn A. Immunoaffinity chromatography of enzymes // *Bioseparation.* – 1990. – V.1. – p.97 – 110.
107. Ekins R. The free hormone hypothesis and measurement of free hormones // *Clin Chem.* – 1992. – V.38. – p.1289 – 1293.
108. Elliott M.J., Maini R.N., Feldmann M., Long-Fox A., Charles P., Katsikis P., Brennan F.M., Walker J., Bijl H., Ghrayeb J. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha // *Arthritis Rheum.* – 1993. – V.36. – №12. – p.1681 – 1690.
109. Engvall E. Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology // *Med Biol.* – 1977. – V.55. – p.193 – 200.
110. Engvall E., Perlman P. Enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G // *Immunochemistry.* – 1971. – V.8. – p.871 – 874.
111. Evans S.S., Clemmons A.B. Obinutuzumab: A Novel Anti–CD20 Monoclonal Antibody for Chronic Lymphocytic Leukemia // *J Adv Pract Oncol.* – 2015. – V.6. – №4. – p.370 – 374.
112. Feldmann M. Development of anti–TNF therapy for rheumatoid arthritis // *Nat Rev Immunol.* – 2002 – V.2. – p.364 – 371.
113. Feldmann M., Maini R.N. Anti–TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? // *Annu Rev Immunol.* – 2001. – V.19. – p.163 – 196.
114. Feng M., Yong Q., Wang W., Kuang H., Wang L., Xu C. Development of a monoclonal antibody–based ELISA to detect *Escherichia coli* O157:H7 // *Food Agric Immunol.* – 2013. – V.24. – №4. – p.481 – 487.
115. Feng Y.J., Chen C., Fallon J.T., Lai T., Chen L., Knibbs D.R., Waters D.D., Wu A.H. Comparison of cardiac troponin I, creatine kinase–MB, and myoglobin for detection of acute ischemic myocardial injury in a swine model // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1998. –V.110. – p.70 – 77.
116. Ferrajoli A., O’Brien S., Keating M.J. Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody // *Expert Opin Biol Ther.* – 2001. – V.1. – p.1059 – 1065.

117. Filatov V.L., Katrukha A.G., Bereznikova A.V., Esakova T.V., Bulargina T.V., Kolosova O.V., Severin E.S., Gusev N.B. Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – V.45. – №6. – p.1179 – 1187.
118. Fraser C.M., Venter J.C. Monoclonal antibodies to β -adrenergic receptors: use in purification and molecular characterization of β -receptors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 1980. – V.77. – №12. – p.7034 – 7038.
119. Freedman A. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management // *Am J Hematol.* – 2014. – V.89. – №4. – p.429 – 436.
120. Fitzgerald J., Leonard P., Darcy E., O'Kennedy R. Immunoaffinity chromatography // *Methods Mol Biol.* – 2011. – V.681. – p.35 – 59.
121. Fitzpatrick J., Fanning L., Hearty S., Leonard P., Manning B.M., Quinn J.G., O'Kennedy R. Applications and recent developments in the use of antibodies for analysis // *Analytical Letters.* – 2000. – V.33. – №13. – p.2563 – 2609.
122. Fuhrmann C.N., Daugherty M.D., Agard D.A. Subangstrom crystallography reveals that short ionic hydrogen bonds, and not a His-Asp low-barrier hydrogen bond, stabilize the transition state in serine protease catalysis // *J Am Chem Soc.* – 2006. – V.128. – p.9086 – 9102.
123. Fuhrmann C.N., Kelch B.A., Ota N., Agard D.A. The 0.83 Å resolution crystal structure of alpha-lytic protease reveals the detailed structure of the active site and identifies a source of conformational strain // *J Mol Biol.* – 2004. – V.338. – p.999 – 1013.
124. Fujino T., West D., Park S.S., Gelboin H.V. Studies on the mechanism of monoclonal antibody inhibition of enzyme activity of phenobarbital-induced cytochrome P-450 // *Pharmacology.* – 1990. – V.40. – №6. – p.301 – 311.
125. Fujinaga M., Delbaere L.T., Brayer G.D., James M.N. Refined structure of alpha-lytic protease at 1.7 Å resolution. Analysis of hydrogen bonding and solvent structure // *J. Mol. Biol.* – 1985. – V.184. – p.479 – 502.
126. Fujishige A., Smith K., Silen J., Agard D. Correct folding of alpha-lytic protease is required for its extracellular secretion from *Escherichia coli* // *J Cell Biol.* – 1992. – V.118. – №1. – p.33 – 42.
127. Furtado L.M., Da Silveira I.C., Carneiro A., Zehuri M., Carboni S., Tavares-Murta B.M., Crema V.O. Cetuximab has an inhibitory effect on cell motility in SCC-4 oral squamous cell carcinoma cell line // *Cell Mol Biol.* – 2017. – V.63. – №9. – p.13 – 17.
128. Galfre G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines // *Nature.* – 1977. – V.266. – p.550 – 552.

129. Galfre G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies, strategies and procedure // *Methods Enzymol.* – 1981. – V.75. – p.3 – 53.
130. Ghagane S.C., Puranik S.I., Gan S.H., Hiremath M.B., Nerli R.B., Ravishankar M.V. Frontiers of monoclonal antibodies: Applications in medical practices // *Hum Antibodies.* – 2017. – V.1. – p.1 – 8.
131. Gingis-Velitski S., Ishai-Michaeli R., Vlodavsky I., Ilan N. Anti-heparanase monoclonal antibody enhances heparanase enzymatic activity and facilitates wound healing // *The FASEB Journal.* – 2007. – V.21. – p.3986 – 3993.
132. Glitza I.C., Guha-Thakurta N., D'Souza N.M., Amaria R.N., McGovern S.L., Rao G., Li J. Bevacizumab as an effective treatment for radiation necrosis after radiotherapy for melanoma brain metastases // *Melanoma Res.* – 2017. – V.27. – №6. – p.580 – 584.
133. Gobbin F., Marangi A., Orlandi R., Richelli S., Turatti M., Calabrese M., Forgiione A., Alessandrini F., Benedetti M.D., Monaco S., Gajofatto A. A case of acute fulminant multiple sclerosis treated with alemtuzumab // *Mult Scler Relat Disord.* – 2017. – V.17. – p.9 – 11.
134. Godwin C.D., Gale R.P., Walter R.B. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia // *Leukemia.* – 2017. – V.31. – №9. – p.1855 – 1868.
135. Golay J., Da Roit F., Bologna L., Ferrara C., Leusen J.H., Rambaldi A., Klein C., Introna M. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab // *Blood.* – 2013. – V. 122. – №20. – p.3482 – 3491.
136. González-González E., Moisés Alvarez M., Márquez-Ipiña A.R., Trujillo-de Santiago G., Rodríguez-Martínez L.M., Nasim Annabi., Khademhosseini A. Anti-Ebola therapies based on monoclonal antibodies: current state and challenges ahead // *Crit Rev Biotechnol. Early Online.* – 2015. – p.1 – 16.
137. Gore M.O., de Lemos J.A. Cardiac Troponins and the Future of Precision Medicine // *Circ Cardiovasc Interv.* – 2016. – V.9. – №6. – pii: e004031.
138. Gu J., Xie Z., Gao Z., Liu J., Korteweg C., Ye J., Lau L.T., Lu J., Gao Z., Zhang B., McNutt M.A., Lu M., Anderson V.M., Gong E., Yu A.C., Lipkin W.I. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study // *Lancet.* – 2007. – V. 29. – №370. – p.1137 – 1145.
139. Guillet J.G., Kaveri S.V., Durieu O., Delavier C., Hoebeke J., Srtosberg A.D. β -Adrenergic agonist activity of a monoclonal anti-idiotypic antibody // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 1985. – V.82. – №6. – p.1781 – 1784.

140. Gunaratna P.C., Wilson G.S. Use of monoclonal anti-enzyme antibodies for analytical purposes // *Biotechnology Progress*. – 1992. – V.8. – №4. – p.268 – 274.
141. Gurcan H., Keskin D., Stern J., Nitzberg M.A., Shekhani H., Ahmed A.R. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases // *Int Immunopharmacol*. – 2009. – V.9. – №1. – p.10 – 25.
142. Haasnoot W., Stouten P., Cazemier G., Lommen A., Nouws J.F.M., Keukens H.J. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney // *Aanalyt*. – 1999. – V.124. – p.301 – 305.
143. Hagemeyer C.E., von Zur Muhlen C., von Elverfeldt D., Peter K. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents // *Thromb Haemost*. – 2009. – V.101. – p.1012 – 1019.
144. Hall R., Hunt P.D., Ridley R.G. (1993) Monoclonal antibody affinity chromatography in: *Protocols in Molecular Parasitology*. (Hyde J.E. ed.) Humana Press Inc.: Totowa, NJ. – p.389 – 395.
145. Hall W.A., Fodstad O. Immunotoxins and central nervous system neoplasia // *J Neurosurg*. – 1992. – V.76. – p.1 – 12.
146. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment // *Am J Hematol*. – 2015. – V.90. – p.447 – 460.
147. Harlow E., Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.: N.Y. – p.346 – 348.
148. Hau J., Hendriksen C. Production of polyclonal antibodies: New technologies // *J ILAR*. – 2005. – V.46. – p.294 – 299.
149. Hawley D.M., Maddux B.A., Patel R.G., Wong K.-Y., Mamula P.W., Firestonen G.L., Brunetti A., Verspohl E., Goldfine I.D. Insulin receptor monoclonal antibodies that mimic insulin action without activating tyrosine kinase // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – V.264. – №5. – p.2438 – 2444.
150. Hay F.C., Westwood O.M.R. (2002). *Practical immunology* (4th ed.) Blackwell Science Ltd: Oxford, UK. – p.408.
151. Hendriksen C., Hau J. (2003). Production of polyclonal and monoclonal antibodies. *Handbook of Laboratory Animal Science*. 2nd ed. Boca Raton.: CRC Press LLC. p.391 – 411.
152. Hendriksen C., de Leeuw W. Production of monoclonal antibodies by the ascites method in laboratory animals // *Res Immunol*. – 1998. – V.149. – p.535 – 542.

153. Hicks J.M., Iosefsohn M. Reliability of home pregnancy–test kits in the hands of laypersons // *N Engl J Med.* – 1989. – V.320. – p.320 – 321.
154. Hino T., Arakawa T., Iwanari H., Yurugi–Kobayashi T., Ikeda–Sunno C., Nakada–Nakura Y., Kusano–Arai O., Weyand S., Shimamura T., Nomura N., Cameron A. D., Kobayashi T., Hamakubo T., Iwata S., Murata T. G–protein–coupled receptor inactivation by an allosteric inverse–agonist antibody // *Nature.* – 2012. – V.482. – №7384. – p.237 – 240.
155. Holbrook L., Sandhar G.K., Sasikumar P., Schenk M.P., Stainer A.R., Sahli K., Flora G.D., Bicknell A.B., Gibbins J.M. A humanized monoclonal antibody that inhibits platelet–surface ERp72 reveals a role for ERp72 in thrombosis // *J Thromb Haemost.* – 2017. – ISSN 1538 – 7836 doi: 10.1111/jth.13878 (*In Press*).
156. Ibarra N., Caballero A., Gonzalez E., Valdes R. Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen // *J. Chromatogr. B.* – 1999. – V.735. – p.271 – 277.
157. Jackson L., Trudel L., Fox J., Lipman N. Monoclonal antibody production in murine ascites. I. Clinical and pathologic features // *Lab Animal Science.* – 1999a. – V.49. – p.70 – 80.
158. Jackson L.R., Trudel L.J., Fox J.G., Lipman N.S. Monoclonal antibody production in murine ascites: II. Production features // *Lab Animal Science.* – 1999b. – V.49. – p.81 – 86.
159. Jiang S., Park C., Barner J.C. Ranibizumab for age–related macular degeneration: a meta–analysis of dose effects and comparison with no anti–VEGF treatment and bevacizumab // *J Clin Pharm Ther.* – 2014. – V.39. – №3. – p.234 – 239.
160. Jiang Y., Genant H.K., Watt I., Cobby M., Bresnihan B., Aitchison R., McCabe D. A multicenter, double–blind, dose–ranging, randomized, placebo–controlled study of recombinant human interleukin–1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores // *Arthritis Rheum.* – 2000. – V.43. – №5. – p.1001 – 1009.
161. Kaminski M.S., Tuck M., Estes J., Kolstad A., Ross C.W., Zasadny K., Regan D., Kison P., Fisher S., Kroll S., Wahl R.L. 131I–tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma // *N Engl J Med.* – 2005. – V.352. – p.441 – 449.
162. Kandolin R., Lehtonen J., Airaksinen J., Vihinen T., Miettinen H., Kaikkonen K., Haataja P., Kerola T., Kupari M. Usefulness of Cardiac Troponins as Markers of Early Treatment Response in Cardiac Sarcoidosis // *Am J Cardiol.* – 2015. – V.116. – №6. – p.960 – 964.

163. Karatovskaya A.P, Rudenko N.V., Tsfasman I.M., Guseva K.A., Laman A.G., Brovko F.A., Vasilyeva N.V. Development of a method for the quantitation of homologous endopeptidases AlpA and AlpB from *Lysobacter* sp. XL1 // *Process Biochem.* – 2016. – V.51. – p.1521 – 1526.
164. Katrukha A.G., Bereznikova A.V., Filatov V.L., Esakova T.V., Kolosova O.V., Pettersson K., Lovgren T., Bulargina T.V., Trifonov I.R., Gratsiansky N.A., Pulkki K., Voipio–Pulkki L.M., Gusev N.B. Degradation of cardiac troponin I: Implication for reliable immunodetection // *Clin Chem.* – 1998. – V.44. – p.2433 – 2440.
165. Khamchian S., R. Madani R., Golchinfar F., Taghavian M. Development of a sandwich enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) for determining of bovine serum albumin (BSA) in trivalent measles–mump–rubella (MMR) vaccines // *Hum Vaccin.* – 2008. – V.4. – №5. – p.375 – 378.
166. Kim K.J., Li B., Armanini M., Gillett N., Phillips H. Inhibition of vascular endothelial growth factor–induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo* // *Nature.* – 1993. – V.362. – 841 – 844.
167. Kim S.J., Park Y., Hong H.J. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies // *Mol Cells.* – 2005. – V.20. – p.17 – 29.
168. Kimura K., Mason T. L., Khorana H. G. Immunological probes for bacteriorhodopsin. Identification of three distinct antigenic sites on the cytoplasmic surface // *The Journal of Biological Chemistry.* –1982. – V.257. – №6. – p.2859 – 2867.
169. Kreitman R.J. Immunotoxins for Targeted Cancer Therapy // *AAPS Journal.* – 2006. – V.8. – №3. – p.E532 – E551.
170. Kreitman R.J., Pastan I. Recombinant single–chain immunotoxins against T and B cell leukemias // *Leuk Lymphoma.* – 1994. – V.13. – p.1 – 10.
171. Krishnamurti U., Steffes M.W. Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus // *Clin. Chem.* – 2001. – V.47. – №7. – p.1157 – 1165.
172. Kolaskar A., Tongaonkar P.C. A semi–empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens // *FEBS Lett.* – 1990. – V.276. –p.172 – 174.
173. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature.* –1975 – V.256. – p.495 – 497.
174. Koivunen M.E., Krogsrud R.L. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories // *Labmedicine.* – 2006. – V.37. –№8. – p. 490 – 497.

175. Kuang H., Wang W., Xu L., Ma W., Liu L., Wang L., Xu C. Monoclonal Antibody–based sandwich ELISA for the detection of Staphylococcal enterotoxin A // *Int J Environ Res Public Health*. – 2013. – V.10. – №4. – p.1598 – 1608.
176. Kudryakova I.V., Shishkova N.A., Vasilyeva N.V. Outer membrane vesicles of *Lysobacter* sp. XL1: biogenesis, functions, and applied prospects // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2016. – V.100. – №11. – p.4791 – 4801.
177. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vasilyeva N.V. Biogenesis of *Lysobacter* sp. XL1 vesicles // *FEMS Microbiol Lett*. – 2015. – V.362. – №18. – p.137.
178. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V.227. – p.680 – 685.
179. Lapteva Y.S., Zolova O.E., Shlyapnikov M.G., Tsfasman I.M., Muranova T.A., Stepnaya O.A., Kulaev I.S., Granovsky I.E. Cloning and Expression Analysis of Genes Encoding Lytic Endopeptidases L1 and L5 from *Lysobacter* sp. Strain XL1 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V.78. – №19. – p.7082 – 7089.
180. Latman N.S., Bruot B.C. Evaluation of home pregnancy test kits // *Biomed. Instrum. Technol*. – 1989. – V.23. – p.144 – 149.
181. Lequin R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ELISA) // *Clinical Chemistry*. – 2005. – V.51. – №12. – p.2415 – 2418.
182. Li Y., Kandasamy M.K., Meagher R.B. Rapid isolation of monoclonal antibodies. Monitoring enzymes in the phytochelatin synthesis pathway // *Plant Physiology*. – 2001. – V.127. – p.711 – 719.
183. Lin J.J.–C., Queally S.A. A monoclonal antibody that recognizes Golgi–associated protein of cultured fibroblast cells // *The Journal of Cell Biology*. – 1982. – V.92. – p.108 – 112.
184. Lipsky P.E., van der Heijde D.M., St Clair E.W., Furst D.E., Breedveld F.C., Kalden J.R., Smolen J.S., Weisman M., Emery P., Feldmann M., Harriman G.R., Maini R.N. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Antitumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group // *N Engl J Med*. – 2000. – V.343. – p.1594 – 1602.
185. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms // *Curr Opin Immunol*. – 2008. – V.20. – p.450 – 459.
186. Loomans E.E.M.G., Wiltenburg J.V., Koets M., Amerongen A.V. Neamin as an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk // *J Agric Food Chem*. – 2003. – V.51. – p.587 – 593.

187. Ludwig J.A., Weinstein J.N. Biomarkers in cancer. staging, prognosis and treatment selection // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – V.5. – p.845 – 856.
188. Lum L.G., Thakur A. Targeting T cells with bispecific antibodies for cancer therapy // *BioDrugs.* – 2011. V.25. – p.365 – 379.
189. Lundin J., Kimby E., Bjorkholm M., Broliden P.A., Celsing F., Hjalmar V., et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia // *Blood.* – 2002. – V.100. – p.768 – 773.
190. Malomgré W., Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V.393. – p.1443 – 1451.
191. Malottki K., Barton P., Tsourapas A., Uthman A.O., Liu Z., Routh K., Connock M., Jobanputra P., Moore D., Fry-Smith A., Chen Y.F. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation // *Health Technol Assess.* – 2011. – V.15. – p.1 – 278.
192. Maragos C.M., Busman M., Plattner R.D. Development of monoclonal antibodies for the fusarin mycotoxins // *Food Additives and Contaminants.* – 2008. – V.25. – №1. – p.105 – 114.
193. Martin P., Furman R.R., Coleman M., Leonard J.P. Phase I to III trials of anti-B cell therapy in non-Hodgkin's lymphoma // *Clin Cancer Res.* – 2007. – V.13. – №18. – p.5636 – 5642.
194. Maznyczka A., Kaier T., Marber M. Troponins and other biomarkers in the early diagnosis of acute myocardial infarction // *J Postgrad Med.* – 2015. – V.91. – №1076. – p.322 – 330.
195. Migueles S.A., Connors M. The role of CD4(+) and CD8(+) T cells in controlling HIV infection // *Curr Infect Dis Rep.* – 2002. – V.4. – p.461 – 467.
196. Miyoshi-Akiyama T., Yamashiro T., Mai le Q., Narahara K., Miyamoto A., Shinagawa S., Mori S., Kitajima H., Kirikae T. Discrimination of influenza A subtype by antibodies recognizing host-specific amino acids in the viral nucleoprotein // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2012. – V.6. – №6. – p.434 – 441.
197. Moekotte A.L., Huson M.A., van der Ende A.J., Agnandji S.T., Huizenga E., Goorhuis A., Grobusch M.P. Monoclonal antibodies for the treatment of Ebola virus disease // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2016. – V.25. – №11. – p.1325 – 1335.

198. Molina A., Valladares M., Sancho D., Viedma F., Sanjuan I., Sánchez– Madrid F., Gambón F., González–Fernández A. The use of transgenic mice for the production of a human monoclonal antibody specific for human CD69 antigen // *J Immunol Methods*. – 2003. – V.2823. – p.147 – 158.
199. Morrison S.L., Johnson M.J., Herzenberg L.A., Oi V.T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1984. – V.81. – p.6851 – 6855.
200. Morrison V.A. Immunosuppression associated with novel chemotherapy agents and monoclonal antibodies // *Clin Infect Dis*. – 2014. – V.59. – №5. – 360 – 364.
201. Nam D.H., Fang K., Rodriguez C., Lopez T., Ge X. Generation of inhibitory monoclonal antibodies targeting matrix metalloproteinase–14 by motif grafting and CDR optimization // *Protein Eng Des Sel*. – 2017. – V.30. – №2. – p.113 – 118.
202. Na I., Kong M.J., Straight S., Pinto J.R., Uversky V.N. Troponins, intrinsic disorder, and cardiomyopathy // *Biol Chem*. – 2016. – V.397. – №8. – p.731 – 751.
203. Nakamura R.M., Binder W.L. Current concepts and diagnostic evaluation of autoimmune disease // *Arch Pathol Lab Med*. – 1988. – V.112. – №9. – p.869 – 877.
204. Naylor M.F., Zhou F., Geister B.V., Nordquist R.E., Li X., Chen W.R. Treatment of advanced melanoma with laser immunotherapy and ipilimumab // *J Biophotonics*. – 2017. – V.10. – №5. – p.618 – 622.
205. Nevinsky G.A., Favorova O.O., Buneva V.N. (2002) Natural catalytic antibodies – new characters in the protein repertoire. In: Protein–protein interactions; a molecular cloning manual. E. Golemis (eds.) Cold.:Spring Harbor. – p.523 – 534.
206. Nicholls J.M., Wong L.P., Chan R.W., Poon L.L., So L.K., Yen H.L., Fung K., van Poucke S., Peiris J.S. Detection of highly pathogenic influenza and pandemic influenza virus in formalin fixed tissues by immunohistochemical methods // *J Virol Methods*. – 2012. – V.179. – №2. – p.409 – 413.
207. Nossal N.G., Heppel L.A. The release of enzymes of osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase // *J. Biol. Chem*. – 1966. – V.241. – p.3055 – 3062.
208. Olafsen T., Sirk S.J., Betting D.J., Kenanova V.E., Bauer K.B., Ladno W., Raubitschek A.A., Timmerman J.M., Wu A.M. ImmunoPET imaging of B–cell lymphoma using 124I–anti–CD20 scFv dimers (diabodies) // *Protein Eng Des Sel*. – 2010. – V.23. – p.243 – 249.
209. Omland T., Røsjø H., Giannitsis E., Agewall S. Troponins in heart failure // *Clin Chim Acta*. – 2015. – V.443. – p.78 – 84.

210. Osterborg A., Dyer M.J., Bunjes D., Pangalis G.A., Bastion Y., Catovsky D., Mellstedt H. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European study group of CAMPATH-1H Treatment in chronic lymphocytic leukemia // *J. Clin. Oncol.* – 1997. – V.15. – №4. – p.1567 – 1574.
211. Otukesh H., Hoseini R., Rahimzadeh N., Fazel M. Rituximab in the treatment of nephrotic syndrome: a systematic review // *Iran J Kidney Dis.* – 2013. – V.7. – №4. – p.249 – 256.
212. Ovchinnikov Yu.A., Abdulaev N.G., Vasilov R.G., Vturina J.Yu., Kuryatov A.B., Kiselev A.V. The antigenic structure and topography of bacteriorhodopsin in purple membranes as determined by interaction with monoclonal antibodies // *FEBS Letters.* – 1985. – V.179. – №2. – p.343 – 350.
213. Owen C.J., Stewart D.A. Obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: overview and perspective // *Ther Adv Hematol.* – 2015. – V.6. – №4. – p.161 – 170.
214. Pai L.H., Pastan I. (1995) Immunotoxins and recombinant toxins. In: *Biologic Therapy of Cancer*. DeVita V.T.Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). 2nd edn. JB Lippincott Company, Philadelphia. – p.521 – 533.
215. Pashkov V.S., Balashova T.A., Zhemaeva L.V., Sikilinda N.N., Kutuzov M.A., Abdulaev N.G., Arseniev A.S. Conformation of surface exposed N-terminus part of bacteriorhodopsin studied by transferred NOE technique // *FEBS Letters.* – 1996. – V.381. – p.119 – 122.
216. Pastan I. Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins // *Biochim Biophys Acta.* – 1997. – 1333. – p.1 – 6.
217. Pegram M.D., Pauletti G., Slamon D.J. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy // *Breast Cancer Res Treat.* – 1998. – V.52. – №1–3. – p.65 – 77.
218. Pereboev A., Borisevich V., Tsuladze G., Shakhmatov M., Hudman D., Kazachinskaia E., Razumov I., Svyatchenko V., Loktev V., Yamshchikov V. Genetically delivered antibody protects against West Nile virus // *Antiviral Research.* – 2008. – V.77. – №1. – p.6 – 13.
219. Peters J.H., Baumgarten H. *Monoclonal antibodies*. Springer Verlag: Berlin; N.Y. – 1992.
220. Peters R., Shiau A., Sohl J., Anderson D.E., Tang G., Silen J., Agard D. Pro region C-terminus: protease active site interactions are critical in catalyzing the folding of α -lytic protease // *Biochemistry.* – 1998. – V.37. – p.12058 – 12067.

221. Preijers F.W., Huys E., Moshaver B. OMIP-010: a new 10-color monoclonal antibody panel for polychromatic immunophenotyping of small hematopoietic cell samples // *Cytometry A*. – 2012. – V.81. – №6. – p.453 – 455.
222. Pruzina S., Williams G., Kaneva G., Davies S., Martín-López A., Brüggemann M., Vieira S.M., Jeffs S.A., Sattentau Q.J., Neuberger M.S. Human monoclonal antibodies to HIV-1 gp140 from mice bearing YAC-based human immunoglobulin transloci // *Protein Eng Des Sel*. – 2011. – V.24. – p.791 – 799.
223. Putalun W., Morinaga O., Tanaka H., Shoyama Y. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides A and B // *Phytochem Anal*. – 2004. – V.15. – p.112 – 116.
224. Pyo D., Yoo J. New trends in fluorescence immunochromatography // *J Immunoassay Immunochem*. – 2012. – V.33. – p.203 – 222.
225. Rastogi A., Tan S.H., Banerjee S., Sharad S., Kagan J., Srivastava S., McLeod D.G., Srinivasan A. ERG monoclonal antibody in the diagnosis and biological stratification of prostate cancer: delineation of minimal epitope, critical residues for binding, and molecular basis of specificity // *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*. – 2014. – V.33. – №4. – p.201 – 208.
226. Razumov I.A., Kazachinskaia E.I., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Galkina I.V., Gromashevskii V.L., Prilipov A.G., L'vov D.K., Loktev V.B. Neutralizing monoclonal antibodies against Russian Strain of the West Nile Virus // *Viral Immunology*. – 2005. – V.18. – №3. – p.558 – 568.
227. Renaudineau Y., Devauchelle-Pensec V., Hanrotel C., Pers J.O., Saraux A., Youinou P. Monoclonal anti-CD20 antibodies: mechanisms of action and monitoring of biological effects // *Joint Bone Spine*. – 2009. – V.76. – №5. – p.458 – 463.
228. Riley J.K., Sliwkowski M.X. CD20: a gene in search of a function // *Semin Oncol*. – 2000. – V.27. – №12. – p.17 – 24.
229. Rizzieri D. Zevalin (®) (ibritumomab tiuxetan): After more than a decade of treatment experience, what have we learned? // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2016. – V.105. – p.5 – 17.
230. Rioufol C., Salles G. Obinutuzumab for chronic lymphocytic leukemia // *Expert Rev Hematol*. – 2014. – V.7. – №5. – p.533 – 543.
231. Rodríguez A.M., Rodríguez O.Z., Conde I.B., et al. Purification of human chorionic gonadotropin from pregnant urine by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody anti- β chain hCG // *Hybridoma*. – 2005. – V.24. – №5. – p.258 – 262.

232. Rosman Z., Shoenfeld Y., Zandman–Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update // *BMC Med.* – 2013. – V.11. – №1. – p.88.
233. Roviello G., Sobhani N., Generali D. Bevacizumab in small cell lung cancer // *Ann Transl Med.* – 2017. – V.5. – №17. – p.361.
234. Rubina A.Y., Filippova M.A., Feizkhanova G.U., Shepeliakovskaya A O., Sidina E.I., Boziev Kh.M., Laman A.G., Vcrtiev Yu.V., Zasedatelev A.S., Grishin E.V. Simultaneous detection of seven staphylococcal enterotoxins: development of hydrogel biochips for analytical and practical application // *Anal. Chem.* – 2010 – V.82. – p.8881 – 8889.
235. Safford J.W., Abbott G.G., Craine M.C., MacDonald R.G. Automated microparticle enzyme immunoassays for IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* // *J. Clin. Pathol.* – 1991. – V.44. – p.238 – 242.
236. Salles G., Barrett M., Foa` R., Maurer J., O'Brien S., Valente N., Wenger M., Maloney D. G. Rituximab in B–Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience // *Adv Ther.* – 2017. – V.34. – №10. – p.2232 – 2273.
237. Sato K., Ichiyama S., Iinuma Y., Nada T., Shimokata K., Nakashima N. Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainascreen HBsAg and Dainascreen Ausab // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – V.34. – p.1420 – 1422.
238. Sauter N., Mau T., Rader S., Agard D. Structure of a–lytic protease complexed with its pro region // *Nat Struct Biol.* – 1998. – V.5. – №11. – p.945 – 950.
239. Schrier W.H., Schoengold R.J., Baker J.T., Norell J.L., Jaseph C.L., Okin Y., Doe J.Y., Chandler H. Development of FlexSure HP–an immunochromatographic method to detect antibodies against *Helicobacter pylori* // *Clin. Chem.* – 1998. – V.44. – p.293 – 298.
240. Schuurs A.H.W.M., van Weemen B.K. Enzyme–immunoassay: a powerful analytical tool // *J Immunoassay.* – 1980. – V.1. – p.229 – 249.
241. Seiter K., Mamorska–Dyga A. Obinutuzumab treatment in the elderly patient with chronic lymphocytic leukemia // *Clin Interv Aging.* – 2015. – V.12. – №10. – p.951 – 961.
242. Selvaraju S., Rassi Z.E. Liquid–phase–based separation systems for depletion, prefractionation and enrichment of proteins in biological fluids and matrices for in–depth proteomics analysis–An update covering the period 2008–2011 // *Electrophoresis.* – 2012. – V.33. – №1. – p.74 – 88.
243. Semenov A.G., Postnikov A.B., Tamm N.N., Seferian K.R., Karpova N.S., Bloschitsyna M.N., Koshkina E.V., Krasnoselskiy M.I., Serebryanaya D.V., Katrukha

- A.G. Processing of proBNP is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site // *Clinical Chemistry*. – 2009. – V.55. – №3. – p.489 – 498.
244. Shah A. Obinutuzumab: A Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia // *Ann Pharmacother*. – 2014. – 48. – №10. – p.1356 – 1361.
245. Shah A. New developments in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: role of obinutuzumab // *Ther Clin Risk Manage*. – 2015. – V.11. – p.1113 – 1122.
246. Shirin H., Bruck R., Kenet G., Krepel Z., Wardi Y., Reif S., Zaidel L., Geva D., Avni Y., Halpern Z. Evaluation of a new immunochromatographic test for *Helicobacter pylori* IgG antibodies in elderly symptomatic patients // *J. Gastroenterol*. – 1999. – V.34. – p.7 – 10.
247. Shivanand P. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. – 2010. – V.1. – №2. – p.88 – 94.
248. Shivraj G., Prakash B.D., Sonal V., Shruthi K., Vinayak H., Avinash M. Thyroid function tests: a review // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. – 2009. – V.13. – №5. – p.341 – 349.
249. Shoyama Y., Tanaka H., Fukuda N. Monoclonal antibodies against naturally occurring bioactive compounds // *Cytotechnology*. – 1999. – V.31. – p.9 – 27.
250. Shyu R.H., Shyu H.F., Liu H.W., Tang S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin // *Toxicon*. – 2002. – V.40. – p.255 – 258.
251. Smallshaw J.E., Ghetie V., Rizo J., Fulmer J.R., Trahan L.L., Ghetie M.A., Vitetta E.S. Genetic engineering of an immunotoxin to eliminate pulmonary vascular leak in mice // *Nat Biotechnol*. – 2003. – V.21. – p.387 – 391.
252. Silen J., McGrath C., Smith K., Agard D. Molecular analysis of the gene encoding a-lytic protease: evidence for a preproenzyme // *Gene*. – 1988. – V.69. – p.231 – 244.
253. Silen J.L., Frank D., Fujishige A., Bone R., Agard D.A. Analysis of prepro- α -lytic protease expression in *Escherichia coli* reveals that the pro region is required for activity // *J Bacteriol*. – 1989. – V.171. – p.1320 – 1325.
254. St Clair E.W. Novel targeted therapies for autoimmunity // *Curr Opin Immunol*. – 2009. – V.21. – №6. – p.648 – 657.
255. Stamm W.E., Cole B., Fennell C., Bonin P., Armstrong A.S., Herrmann J.E., Holmes K.K. Antigen detection for the diagnosis of gonorrhea // *J. Clin. Microbiol*. – 1984. – V.19. – №3. – p.399 – 403.

256. Struyf F., Lemmens A., Valadas E., Verhaegen J., Van Ranst M. Usefulness of immunochromatographic detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as an adjunct to auramine staining for rapid diagnosis of tuberculosis in a low-prevalence setting // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1999. – V.18. – p.740 – 742.
257. Subkowski T., Hillen H., Kröger B., Schmidt M. Monoclonal antibodies against human endothelin-converting enzyme-1 // *Journal of Immunoassay.* – 1998. – V.19. – p.75 – 93.
258. Suzuki H. Recent advances in abzyme studies // *J. Biochem.* – 1994. – V.115. – p.623 – 628.
259. Swancutt M.A., Twehous D.A., Norgard M.V. Monoclonal antibody selection and analysis of a recombinant DNA-derived surface immunogen of expressed in *Escherichia coli* // *Infection and Immunity.* – 1986. – V.52. – №1. – p.110 – 119.
260. Takeda H., Zhou W., Kido K., Suno R., Iwasaki T., Kobayashi T., Sawasaki T. CP5 system, for simple and highly efficient protein purification with a C-terminal designed mini tag // *PLoS One.* – 2017. – V.12. – №5. – e0178246.
261. Takimoto C.H., Calvo E. (2008) Principles of oncologic pharmacotherapy. In: Cancer management: a multidisciplinary approach. Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA et al (eds). 11th edn. United Business Media., New York. – p.42 – 58.
262. Tay R.Y., Wong R., Hawkes E.A. Treatment of metastatic colorectal cancer: focus on panitumumab // *Cancer Manag Res.* – 2015. – V.7. – p.189 – 198.
263. Tedder T.F., Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes // *Immunol Today.* – 1994. – V.15. – №9. – p.450 – 454.
264. Thomas D.A., O'Brien S., Kantarjian H.M. Monoclonal antibody therapy with rituximab for acute lymphoblastic leukemia // *Hematology/Oncology Clinics of North America.* – 2009. – V.23. – p.949 – 971.
265. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Melnik B., Kudryakova I., Latypov O., Vasilyeva N., Leontievsky A. Structural Studies of Component of Lysoamidase Bacteriolytic Complex from *Lysobacter* sp. XL1 // *Protein J.* – 2016. – V.35. – №1. – p.44 – 50.
266. Toor S.M., Syed Khaja A.S., Alkurd I., Elkord E. *In vitro* effect of pembrolizumab on different T regulatory cell subsets // *Clin Exp Immunol.* – 2017. – doi: 10.1111/cei.13060.
267. Torlesse H., Wurie I.M., Hodges M. The use of immunochromatography test cards in the diagnosis of hepatitis B surface antigen among pregnant women in West Africa // *Br. J. Biomed. Sci.* – 1997. – V.54. – p.256 – 259.

268. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1979. – V.76. – p.4350 – 4354.
269. Tramont E.C. (1995) *Traponema pallidum* (Syphilis). In: Principles and Practice of infectious Diseases. Mandell, Douglas, Bennett's (eds.). Churchill Livingstone, New York., USA. – 6th edn. – p.2769 – 2785.
270. Urusov A.E., Kostenko S.N., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A // *J Anal Chem*. – 2011. – V.66. – p.770 – 776.
271. Vaidya H.C. Myoglobin: an early biochemical marker for the diagnosis of acute myocardial infarction // *Clin. Immunoassay*. – 1994. – V.17. – №1. – p.35 – 39.
272. Vaks L., Benhar I. (2013) Production of stabilized scFv antibody fragments in the *E. coli* bacterial cytoplasm. In: Human Monoclonal Antibodies. Methods in Molecular Biology (M. Steinitz ed.). Humana Press. Totowa, NJ. – V.1060. – p.171 – 184.
273. Van den Brande J.M., Braat H., van den Brink G.R., Versteeg H.H., Bauer C.A., Hoedemaeker I., van Montfrans C., Hommes D.W., Peppelenbosch M.P., van Deventer S.J.H. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease // *Gastroenterology*. – 2003. – V.124. – p.1774 – 1785.
274. Van der Waart M., Snelting A., Cichy J., Wolters G., Schuurs A.H.W.M. Enzyme-immunoassay in diagnosis of hepatitis with emphasis on the detection of "e" antigen (HbeAg) // *J Med Virol*. – 1978. – V.3. – p.43 – 49.
275. Van Weeman B.K., Schuurs A. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates // *FEBS Letters*. – 1971. – V.15. – p.232 – 236.
276. Varich N.L., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Kochergin-Nikitsky K.S., Kushch A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Gitelman A.K., Kaverin N.V. Anti-body binding epitope differences in the nucleoprotein of avian and mammalian influenza A viruses // *Viral Immunol*. – 2011. – V.24. – №2. – p.101 – 107.
277. Vasilyeva N.V., Shishkova N.A., Marinin L.I., Ledova L.A., Tsfasman I.M., Muranova T.A., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Lytic peptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 with broad antimicrobial spectrum // *J Mol Microbiol Biotechnol*. – 2014. – V.24. – №1. – p.59 – 66.
278. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Kudryakova I.V., Suzina N.E., Kulaev I.S., Stepnaya O.A., Shishkova N.A. The role of membrane vesicles in secretion of *Lysobacter* sp. bacteriolytic enzymes // *J Mol Microbiol Biotechnol*. – 2013. – V.23. – p.142 – 151.

279. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles // *FEBS J.* – 2008. – V.275. – №15. – p.3827 – 3835.
280. Voller A., Bidwell D. (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay. In: *Manual of clinical immunology*. Rose N.R., Friedman H., Fahey J.L. (eds), 3rd edn. American Society for Microbiology.: Washington, DC. – p.99 – 109.
281. Wang C.S., Liverman R.S., Garro R., George R.P., Glumova A., Karp A, Jernigan S, Warshaw B. Ofatumumab for the treatment of childhood nephrotic syndrome // *Pediatr Nephrol.* – 2017. – V.32. – №5. – p.835 – 841.
282. Wang W., Wang E.Q., Balthasar J.P. Monoclonal Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics // *Clin Pharmacol Ther.* – 2008. – V.84. – № 5. – p.548 – 558.
283. Wang W., Liu L., Xu L., Ma W., Kuang H., Xu C. Detection of β -lactamase residues in milk by sandwich ELISA // *Int J Environ Res Public Health.* – 2013. – V.10. – №7. – p.2688 – 2698.
284. Wang Y., He F., Wan Y., Meng M., Xu J., Zhang Y., ... Xi R. Indirect competitive enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) for nitroimidazoles in food products // *Food Additives and Contaminants Part A—Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment.* – 2011. – V.28. – №5. – p.619 – 626.
285. Watanabe E., Miyake S. Quantitative analysis of fungicide azoxystrobin in agricultural samples with rapid, simple and reliable monoclonal immunoassay // *Food Chemistry.* – 2013. – V.136. – p.695 – 702.
286. Watanabe H., Satake A., Kido., Tsuji A. Monoclonal-based enzyme linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for enrofloxacin in biological matrices // *Analyst.* – 2002. – V.127. – p.98 – 103.
287. Webster R.G., Laver W.G., Air G.M., Ward C., Gerhard W., van Wyke K.L. The mechanism of antigenic drift in influenza viruses: analysis of Hong Kong (H3N2) variants with monoclonal antibodies to the hemagglutinin molecule // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1980. – V.354. – p.142 – 161.
288. Weiler E.W., Zenk M.H. Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata* // *Phytochemistry.* – 1976. – V.15. – p.1537 – 1545.
289. Wendling D., Racadot E., Wijdenes J. Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody // *J Rheumatol.* – 1993. – V.20. – p.259 – 262.
290. Wennig R., Moeller M.R., Haguenoer J.M., Marocchi A., Zoppi F., Smith B.L., de la Torre R., Carstensen C.A., Goerlach-Graw A., Schaeffler J., Leinberger R. Development

- and evaluation of immunochromatographic rapid tests for screening of cannabinoids, cocaine, and opiates in urine // *J Anal Toxicol.* – 1998. – V.22. – №2. – p.148 – 155.
291. Wolters G., Kuijpers L.P.C., Kacaki J., Schuurs A.H.W.M. Enzyme immunoassay for HbsAg // *Lancet.* – 1976. – V.2. – p.690.
292. Wu B., Yao Y., Zhang K., Ma X. RAS testing and cetuximab treatment for metastatic colorectal cancer: a cost-effectiveness analysis in a setting with limited health resources // *Oncotarget.* – 2017. – V.8. – №41. – p.71164 – 71172.
293. Wu X., Wang W., Liu L., Kuang H., Xu C. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella spp.* in milk samples // *Anal. Methods.* – 2015. – V.7. – №21. – p.9047 – 9053.
294. Xu Z.L., Zeng D.P., Yang J.Y., Shen Y.D., Beier R.C., Lei H.T., Wang H., Sun Y.M. Monoclonal Antibody-Based Broad-Specificity Immunoassay for Monitoring Organophosphorus Pesticides in Environmental Water Samples // *Journal of Environmental Monitoring.* – 2011. – V.13. – №11. – p.3040 – 3048.
295. Yamaguchi N., Jinbo Y., Arai M., Koyama K. Visualization of the morphology of purple membrane surfaces by monoclonal antibody techniques // *FEBS Letters.* – 1993. – V.324. – №3. – p.287 – 292.
296. Yang L.G. (1998). Enzyme immunoassay (1st ed.). Nanjing.: Nanjing University Press. – p.2 – 10.
297. Yang M., Berhane Y., Salo T., Li M., Hole K., Clavijo A. Development and application of monoclonal antibodies against avian influenza virus nucleoprotein // *J Virol Methods.* – 2008. – V.147. – №2. – p.265 – 274.
298. Yong J., Jin-Wook J., Chang-Hoon H., Mun-Han L. Development of ELISA and Immunochromatographic assay for the detection of gentamicin // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V.53. – p.7639 – 7643.
299. Yong J., Jin-Wook J., Mun-Han L., Chang-Hoon H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin // *Clinica Chimica Acta.* – 2006. – V.364. – p.260 – 266.
300. Yoshizaki K., Nishimoto N., Mihara M., Kishimoto T. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody // *Springer Semin Immunopathol.* – 1998. – V.20. – p.247 – 259.
301. Ziemssen T., Thomas K. Alemtuzumab in the long-term treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an update on the clinical trial evidence and data from the real world // *Ther Adv Neurol Disord.* – 2017. – V.10. – №10. – p.343 – 359.

302. Zhang A., Jin M., Liu F., Guo X., Hu Q., Han L., Tan Y., Chen H. Development and evaluation of a DAS–ELISA for rapid detection of avian influenza viruses // *Avian Dis.* – 2006. – V.50. – №3. – p.325 – 330.
303. Zola H. (2010) Monoclonal Antibodies. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons eds. Ltd: Chichester. 10.1002/9780470015902.a0001205.pub3.
304. Zola H., Swart B., Banham A., Barry S., Beare A., Bensussan A., Bousmell L., D' Buckley C., Bühring H.J., Clark G., Engel P., Fox D., Jin B.Q., Macardle P.J., Malavasi F., Mason D., Stockinger H., Yang X. CD molecules 2006–human cell differentiation molecules // *J Immunol Methods.* – 2007. – V.319. – p.1 – 5.
305. Zola H., Swart B., Nicholson I., Aasted B., Bensussan A., Bousmell L., Buckley C., Clark G., Drbal K., Engel P., Hart D., Horejsí V., Isacke C., Macardle P., Malavasi F., Mason D., Olive D., Saalmueller A., Schlossman S.F., Schwartz–Albiez R., Simmons P., Tedder T.F., Uguccioni M., Warren H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules // *Blood.* – 2005. – V.106. – №9. – p.3123–3126.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах:

1. Руденко Н.В., Цфасман И.М., Латыпов О.Р., Ледова Л.А., Красовская Л.А., Каратовская А.П., Бровко Ф.А., Васильева Н.В., Степная О.А. Определение пропептидов литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 методом сэндвич–иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител // *Биоорганическая химия*. – 2014. – Т.40. – № 3. – с.297 – 304.
2. Karatovskaya A.P., Rudenko N.V., Tsfasman I.M., Guseva K.A., Laman A.G., Boziev K.M., Brovko F.A., Vasilyeva N.V. Development of a method for the quantitation of homologous endopeptidases AlpA and AlpB from *Lysobacter* sp. XL1 // *Process Biochem.* – 2016. – V.51. – p.1521 – 1526.
3. Руденко Н.В., Каратовская А.П., Цфасман И.М., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение внутри и внеклеточной локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 // *Биоорганическая химия*. – 2017. – Т.43. – № 5. – с.49 – 54.

Материалы научных конференций и тезисы докладов:

1. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Красовская Л.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение эндопептидазы AlpA, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // *Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2013»*. – 2013. – Тула (Россия). – с.10.
2. Каратовская А.П., Чемерисова В.Н., Васильева Н.В., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Руденко Н.В. Получение и характеристика моноклональных антител к зрелой форме эндопептидазы AlpA, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // *XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии»*. – 2013. – Москва (Россия). – Т.1. – с.56.
3. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Разработка тест–системы в формате сэндвич – иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител для количественного определения эндопептидазы L1, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // *Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2014»*. – 2014. – Тула (Россия). – с.18.
4. Каратовская А.П. Иммунохимическая стандартизация лизоамидазы – антимикробного препарата нового поколения // *Седьмая региональная научно–*

- практическая конференция «Молодежные научно–инновационные проекты Московской области»*. – 2014. – п. Дубровицы (Россия). – с.55.
5. А.П. Каратовская, Н.В. Руденко, И.М. Цфасман, К.А. Гусева, Ф.А. Бровко, Н.В. Васильева. Иммунохимическое определение внеклеточной эндопептидазы Л1 *Lysobacter* sp. XL1 // *XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии»*. – 2015. – Москва (Россия). – с.60.
 6. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Разработка метода иммунохимического определения эндопептидазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител // *19 Международная Пушчинская школа – конференция молодых ученых – Биология наука XXI века*. – 2015. – Пушкино (Россия). – с.133.
 7. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Количественное определение высоко гомологичных эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител // *Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2015»*. – 2015. – Тула (Россия). – с.15.
 8. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Метод сэндвич–иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител для оценки продукции фермента AlpB бактерией *Lysobacter* sp. XL1 // *XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии»*. –2016. – Москва (Россия). – с.47.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю, к.х.н., с.н.с. лаборатории иммунохимии ФИБХ РАН Руденко Н.В., за ценное руководство в проведении исследовательской работы, анализе полученных результатов, а также за постоянное внимание и поддержку. Автор выражает благодарность и искреннюю признательность за плодотворную совместную работу, ценные советы, анализ и обсуждение полученных результатов зав. лабораторией биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино к.б.н. Васильевой Н.В и с.н.с. к.б.н. Цфасман И.М. Автор выражает благодарность за постоянную поддержку, ценные советы, помощь и участие в ходе выполнения работы зав. лабораторией иммунохимии ФИБХ РАН Бровко Ф.А., к.б.н. с.н.с. Шепеляковской А.О., к.х.н. с.н.с. Ламану А.Г, и всем сотрудникам лаборатории иммунохимии ФИБХ РАН.