



УДК 612.398.145.3+535.372

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ IgG И IgA МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ НАНОТЕЛ

© 2025 г. Л. И. Мухаметова*, #, С. А. Еремин*, И. В. Михура**, О. С. Горяйнова***, Т. И. Иванова***, С. В. Тиллиб***, #

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

** ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*** ФГБУН “Институт биологии гена” РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Поступила в редакцию 07.03.2025 г.

После доработки 21.03.2025 г.

Принята к публикации 22.03.2025 г.

Количественный, быстрый и высокопроизводительный анализ иммуноглобулинов IgG и IgA необходим для определения содержания этих белков и ассоциированных с ними молекул в физиологических жидкостях больных. Анализ этих белков необходим при диагностике дефицита специфических антител в качестве вспомогательного теста для выявления общего переменного иммунодефицита, а также для оценки степени риска пациентов с низким уровнем IgA. Определение содержания IgG может помочь при назначении ревакцинации пациентам и поддержки стратегии их лечения, использоваться для мониторинга гуморальной иммунной системы пациента, а также при разработке и последующем производстве большинства терапевтических антител в биофармацевтике. Миниатюрные рекомбинантные однодоменные антитела (нанотела) обладают рядом преимуществ перед классическими антителами, таких как относительная простота их наработки, высокая стабильность в широком диапазоне значений температуры и pH, способность узнавать высокоспецифические конформационные эпитопы целевого белка, а также возможность использования их в качестве зондов для детекции более крупных целевых белков-антигенов в методе поляризации флуоресценции. Получены и охарактеризованы флуоресцентно-меченные нанотела FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA к IgG и IgA человека. Определены K_d комплексов FITC-anti-IgG*IgG и FITC-anti-IgA*IgA, подтверждающие высокую аффинность иммунореагентов. Показана возможность специфичного определения содержания IgG и IgA в сыворотке крови человека в диапазоне 35–120 мкг/мл (для IgA) и 75–260 мкг/мл (для IgG). Протестированы 18 сывороток человека на содержание IgG и IgA, количество антител в образцах подтверждено определением с использованием коммерческих иммуноферментных наборов. Показано, что FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA не взаимодействуют с другими белками человека: альбумином, плазминогеном, фибриногеном, лактоферрином и трансферрином. Тестирование сывороток человека и животных с FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA продемонстрировало специфичное связывание с антисыворотками человека и обезьяны, но не с сыворотками животных: быка, собаки, кошки, кролика и овцы. Таким образом, метод FPIA может быть использован для быстрого и специфичного определения IgG и IgA человека.

Ключевые слова: однодоменное антитело, нанотело, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, иммуноглобулины классов G и A

DOI: 10.7868/S1998286025060083

Сокращения: Ab – антитело; IgG – иммуноглобулины класса G; IgA – иммуноглобулины класса A; FPIA – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; FP – поляризация флуоресценции; FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат; Nb – нанотело, или однодоменное антитело.

Авторы для связи: (эл. почта: liliya106@mail.ru; tillib@genebiology.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Антитела (Ab) – это крупные глобулярные белки, секретируемые клетками иммунной системы организма и предназначенные для нейтрализации чужеродных веществ, антигенов. Антитела образуют целое белковое суперсемейство, их относят к различным классам или изотипам (IgA, IgG, IgD, IgE и IgM [1]), отличающимся между собой функциональными и структурными особенностями. Молекулы антител имеют Y-образную форму, на двух концах которой располагаются два одинаковых сайта связывания антигенов. В состав антитела входят две тяжелые цепи и две легкие цепи (рис. 1). Антитела класса IgG представляют собой мономер с молекулярной массой ~146 кДа и концентрацией в сыворотке крови ~9.0 мг/мл [2]. IgG синтезируется в основном при вторичном иммунном ответе на антигены. IgG могут активировать классический путь системы комплемента, а также обладают высокой протективной активностью. IgG – это единственный иммуноглобулин, который проникает через плаценту, защищая новорожденного от инфекционных заболеваний [3].

Антитела класса IgA представлены в двух различных молекулярных структурах: мономерной (сывороточной) и димерной (секреторной). Сывороточный IgA имеет молекулярную массу 160 кДа и концентрацию в сыворотке крови ~3 мг/мл. Секреторный IgA (sIgA) имеет молекулярную массу 385 кДа и среднюю концентрацию в сыворотке крови 0.05 мг/мл. IgA – основное антитело, содер-

жащееся в слюне, слезной жидкости, молозиве, выделениях из кишечника, в половых и дыхательных путях. Синтез и секреция IgA происходят в кишечнике, эпителии дыхательных путей, молочных железах в период лактации и различных других экзокринных железах, таких как слюнные или слезные. Считается, что основная функциональная роль IgA-антител заключается в защите эпителиальных поверхностей от инфекционных агентов, тогда как IgG-антитела защищают внеклеточные пространства внутренних тканей [4]. IgA предотвращают прикрепление бактерий или токсинов к эпителиальным клеткам, поглощение чужеродных веществ, обеспечивая таким образом первую линию защиты организма от широкого спектра патогенных микроорганизмов.

Дефицит IgA – наиболее распространенный первичный иммунодефицит (~1 из 700 человек), характеризующийся сниженным количеством сывороточного IgA и сопутствующим отсутствием секреторного IgA. При этом уровни других иммуноглобулинов находятся в норме. Диагноз устанавливается у лиц старше четырех лет, у которых уровень IgA в крови <7 мг/дл при нормальных уровнях IgG и IgM [5]. У лиц с выраженным дефицитом IgA наблюдаются повторные приступы бактериальных, энтеровирусных или протозойных инфекций желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей. Наиболее распространенными заболеваниями, связанными с дефицитом IgA, оказываются рецидивирующие легочные инфекции [5]. Новорожденные младенцы особенно

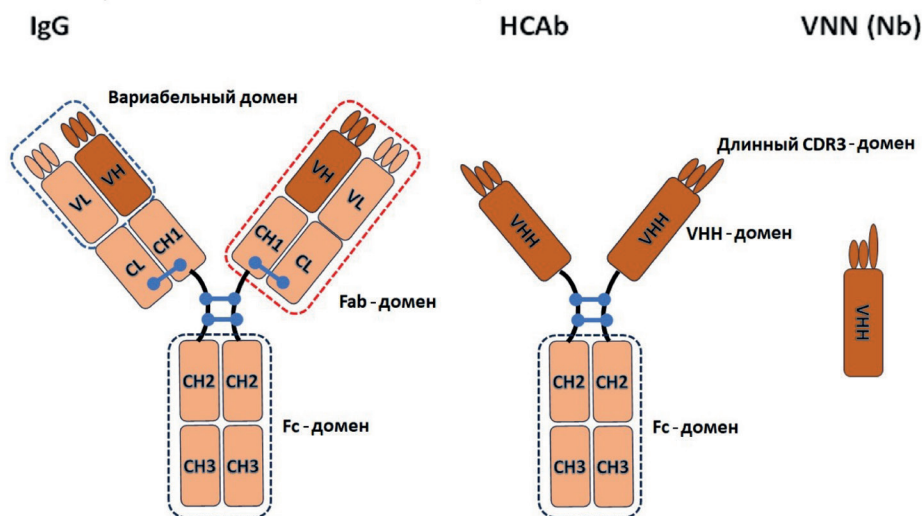


Рис. 1. Структура полноразмерных IgG, антител верблюда (HCAb) и рекомбинантных нанотел (VNN или Nb).

уязвимы к инфицированию, поскольку ранее не подвергались воздействию микроорганизмов из окружающей среды. IgA выделяются с грудным молоком матери и, попадая в кишечник новорожденного, обеспечивают защиту от вновь встречающихся бактерий до тех пор, пока иммунная система младенца не сможет синтезировать свои собственные защитные антитела.

Измерение концентраций IgG – это стандартный лабораторный тест [6]. Общий уровень IgG может зависеть от возраста пациентов, пола и места проживания [2]. Определение уровня антител необходимо для диагностики дефицита антител подкласса IgG, помощи в диагностике дефицита специфических антител, в качестве вспомогательного теста для диагностики общего варибельного иммунодефицита [7], а также для оценки степени риска у пациентов с низким уровнем IgA. Определение концентрации IgG также может помочь определить стратегию ревакцинации и/или скорректировать протокол лечения пациентов [8, 9]. В определенных обстоятельствах измерение IgG может использоваться для мониторинга гуморальной иммунной системы пациента [10]. IgG служит основным изотипом антител в крови и внеклеточной жидкости, в то время как IgA – основной изотип в секретах эпителия слизистой кишечника и дыхательных путей.

Неуклонно растет применение биопрепаратов в различных областях медицины. Рынок биопрепаратов составил 452.9 млрд долларов в 2023 г. и достигнет 823.4 млрд долларов к 2028 г. [11]. В настоящее время гуманизированные моноклональные антитела широко применяются при лечении заболеваний, большинство из которых еще несколько десятков лет назад считались неизлечимыми. Объем мирового рынка терапии антителами в 2023 г. составил 279.89 млрд долларов США, в 2024 г. – 313.47 млрд долларов США, и ожидается, что к 2034 г. он достигнет ~973.60 млрд долларов США [12]. Так же неуклонно растет и традиционное использование антител, например в иммуноферментном анализе [13, 14] и в иммуноблоттинге белков [15]. Иммуногистохимия и иммунофлуоресценция используют специфические антитела для обнаружения и маркировки белков в клетках и срезах тканей с последующей регистрацией эти антител с помощью световой или флуоресцентной микроскопии [16]. Все эти техно-

логии получили значительное развитие с появлением моноклональных антител, впервые описанных еще в 1975 г., которые могут быть произведены в практически неограниченном количестве. Молекулы IgG (моноклональные или поликлональные) служат основным агентом для всех ранее описанных технологий. Поэтому количественная оценка содержания антител очень важна как при диагностике заболеваний, так и для нужд биотехнологии. В настоящее время известно несколько различных способов количественного определения антител: сорбция антител на колонке с белком А [17], метод биослойной интерферометрии [18], микроагглютинационный анализ [19] и иммуноферментный анализ [20]. Хотя все эти методы эффективны по-своему, у каждого есть недостатки либо в подготовке образца, либо в требованиях к оборудованию, либо во времени, необходимом для обработки результатов, что делает их применение не самым простым. Многоступенчатые протоколы с большим числом этапов очистки ограничивают масштабируемость метода ELISA. Другие доступные методы либо не количественные, либо требуют специализированной аналитической лабораторной платформы.

Известны простые в исполнении гомогенные методы анализа, в основе которых лежит метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) [21]. Метод FRET в сочетании с методом временного разрешения флуоресценции (TRF) позволил разработать гомогенную (HTRF) технологию и FRET с технологией PINCER [22]. Эти методы экспериментально достаточно просты и представляют собой анализы по типу смешал/измерил (mix-and-read assays). В данных технологиях используют пары меченых антител, специфичных к IgG. Аналитический сигнал регистрируется при сближении реагентов, причем метод не требует каких-либо этапов промывки [21, 22]. Однако необходимость использования двух меченых конъюгатов вызывает дополнительные сложности.

Альтернативный метод гомогенного анализа – метод поляризации флуоресценции (FP), используемый для количественного обнаружения содержания белков, определения характера их взаимодействий, вычисления кинетических параметров и т.д. [23, 24]. Этот гомогенный метод позволяет быстро и эффективно определять изменение сигнала поляризации флуоресценции при связывании флуо-

ресцентно-меченного низкомолекулярного антигена с мишенью (белками, антителами или клетками). Весомым преимуществом FP-анализа служит возможность изучения взаимодействия мишень–лиганд в гомогенной среде, без разделения связанных и свободных форм реагентов, при этом необходима маркировка только лиганда, тогда как методы с применением FRET-технологии требуют маркировки как мишени, так и лиганда. Несмотря на то что FP имеет ряд преимуществ в исследовании взаимодействий лиганд–мишень, у него есть и недостатки, которые можно рассматривать как ограничения. Размер лиганда не может превышать 3–4 кДа, а флуоресцентная метка фармакофора, связанная с его функциональной группой, первичной аминной, карбоксильной или сульфидной группами, может влиять на способность лиганда связываться с рецептором [25].

Определение концентраций высокомолекулярных веществ методом FPIA имеет ряд трудностей. Прогресс в этой области связан с получением производных переменных доменов особых антител (НСАб), представляющих собой гомодимер укороченной тяжелой цепи белка при отсутствии легких цепей. Такие гомодимеры выявлены у представителей семейства Camelidae (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб [26]. НСАб отличаются отсутствием доменов СН1 и характеристическими гидрофильными аминокислотными заменами в переменном VHH-домене, что приводит к невозможности присоединения легких цепей (рис. 1). Благодаря успехам в определении кристаллической структуры VHH-домена этих антител и демонстрации возможности идентификации, отбора и экспрессии домена VHH в гетерологичной системе [27–29] нанотела (Nbs), оказавшиеся адаптированной рекомбинантной версией VHH-домена, не только широко используются в различных областях исследований, но и очень актуальны во многих терапевтических и диагностических приложениях [30, 31].

Ввиду своего небольшого размера Nb также могут быть помечены флуоресцентной меткой и использованы в качестве распознающих реагентов в неконкурентном FP-анализе. Изучение использования нанотел в FP-анализе показало, что такие форматы анализа могут успешно применяться для диагностики заболеваний и обнаружения белков [23, 30].

Рекомбинантные VHH-нанотела мономерны и имеют небольшой размер (12–20 кДа в зависимости от добавленных аминокислотных последовательностей, доменов, тагов, линкеров). В комплексе с антигенными белками эти фрагменты антител демонстрируют K_d в нано- и пиколярном диапазоне, сравнимые с соответствующими моноклональными антителами. Таким образом, небольшой размер нанотел не оказывает отрицательного влияния на их аффинность [23, 31, 32]. Nbs демонстрируют высокую стабильность при воздействии высоких температур в течение длительного времени и способны повторно сворачиваться после денатурации [33, 34]. Еще одним преимуществом Nbs служит то, что их легче производить, и они дешевле, чем стандартные моноклональные антитела, и, наконец, они хорошо экспрессируются в бактериальных системах [34]. Уникальная особенность нанотел – наличие паратопов, способных связываться с такими частями антигенных белков, которые часто недоступны для традиционных моноклональных антител [35, 36] (рис. 1). Благодаря уникальным характеристикам и преимуществам по сравнению с обычными моноклональными антителами, ведется множество исследований и разработок по применению Nbs в диагностике рака [26] и инфекционных болезней [26, 37], молекулярной визуализации, терапии болезней [38], для быстрой и масштабируемой очистки белковых комплексов [39]. Все эти характеристики в совокупности делают VHH идеальными кандидатами для определения концентраций различных антигенов с высокой чувствительностью и специфичностью.

В данной работе предпринята попытка оценить возможность специфичного и чувствительного определения концентраций IgG и IgA с использованием рекомбинантных однодоменных миниатюрных нанотел верблюда методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA) в физиологических жидкостях организма человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение рекомбинантных нанотел верблюда в иммуноанализе открывает возможности высокоспецифичного определения концентрации белков в физиологических жидкостях человека. Ранее были получены нанотела против IgG и IgA человека [40, 41]. Скрининг этих антител вызывает инте-

рес при диагностике заболеваний, планировании вакцинации и лечении болезней. В данной работе мы получили очищенные и охарактеризованные FITC-меченные конъюгаты Nbs к IgG (FITC-anti-IgG) и IgA (FITC-anti-IgA).

Ранее полученные нанотела (Е6, или anti-IgG, и Е7, или anti-IgA) в уже традиционном адаптированном формате (VNH-линкер-НА-таг-His-таг) были наработаны в периплазме бактерий, аффинно очищены с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе, сконцентрированы, переведены в стандартный 50 мМ фосфатный буфер, содержащий 0.14 М NaCl pH 7.4 (PBS), и проверены с помощью электрофореза в 14%-ном SDS-ПААГ, как описано ранее [40, 41]. На рис. 2 можно видеть, что нанотела выделены в высокоочищенном виде.

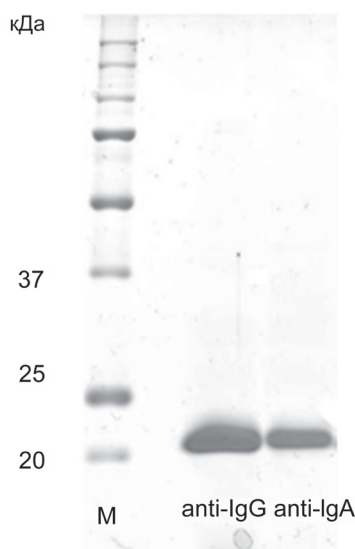


Рис. 2. Фракционирование в 14%-ном SDS-ПААГ выделенных адаптированных однодоменных антител (VNH-линкер-НА-таг-His-таг), узнающих IgG или IgA. М – белковый маркер (Bio-Rad, 161-0374).

Получение флуоресцентно-меченных нанотел (FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA) описано ниже. Соотношение белок/флуоресцеин anti-IgG(IgA)/FITC определяли спектрофотометрически в PBS (pH 7.4) по уравнению (1):

$$Nb_{/FITC} = \frac{A_{492} \epsilon_{Nb}}{(A_{280} - CA_{492}) \epsilon_{FITC}}, \quad (1)$$

где A_{492} – оптическая плотность раствора FITC-anti-IgG(anti-IgA) при длине волны 492 нм максимального поглощения FITC; A_{280} – оптическая плот-

ность Nbs при длине волны максимального поглощения белка (280 нм), ϵ_{Nb} – молярный коэффициент экстинкции нанотел anti-IgG и anti-IgA при длине волны 280 нм; ϵ_{FITC} – молярный коэффициент экстинкции FITC при длине волны максимума поглощения; C – коррекционный коэффициент для флуоресцеина при длине волны 280 нм ($c = 0.35$).

Соотношение anti-IgG (anti-IgA)/FITC составляло $\sim 1 : 1$, оно оказалось оптимальным, поскольку дальнейшее увеличение соотношения белок/краситель не приводило к увеличению флуоресцентного сигнала.

Для разработки эффективных диагностических систем необходимо, чтобы между мишенью и распознающим элементом осуществлялось высокоаффинное взаимодействие [37]. Важной характеристикой служит K_d флуоресцентно-меченного нанотела с целевым белком, в данном случае антитела человека IgG и IgA. Гомогенный метод FRIA позволяет вычислить K_d в системе антиген/антитело в растворе, и полученные значения могут существенно отличаться от K_d , полученных в гетерогенной системе.

Для разработки FRIA-метода определения концентраций антител человека IgG и IgA были подобраны минимальные концентрации FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA, которые позволяют детектировать оптимальный сигнал интенсивности флуоресценции и стабильное значение FP. Оптимальное соотношение сигнал/шум для FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA определяли при превышении фонового сигнала в 10–20 раз. При этом концентрации флуоресцентно-меченных нанотел находилась в интервале 2.5–5 нМ [37]. Для флуоресцентно-меченных антител FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA сигнал FP составлял 155 ± 1 и 165 ± 1 (mP) соответственно. При добавлении IgG и IgA к рабочим растворам FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA до конечных концентраций 15 мкг/мл величины сигналов FP увеличивались, что свидетельствовало об образовании комплексов IgG*FITC-anti-IgG и IgA*FITC-anti-IgA. При перекрестном смешивании раствора FITC-anti-IgG с антителом IgA и раствора FITC-anti-IgA с раствором антитела IgG увеличения FP не наблюдалось, что свидетельствует о специфичности нанотел anti-IgG и anti-IgA к IgG и IgA

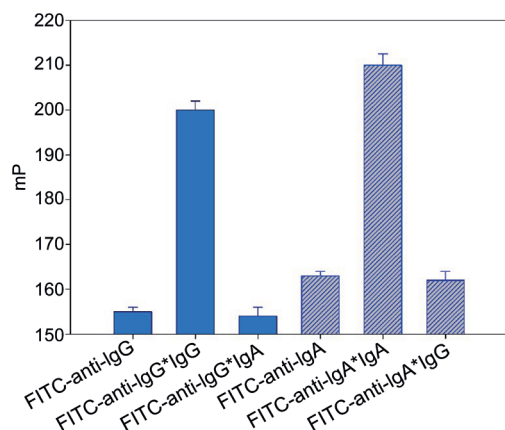


Рис. 3. Изменение сигнала поляризации флуоресценции при связывании конъюгатов FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA 2.0 нМ с IgG и IgA человека. Конечные концентрации IgG и IgA – 80 мкг/мл, PBS; 25°C.

соответственно (рис. 3). Время установления равновесия при взаимодействии соответствующих флуоресцентно-меченных нанотел с IgG и IgA составило всего 2 мин. Величины FP были стабильны в течение часа. Кроме того, мы изучили взаимодействие FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с другими белками человека, как входящими в состав матрицы физиологических жидкостей, так и с белками, которые часто используются для приготовления буферных растворов и которые потенциально могут влиять на значение сигнала FP и на точность анализа. Мы исследовали специфичность связывания нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с лактоферрином человека (HLF), сывороточным альбумином быка (BSA) и человека (HSA), лизоцимом человека (HLYZ), фибриногеном и плазминогеном человека в неконкурентном FPIA. К растворам нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с концентрацией 2.0 нМ добавляли вышеперечисленные белки с концентрацией 1 мг/мл в PBS и измеряли сигнал поляризации флуоресценции через 5–10 мин инкубации. При этом изменения сигнала FP практически не наблюдалось (данные не представлены) [42], что свидетельствует о высокой аффинности используемых нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA к IgG и IgA соответственно.

На рис. 4 представлены результаты изменения сигнала FP при связывании FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с IgG и IgA соответственно в различных концентрациях. С увеличением концентрации IgG и IgA величины FP-сигналов при взаимодействии с рабочими растворами FITC-anti-IgG и FITC-anti-

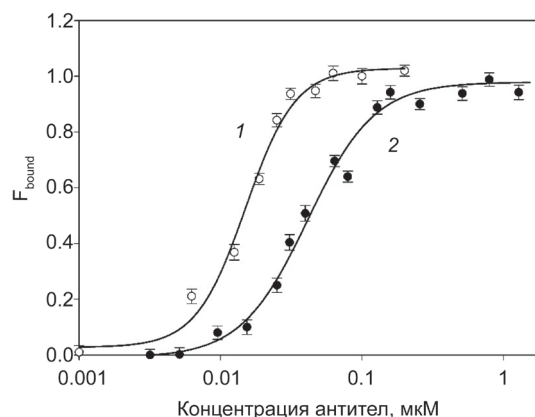
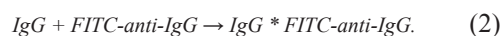


Рис. 4. Изменение связанной доли (F_{bound}) флуоресцентно-меченных конъюгатов FITC-anti-IgG (кривая 1, 2 нМ) и FITC-anti-IgA (кривая 2, 2 нМ) от концентраций IgG и IgA человека. PBS; 25°C.

IgA увеличиваются. Как видно из представленного рисунка, изменение поляризации флуоресценции (ΔmP) составило ~40 ед., данная величина была получена благодаря применению миниатюрных рекомбинантных нанотел, имеющих небольшие молекулярные массы ~20 кДа. K_d комплексов IgG*FITC-anti-IgG и IgA*FITC-anti-IgA оценивали, как описано в работе [37].

Известно, что количество связанной фракции напрямую зависит от сигнала поляризации флуоресценции. Уравнение взаимодействия антител с флуоресцентно-меченным нанотелом (2) выглядит следующим образом:



Долю связанного IgG в комплексе с флуоресцентным конъюгатом оценивали по формуле (3):

$$F_{\text{bound}} = \frac{[\text{IgG} * \text{FITC-anti-IgG}]}{[\text{FITC-anti-IgG}]_T} = \frac{mP - mP_{\text{free}}}{(mP_{\text{bound}} - Q mP) + (mP - mP_{\text{free}})}, \quad (3)$$

где mP – измеряемый сигнал FP, mP_{free} – поляризация свободного нанотела FITC-anti-IgG, mP_{bound} – поляризация нанотела при полном связывании с целевыми антителами.

По графику зависимости F_{bound} от концентрации антител вычисляли величины K_d по уравнению (4) (SigmaPlot 11, SysStart, США):

$$F_{\text{bound}} = \frac{[\text{IgG} * \text{FITC-anti-IgG}]}{[\text{FITC-anti-IgG}]_T} = \frac{a - \sqrt{a^2 - 4[\text{IgG}]_T[\text{FITC-anti-IgG}]_T}}{2[\text{FITC-anti-IgG}]_T}, \quad (4)$$

где $a = K_d + [\text{IgG}]_T + [\text{FITC-anti-IgG}]_T$. Для FITC-anti-IgA и FITC-anti-IgG величины K_d составили 15.0 ± 1.0 и 41.3 ± 2.9 нМ. Антитела FITC-anti-IgA и FITC-

anti-IgG имеют достаточно низкие K_d , что свидетельствует о высокоаффинном связывании с соответствующими антителами.

Далее была изучена возможность определения антител человека по изменению сигнала FP (ΔmP) при взаимодействии FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с антисыворотками человека и животных. На рис. 5 представлены результаты эксперимента, из которых видно, что флуоресцентно-меченные нанотела одинаково эффективно связываются с антисыворотками человека и обезьяны, что, вероятно, обусловлено близостью строения этих антител. Однако данные конъюгаты не показали существенного изменения сигнала FP при связывании с сыворотками быка, собаки, кошки, кролика и овцы. Эти результаты свидетельствуют о высокой специфичности связывания полученных конъюгатов с антителами человека.

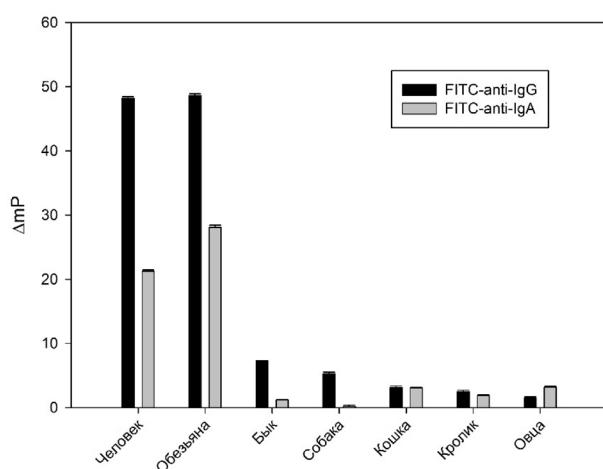


Рис. 5. Изменение сигнала FP при связывании FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA (2.0 нМ) с сыворотками крови животных и человека.

Для установления возможности определения содержания антител человека в его сыворотке первоначально были построены калибровочные кривые зависимости концентрации антител от изменения сигнала FP (рис. 6). Области определения антител составили 35–120 мкг/мл для IgA и 75–260 мкг/мл для IgG.

Первоначально анализ антител был апробирован методом “введено/найденно” в буферной системе. Были приготовлены два образца в PBS с известными концентрациями IgG и IgA при их раз-

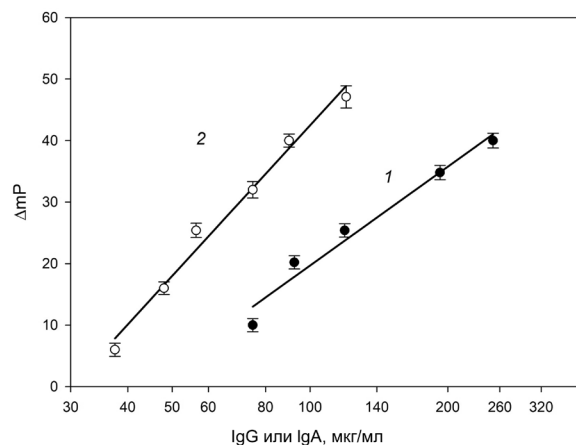


Рис. 6. Линейные диапазоны калибровочных зависимостей для определения концентраций IgG (кривая 1) и IgA (кривая 2) методом FPIA; PBS; 25°.

личном соотношении. В этих образцах были определены концентрации IgG и IgA с использованием нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA соответственно. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, процент открытия IgG и IgA составляет 93–105%, что свидетельствует о возможности определения двух антител в реальных образцах.

Метод был апробирован на сыворотках здоровых доноров. Если результаты анализа выходили за пределы калибровочной зависимости, образцы подвергали дополнительному разведению. В табл. 2 представлены результаты определения антител в этих сыворотках методом FPIA.

В тех же образцах было определено содержание IgG и IgA методом иммуноферментного анализа коммерческими наборами IgG-ELISA и IgA-ELISA (ХЕМА, Россия). Эксперименты проводили по рекомендациям производителя, образцы сыворотки предварительно разбавляли в 5000 раз буфером из набора. Калибровочные кривые для определения IgG и IgA методом ELISA представлены на рис. 7. Вычисленные по этим зависимостям концентрации IgG и IgA в сыворотках здоровых доноров приведены в табл. 2.

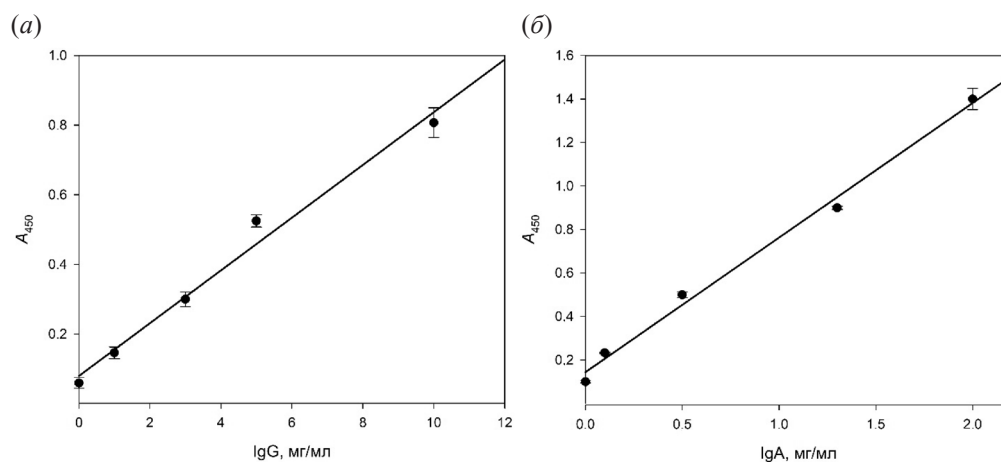
Сравнение результатов определения антител IgG и IgA методами FPIA и ELISA представлены на рис. 8. Как видно из приведенных данных, результаты определения антител методом FPIA и ELISA хорошо коррелируют между собой.

Таблица 1. Результаты определения концентраций IgG и IgA методом “введено/найдено” FPIA

Образец	Введено, мг/мл		Найдено, мг/мл	Открытие, %
1	IgG	8.0	8.2 ± 0.1	102
	IgA	2.0	2.1 ± 0.2	105
2	IgG	9.0	9.3 ± 0.1	103
	IgA	1.5	1.4 ± 0.1	93

Таблица 2. Сравнение данных определения концентраций IgG и IgA в сыворотках крови человека методами FPIA и ELISA ($n = 2$)

Образец	IgA, мг/мл		IgG, мг/мл	
	ELISA	FPIA	ELISA	FPIA
1	1.83 ± 0.04	1.9 ± 0.1	10.4 ± 0.1	11.0 ± 0.5
2	2.12 ± 0.01	2.0 ± 0.2	11.2 ± 0.3	11.8 ± 0.3
3	1.31 ± 0.03	1.5 ± 0.1	13.0 ± 0.1	13.7 ± 0.2
4	1.69 ± 0.05	1.8 ± 0.3	11.2 ± 0.3	10.2 ± 0.5
5	1.29 ± 0.06	1.6 ± 0.1	12.5 ± 0.1	11.2 ± 0.6
6	1.42 ± 0.03	1.3 ± 0.2	14.9 ± 0.2	16.0 ± 0.4
7	1.64 ± 0.05	1.7 ± 0.1	13.4 ± 0.4	13.0 ± 0.3
8	0.91 ± 0.03	1.1 ± 0.1	10.6 ± 0.2	11.1 ± 0.2
9	1.51 ± 0.02	1.6 ± 0.1	11.3 ± 0.7	10.3 ± 0.6
10	2.31 ± 0.01	2.5 ± 0.2	12.8 ± 0.7	13.2 ± 0.3
11	2.14 ± 0.05	2.0 ± 0.3	13.1 ± 0.1	12.9 ± 0.2
12	1.65 ± 0.04	1.8 ± 0.2	11.5 ± 0.3	10.5 ± 0.4
13	1.78 ± 0.08	1.5 ± 0.1	13.5 ± 0.3	15.3 ± 0.2
14	0.93 ± 0.04	1.2 ± 0.1	12.3 ± 0.8	13.0 ± 0.6
15	1.41 ± 0.04	1.3 ± 0.2	11.2 ± 0.1	12.2 ± 0.4
16	1.93 ± 0.10	1.9 ± 0.3	12.0 ± 0.5	12.8 ± 0.5
17	1.75 ± 0.09	1.8 ± 0.3	11.8 ± 0.6	10.8 ± 0.3
18	1.95 ± 0.08	2.0 ± 0.1	10.1 ± 0.3	12.1 ± 0.4

**Рис. 7.** Калибровочные кривые определения концентраций IgG (а) и IgA (б) методом ELISA, $n = 2$; (а): $y = (0.08 \pm 0.03) + (0.08 \pm 0.01)x$, $R^2 = 0.98$; (б): $y = (0.14 \pm 0.03) + (0.62 \pm 0.03)x$, $R^2 = 0.99$.

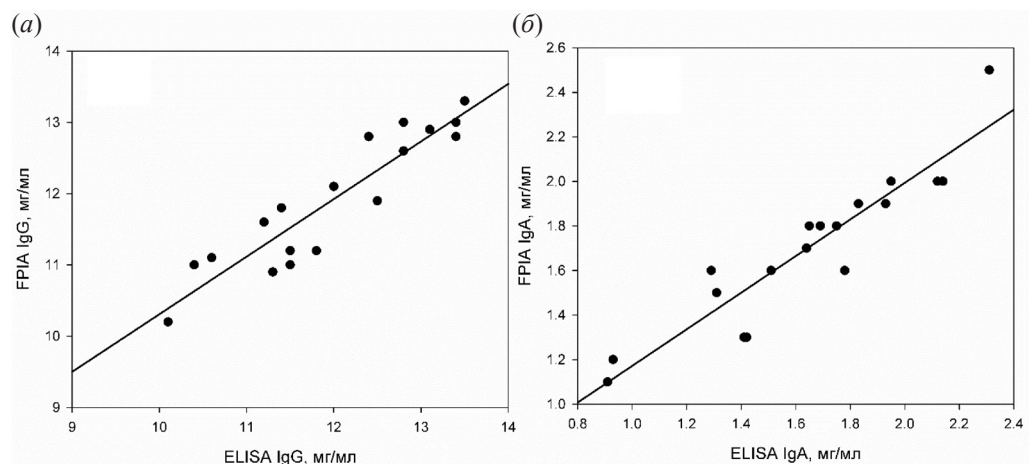


Рис. 8. Сравнение определения концентраций IgG и IgA в сыворотке здоровых доноров методами FPIA и ELISA; (а): $y = 2.23 + 0.81x$, $R^2 = 0.85$; (б): $y = 0.35 + 0.82x$, $R^2 = 0.84$.

Таким образом, в данной работе была изучена аффинность меченых антител FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA в отношении IgG и IgA в растворе и показана возможность их применения для прямого обнаружения антител в сыворотке крови человека методом FPIA.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат, изомер 1, Sigma, США), клоны-продуценты нанотел верблюда против антител человека IgG и IgA anti-IgG (20.1 кДа) и anti-IgA (20.0 кДа) соответственно (предоставлены соавтором статьи Тиллибом С.В.), лактоферрин человека (HLF), холо- и аро-трансферрины человека, hTF и aTF, бычий сывороточный альбумин (BSA), сывороточный альбумин человека (HSA), лизоцим человека (HLYZ) (Sigma-Aldrich, США). Сыворотки быка, примата, собаки, кошки и кролика предоставлены НВО “Иммунотех” (Москва, Россия). Сыворотки 18 здоровых мужчин-добровольцев 18–30 лет получены из Гематологического научного центра, станции переливания крови (Москва, Россия).

Получение и характеристика флуоресцентно-меченных нанотел против IgG (anti-IgG) и IgA (anti-IgA). Ранее полученные нанотела (Е6, или anti-IgG, и Е7, или anti-IgA) в адаптированном формате (VНН-линкерНА-таг-His-таг) были наработаны в периплазме бактерий, аффинно очищены с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе, как описано ранее [40, 41]. Полученные нанотела anti-IgG (10 мг/мл) и anti-IgA (8.5 мг/мл) в имидазольном буфере первоначально

были переведены в PBS на фильтрах фирмы Amicon® Ultra 0.5 мл (3 кДа) с низкой сорбцией белка. Затем получали их конъюгаты с FITC, как описано в работе [23], с некоторыми модификациями. К 100 мкл нанотел с концентрацией 1 мг/мл (50 мкМ) anti-IgG и anti-IgA в PBS добавляли 10 мкл FITC в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9) до конечной концентрации 250 мкМ и выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Избыток не вступившего в реакцию FITC удаляли ультрафильтрацией реакционных смесей на центрифуге (9000 g, 10 мин) через фильтры фирмы Amicon®Ultra 0.5 мл с низкой сорбцией белка и фильтром 3 кДа, процедуру выполняли несколько раз до уменьшения оптической плотности раствора при λ_{492} до фоновых значений. Полученные конъюгаты FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA характеризовали по содержанию белка и по степени модификации аминокрупп спектрофотометрически [23]. Концентрации антител определяли с использованием расчетных коэффициентов экстинкции $\epsilon_{280} = 27\,790\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ и $27\,220\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ для anti-IgG и anti-IgA соответственно. Молярный коэффициент экстинкции FITC $\epsilon_{495} = 73\,000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Соотношение белок/флуоресцеин anti-IgG(IgA)/FITC определяли по спектрам поглощения флуоресцентно-меченных антител в PBS по уравнению (1).

Нанотела с флуоресцентной меткой, FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA, были получены нами в трех независимых экспериментах, вариация сигнала FP для этих конъюгатов не превышала 10%.

Неконкурентный FPIA выполняли на портативном флуориметре Sentry-200 (Ellie, США, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 495/530$ нм), как описано в работе [23]. Готовили растворы флуоресцентно-меченных нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA в PBS так, чтобы интенсивность флуоресценции растворов не превышала 200 000 ед. В пробирку из боросиликатного стекла (10×75 мм) помещали 960 мкл рабочего раствора флуоресцентно-меченных нанотел, добавляли 40 мкл стандартного раствора IgG или IgA различных концентраций (0–10 мг/мл) и определяли изменение сигнала FP (mP) и интенсивность исследуемого раствора после 30 мин инкубации при комнатной температуре. По полученным зависимостям вычисляли K_d комплексов FITC-anti-IgG*IgG и FITC-anti-IgA*IgA.

Специфичность конъюгатов FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA. Перекрестные реакции FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с другими белками определяли по изменению значения FP при добавлении к 960 мкл 2.5 нМ раствору флуоресцентно-меченных нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA 40 мкл стандартных BSA, HSA, aTF и hTf, HLF, лизоцима человека HLYS, плазминогена и фибриногена человека. Концентрации стандартных растворов реагентов составляли 1 мг/мл. Каждый эксперимент выполняли в двух повторях и трех аппаратных измерениях.

Тестирование нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA с сыворотками различных животных и человека. К 1 мл растворов нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA добавляли по 2 мкл тестируемых сывороток человека, быка, обезьяны, собаки, кошки и кролика. Растворы инкубировали 10 мин и измеряли сигнал поляризации флуоресценции. Каждый эксперимент выполняли в двух повторях и трех аппаратных измерениях.

Определение концентраций IgG и IgA в сыворотке здоровых доноров методом FPIA. Уровни антител IgG и IgA определяли в 18 образцах сыворотки здоровых доноров, как описано выше. К 960 мкл растворов флуоресцентно-меченных нанотел FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA в PBS с концентрацией 2.5 нМ добавляли 40 мкл предварительно разбавленных образцов, для определения IgG плазму предварительно разбавляли в 70 раз, а для IgA – в 30 раз.

Иммуноферментный метод определения (ELISA) IgG и IgA человека проводили с использованием набора IgG-ELISA и IgA-ELISA (XEMA, Россия) согласно инструкции производителя. Поглощение измеряли при длине волны 450 нм, используя микропланшетный фотометр Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили в трех повторях и трех аппаратных измерениях. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Sigma plot 11 (Systat Software Inc., США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение флуоресцентно-меченных нанотел в поляризационном флуоресцентном иммуноанализе значительно расширило его применение, позволив количественно определять высокомолекулярные антигены. В данной работе получены и охарактеризованы флуоресцентно-меченные конъюгаты нанотел, FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA, к IgG и IgA человека. Вычисленные K_d комплексов FITC-anti-IgG*IgG и FITC-anti-IgA*IgA составили 15.0 ± 1.0 и 41.3 ± 2.9 нМ, что свидетельствует о высокоаффинном взаимодействии иммунореагентов. Показано, что конъюгаты FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA не взаимодействуют с другими белками человека: альбумином, плазминогеном, фибриногеном, лактоферрином и трансферрином, что свидетельствует о высокой специфичности полученных нанотел к целевым антителам IgG и IgA. FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA демонстрируют связывание с антисыворотками человека и обезьяны, но не с сыворотками животных: быка, собаки, кошки, кролика и овцы. Подобран формат FPIA и оптимизирован анализ двух видов иммуноглобулинов человека – IgG и IgA. Показана возможность количественного определения содержания IgG и IgA в образцах сывороток крови человека с использованием конъюгатов FITC-anti-IgG и FITC-anti-IgA. Результаты тестирования сывороток человека подтверждены коммерческими наборами для иммуноферментного анализа. Таким образом, метод FPIA может быть использован для определения IgG и IgA человека.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – САЕ, СВТ, ЛИМ; проведение экспериментов – ОСГ, ИВМ, ТИИ, ЛИМ; написание статьи – ЛИМ; редактирование текста статьи – САЕ, СВТ, анализ данных – САЕ, СВТ, ЛИМ; администрирование проекта – САЕ, СВТ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parker A.R., Skold M., Ramsden D.B., Ocejjo-Vinyals J.G., López-Hoyos M., Harding S. // *Lab. Med.* 2017. V. 48. P. 314–325.
<https://doi.org/10.1093/labmed/lmx058>
2. Bayram R.O. // *Turk. J. Med. Sci.* 2019. V. 49. P. 497–505.
<https://doi.org/10.3906/sag-1807-282>
3. Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Zago C.A., Carneiro-Sampaio M. // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. V. 2012. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2012/985646>
4. Breedveld A., Van Egmond M. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 553.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>
5. Vo Ngoc D.T.L., Krist L., Van Overveld F.J., Rijkers G.T. // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2017. V. 13. P. 371–382.
<https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1248410>
6. Zhang H., Li P., Wu D., Xu D., Hou Y., Wang Q., Li M., Li Y., Zeng X., Zhang F., Shi Q. // *Medicine (Baltimore)*. 2015. V. 94. P. e387.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000387>
7. Bonilla F.A., Khan D.A., Ballas Z.K., Chinen J., Frank M.M., Hsu J.T., Keller M., Kobrynski L.J., Komarow H.D., Mazer B., Nelson R.P., Orange J.S., Routes J.M., Shearer W.T., Sorensen R.U., Verbsky J.W., Bernstein D.I., Blessing-Moore J., Lang D., Nicklas R.A., Oppenheimer J., Portnoy J.M., Randolph C.R., Schuller D., Spector S.L., Tilles S., Wallace D. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. V. 136. P. 1186–1205.e1–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.049>
8. Pardo I., Maezato A.M., Callado G.Y., Gutfreund M.C., Hsieh M.K., Lin V., Kobayashi T., Salinas J.L., Subramanian A., Edmond M.B., Diekema D.J., Rizzo L.V., Marra A.R. // *Antimicrob. Steward. Healthc. Epidemiol.* 2024. V. 4. P. e152.
<https://doi.org/10.1017/ash.2024.369>
9. Katoh S., Yasuda I., Kitakawa K., Hamaguchi S., Sando E. // *Trop. Med. Health.* 2024. V. 52. P. 65.
<https://doi.org/10.1186/s41182-024-00635-y>
10. Turunen H., Vuorio K.A., Leinikki P.O. // *Scand. J. Infect. Dis.* 1983. V. 15. P. 307–311.
<https://doi.org/10.3109/inf.1983.15.issue-3.12>
11. *Biologic Therapeutic Drugs: Technologies and Global Market Report 2024, with Company Profiles of Amgen, Abbvie, Eli Lilly, Novartis and Glaxosmithkline – ResearchAndMarkets.com* (n.d.).
<https://www.businesswire.com/news/home/202402-12693629/en>
12. *Antibody Therapy Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034* (n.d.).
<https://www.precedenceresearch.com/antibody-therapy-market>
13. Nandapalan N., Routledge E., Toms G.L. // *J. Med. Virol.* 1984. V. 14. P. 285–294.
<https://doi.org/10.1002/jmv.1890140313>
14. Janwan P., Sadaow L., Rodpai R., Yamasaki H., Luvira V., Sukeepaisarnjaroen W., Kitkhuandee A., Paonariang K., Sanpool O., Boonroumkaew P., Thanchomnang T., Mita T., Intapan P.M., Maleewong W. // *PeerJ*. 2022. V. 10. P. e14085.
<https://doi.org/10.7717/peerj.14085>
15. Reymond D., Karmali M.A., Clarke I., Winkler M., Petric M. // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 609–613.
<https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.609-613.1997>
16. Katikireddy K.R., O'Sullivan F. // In: *Gene Expression Profiling* / Ed. O'Driscoll L. Humana Press, Totowa, NJ. 2011. P. 155–167.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-289-2_11
17. Tereshin M.N., Melikhova T.D., Eletskaia B.Z., Ivanova E.A., Onoprienko L.V., Makarov D.A., Razumikhin M.V., Myagkikh I.V., Fabrichniy I.P., Stepanenko V.N. // *Biomolecules*. 2024. V. 14. P. 849.
<https://doi.org/10.3390/biom14070849>
18. Frenzel D., Willbold D. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e106882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106882>
19. Park S.-H., Lee Y.-H., Chu H., Hwang S.-D., Hwang K.-J., Choi H.-Y., Park M.-Y. // *Osong Public Health Res. Perspect.* 2012. V. 3. P. 19–23.
<https://doi.org/10.1016/j.phrp.2012.01.003>

20. Zarletti G., Tiberi M., De Molfetta V., Bossù M., Toppi E., Bossù P., Scapigliati G. // *Viruses*. 2020. V. 12. P. 1274.
<https://doi.org/10.3390/v12111274>
21. Yue H., Nowak R.P., Overwijn D., Payne N.C., Fischinger S., Atyeo C., Lam E.C., St. Denis K., Brais L.K., Konishi Y., Sklavenitis-Pistofidis R., Baden L.R., Nilles E.J., Karlson E.W., Yu X.G., Li J.Z., Woolley A.E., Ghobrial I.M., Meyerhardt J.A., Balazs A.B., Alter G., Mazitschek R., Fischer E.S. // *Cell Rep. Methods*. 2023. V. 3. P. 100421.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100421>
22. Tian L., Wang R.E., Chang Y.-H. // *Antivir. Ther.* 2012. V. 17. P. 1437–1442.
<https://doi.org/10.3851/IMP2469>
23. Mukhametova L.I., Eremin S.A., Arutyunyan D.A., Goryainova O.S., Ivanova T.I., Tillib S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. V. 87. P. 1679–1688.
<https://doi.org/10.1134/S0006297922120227>
24. Yu L., Zhong M., Wei Y. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 7044–7048.
<https://doi.org/10.1021/ac100543e>
25. Mukhametova L.I., Eremin S.A. // *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. 2024. V. 16. P. 4.
<https://doi.org/10.31083/j.fbe1601004>
26. Jin B., Odongo S., Radwanska M., Magez S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 5994.
<https://doi.org/10.3390/ijms24065994>
27. Desmyter A., Transue T.R., Ghahroudi M.A., Dao Thi M.-H., Poortmans F., Hamers R., Muyldermans S., Wyns L. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1996. V. 3. P. 803–811.
<https://doi.org/10.1038/nsb0996-803>
28. Spinelli S., Frenken L., Bourgeois D., Ron L.D., Bos W., Verrips T., Anguille C., Cambillau C., Tegoni M. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1996. V. 3. P. 752–757.
<https://doi.org/10.1038/nsb0996-752>
29. Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 521–526.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01062-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01062-4)
30. Nishiyama K., Fukuyama M., Maeki M., Ishida A., Tani H., Hibara A., Tokeshi M. // *Sens. Actuators B Chem.* 2021. V. 326. P. 128982.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128982>
31. Muyldermans S. // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. V. 82. P. 775–797.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
32. Sockolosky J.T., Dougan M., Ingram J.R., Ho C.C.M., Kauke M.J., Almo S.C., Ploegh H.L., Garcia K.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. E2646–E2654.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>
33. Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L.G.J., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A. // *Protein Sci.* 2002. V. 11. P. 500–515.
<https://doi.org/10.1110/ps.34602>
34. Xu L., Song X., Jia L. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2017. V. 64. P. 895–901.
<https://doi.org/10.1002/bab.1544>
35. Khodabakhsh F., Behdani M., Rami A., Kazemi-Lomedasht F. // *Int. Rev. Immunol.* 2018. V. 37. P. 316–322.
<https://doi.org/10.1080/08830185.2018.1526932>
36. Jovčevska I., Muyldermans S. // *BioDrugs*. 2020. V. 34. P. 11–26.
<https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>
37. Mei Y., Chen Y., Sivaccumar J.P., An Z., Xia N., Luo W. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 963978.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.963978>
38. Bao G., Tang M., Zhao J., Zhu X. // *EJNMMI Res.* 2021. V. 11. P. 6.
<https://doi.org/10.1186/s13550-021-00750-5>
39. Stevens T.A., Tomaleri G.P., Hazu M., Wei S., Nguyen V.N., DeKalb C., Voorhees R.M., Pleiner T. // *Nat. Protoc.* 2024. V. 19. P. 127–158.
<https://doi.org/10.1038/s41596-023-00904-w>
40. Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Руговская М.В., Тиллиб С.В. // *Мол. биология*. 2017. Т. 51. С. 985–996.
<https://doi.org/10.7868/S0026898417060106>
41. Тиллиб С.В., Горяйнова О.С., Сачко А.М., Иванова Т.И., Гаас М.Я., Воробьев Н.В., Каприн А.Д., Шегай П.В. // *Мол. биология*. 2022. Т. 56. С. 671–684.
<https://doi.org/10.31857/S0026898422040127>
42. Мухаметова Л.И., Еремин С.А., Арутюнян Д.А., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. // *Биохимия*. 2022. Т. 87. С. 2065–2077.
<https://doi.org/10.31857/S0320972522120211>

Determination of IgG and IgA Antibodies by Fluorescence Polarization Using Fluorescently Labeled Recombinant Nanobodies

L. I. Mukhametova^{*, #}, S. A. Eremin^{*}, I. V. Mikhura^{**}, O. S. Goryainova^{***},
T. I. Ivanova^{***}, and S. V. Tillib^{***, #}

[#] E-mail: liliya106@mail.ru; tillib@genebiology.ru

^{*} Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

^{**} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{***} Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119334 Russia

Quantitative, rapid and high-throughput analysis of IgG and IgA immunoglobulins is necessary to determine the content of these proteins and their associated molecules in the patient's physiological fluids. The analysis of these proteins is necessary in the diagnosis of specific antibody deficiency as an auxiliary test for the detection of general variable immunodeficiency, as well as for risk stratification of patients with low IgA levels. IgG content determination can help in prescribing revaccination to patients and supporting their treatment strategy, can be used to monitor the patient's humoral immune system, as well as in the development and subsequent production of most therapeutic antibodies in biopharmaceuticals. Miniature recombinant single-domain antibodies (nanobodies) have a number of advantages over classical antibodies, such as their relative simplicity of operation, high stability over a wide range of temperature and pH values, the ability to recognize highly specific conformational epitopes of the target protein, as well as the possibility of using them as probes for detecting larger target antigen proteins in the fluorescence polarization method. Fluorescently labeled FITC-anti-IgG and FITC-anti-IgA nanobodies to human IgG and IgA were obtained and characterized. The K_d values of the FITC-anti-IgG*IgG and FITC-anti-IgA*IgA complexes were determined, they confirmed the high affinity of the immunoreagents. The possibility of specifically determining IgG and IgA levels in human serum in the range of 35–120 $\mu\text{g/mL}$ (for IgA) and 75–260 $\mu\text{g/mL}$ (for IgG) was demonstrated. Eighteen human sera were tested for IgG and IgA levels, and the content of antibodies in the samples was confirmed using commercial enzyme immunoassay kits. FITC-anti-IgG and FITC-anti-IgA did not interact with other human proteins: albumin, plasminogen, fibrinogen, lactoferrin, and transferrin. Testing of human and animal sera by FITC-anti-IgG and FITC-anti-IgA demonstrated specific binding to human and monkey antisera, but not to animal sera: bovine, canine, feline, rabbit, and sheep. Thus, the FPIA method can be used for the rapid and specific determination of human IgG and IgA.

Keywords: single-domain antibody, nanobody, polarizing fluorescent immunoassay, immunoglobulins of classes G and A