

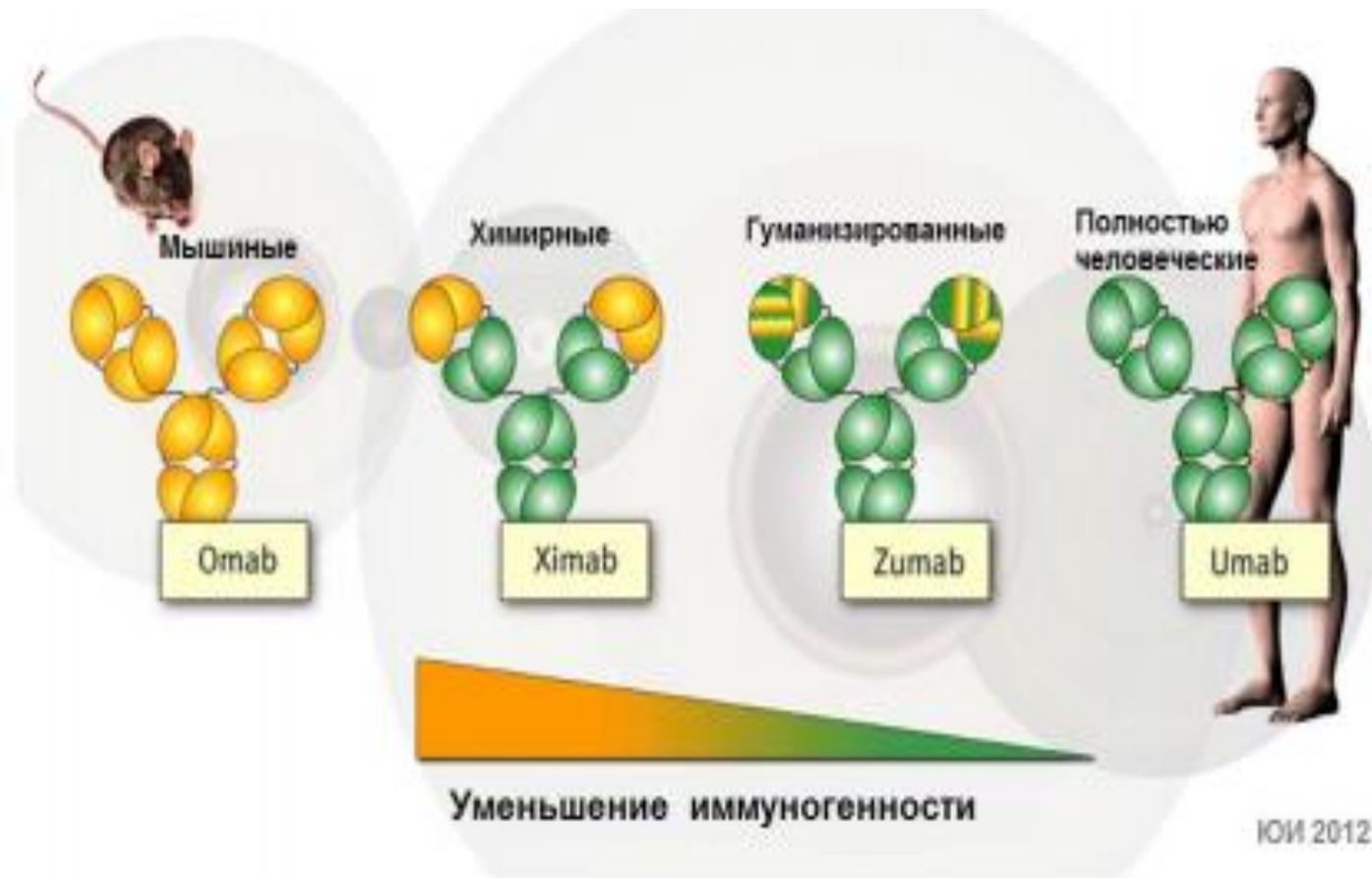


**ГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

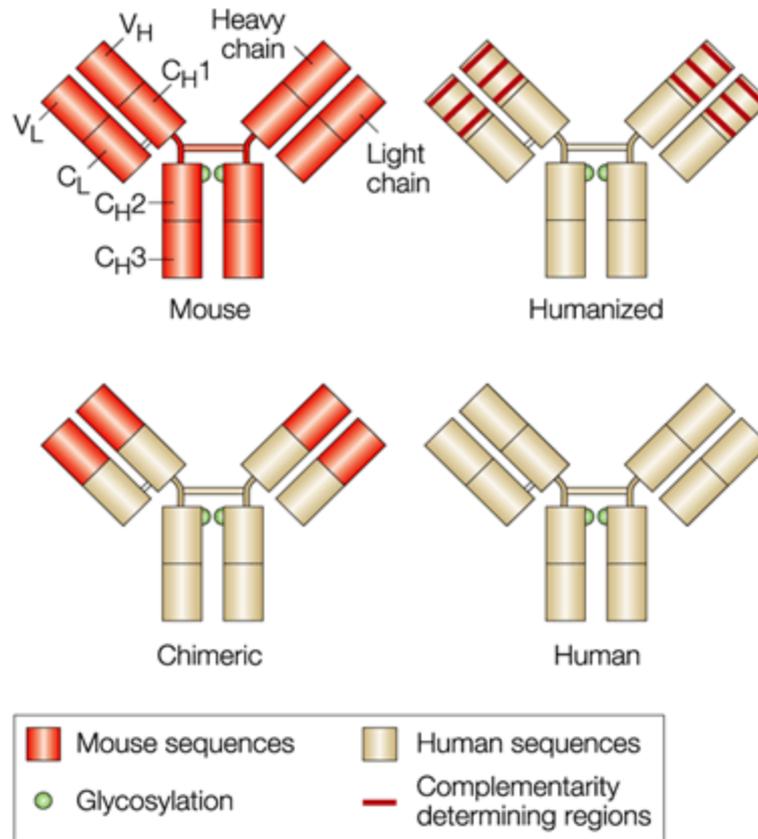
***Практические аспекты получения
человеческих МКА и их применение для
диагностики и лечения***

Доцент кафедры молекулярной биологии и генетики к.м.н. Замарина Т.В.

Гуманизация антител

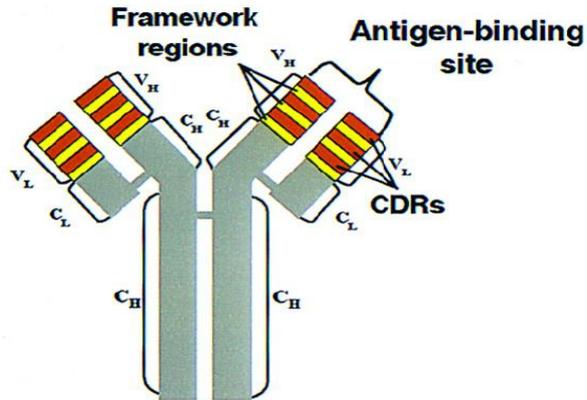


Гуманизация антител

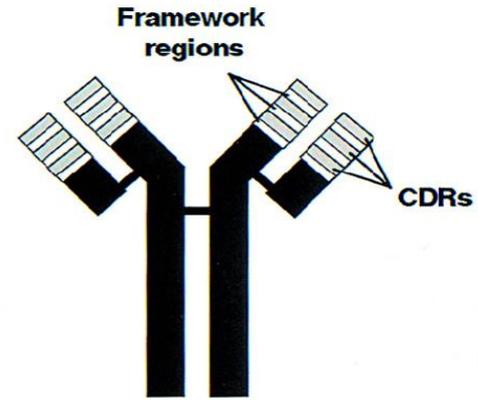


Гуманизация антител

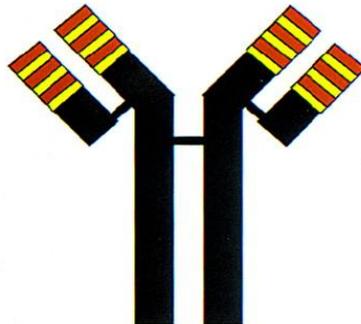
Mouse Antibody



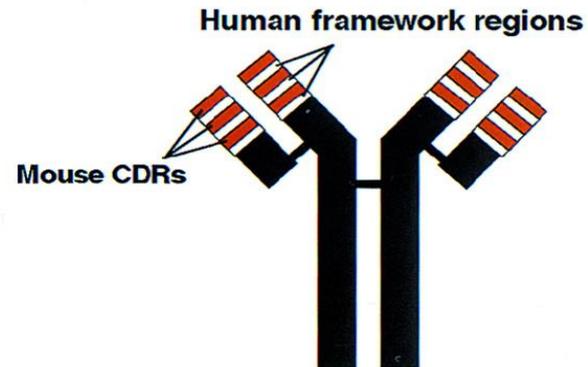
Human Antibody



Chimeric Antibody



Hyperchimeric Antibody



ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКА)

Принцип		Реализация
1	Эффективная иммунизация	Стимуляция В- лимфоцитов антигеном
2	Иммортализация	Нелимитированный рост лимфоцитов после: 1) слияния с опухолевыми клетками; 2) трансформации под воздействием вируса или вирусной онкогенной ДНК
3	Селекция	Скрининг, изоляция и клонирование продуцентов специфических антител в селективной среде для получения нелимитированного роста гибридом
4	Продукция	Накопление МКА <i>in vitro</i>

СТРАТЕГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ И МЫШИНЫХ МКА ИМЕЮТ ПРИНЦИПИАЛЬНЫЕ ОТЛИЧИЯ

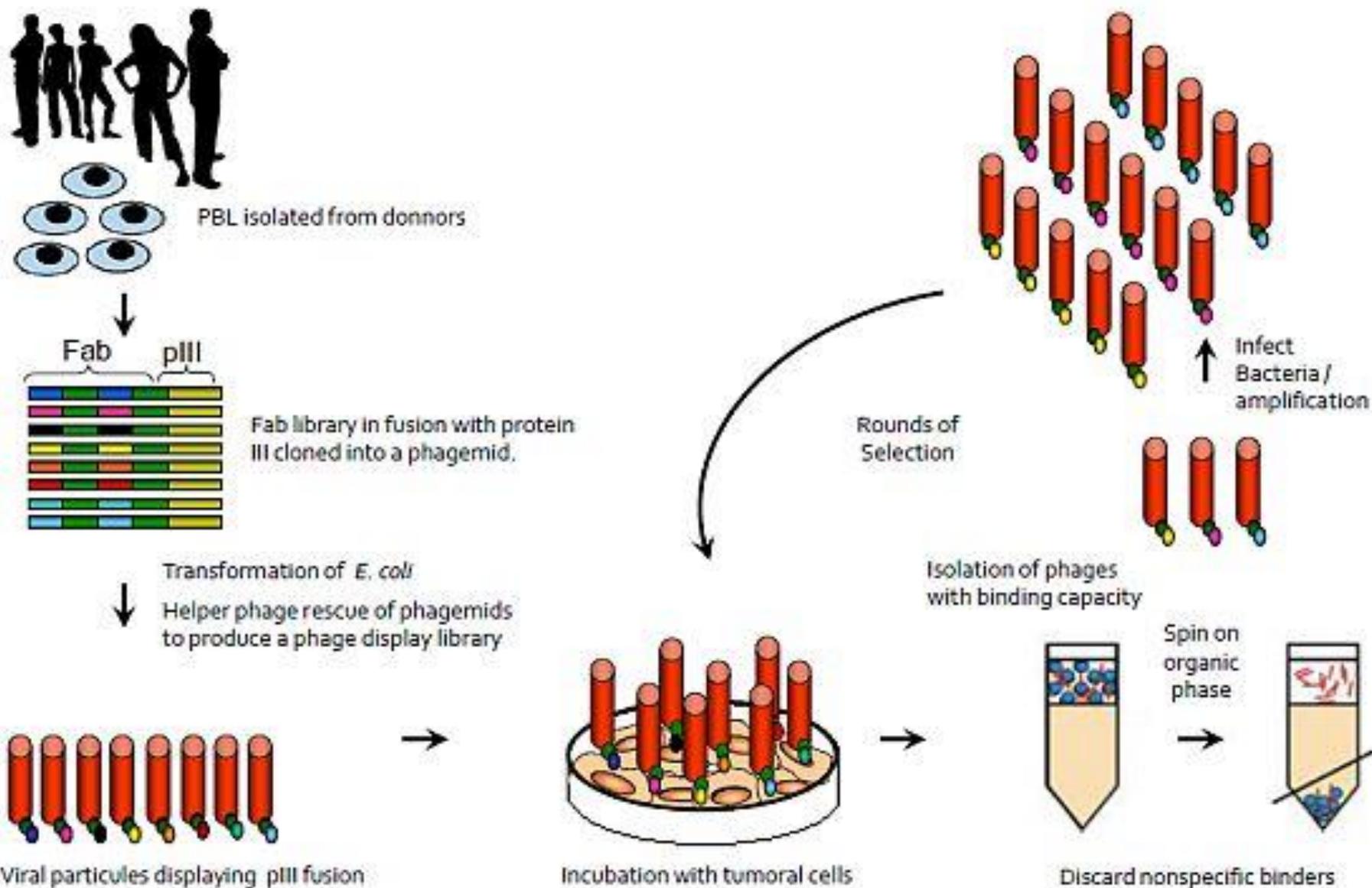
1 - Ограничения в использовании иммунизации

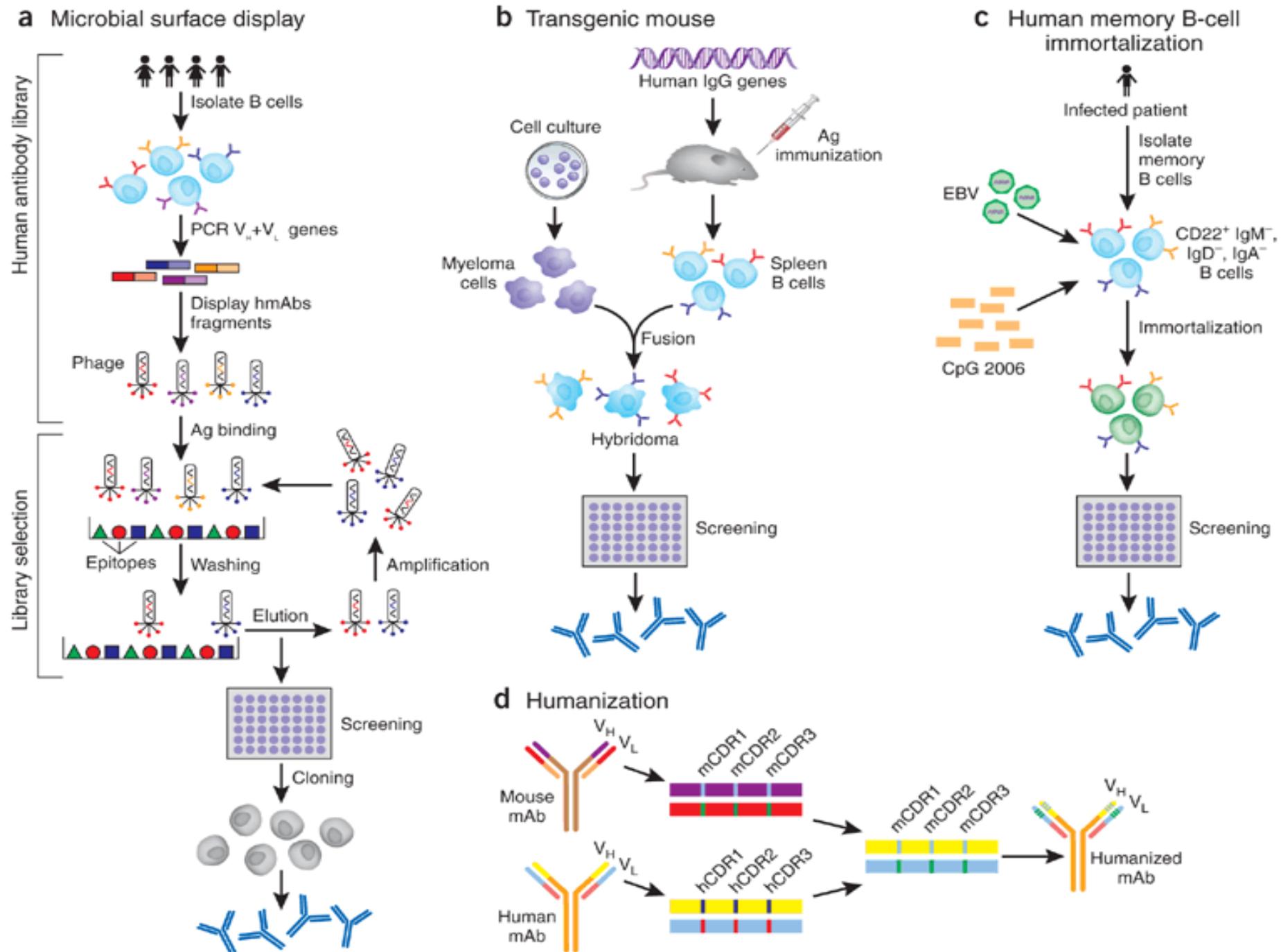
2 - Источник получения лимфоцитов, синтезирующих иммуноглобулины

3 - Дефицит перевиваемых in vitro линий миелом человека, пригодных для использования в гибридной технологии

4 - Иммуортализация В-лимфоцитов человека методом ВЭБ-трансформации

ВЭБ-трансформации для создания линий-продуцентов представляет собой самое существенное отличие получения человеческих МКА по сравнению с МКА мыши





ТРАНСФОРМАЦИЯ ВЭБ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Человеческие МКА против антигенов опухолей – эффективное средство противоопухолевой терапии, обладающее способностью:

- разрушать злокачественное новообразование без какого-либо серьезного побочного эффекта
- предотвращать гематогенные и лимфогенные метастазы при условии эпитопной специфичности человеческих МКА в отношении опухолевых клеток конкретного типа

Пример: человеческие IgM моноклональные антитела к ганглиозиду CD₂, полученные путем трансформации ВЭБ периферических лимфоцитов крови больного меланомой, при введении внутрь опухоли (в кожные метастазы меланомы) больных этой формой рака, обладали значительной эффективностью.

У одного из 8 пациентов были отмечены полная регрессия опухоли и отсутствие метастазирования через 20 мес после проведенного лечения.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ВЭБ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (2)

Человеческие МКА IgG, IgM и IgA против антигенов стрептококков, пневмококков, вируса гриппа, хламидий, цитомегаловируса, вируса герпеса, столбнячного токсина.

Пример: Получены человеческие МКА к возбудителю проказы в системе слияния человек х человек при комбинации линии злокачественных клеток и лимфоцитов, взятых у больных лепрой и модифицированных ВЭБ.

ПРИМЕНЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МКА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

Основное условие для производителей лечебных препаратов:
повышенные требования к безопасности медицинских препаратов антител

Правила, обязательные для соблюдения при создании стандартизованных препаратов МКА

Утверждены Европейским комитетом производителей медицинских продуктов, используемых для терапевтических целей

СТАДИИ ЛАБОРАТОРНЫХ И ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МКА (6 СТАДИЙ)

Стадия 1. Оценка практической ценности гибридных клонов-продуцентов МКА, позволяющая выделить коммерчески значимые линии

Стадия 2. Подбор оптимальной коммерческой среды культивирования клона-продуцента человеческих МКА

Стадия 3. Переход от лабораторного накопления к промышленному производству

Стадия 4. Очистка и концентрирование МКА

Стадия 5. Требования к лекарственной форме лечебных препаратов человеческих МКА

Стадия 6. Контроль качества конечного продукта

СТАДИЯ 1. ПЯТЬ ОСНОВНЫХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ ПРАКТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ГИБРИДНЫХ КЛОНОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МКА:

- | |
|--|
| - стабильность, то есть способность длительное время сохранять секреторную и пролиферативную активность при разных способах культивирования |
| - специфичность (определяют заранее) |
| - аффинность (определяют заранее) |
| - функциональная активность МКА изучается in vitro в иммунологических тестах (флуоресценция, фагоцитоз, С'-независимый и зависимый лизис, цитотоксичность и др.) |
| - отсутствие кросс-реактивности в отношении интактных тканей различной органной локализации |

СТАДИЯ 2. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ КОММЕРЧЕСКОЙ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛОНА-ПРОДУЦЕНТА ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МКА

Культуральная среда должна удовлетворять следующим требованиям:

- иметь минимальное количество белковых компонентов
- не содержать эмбриональную телячью сыворотку
- быть хорошо стандартизированной по всем параметрам
- обеспечивать стабильный и высокий уровень секреции МКА

Критерии оценки: рост клеток, их жизнеспособность и уровень секреции МКА, выраженный в мкг/ 10^6 клеток/ 24 ч

Основное требование: для каждого продуцирующего клона необходим индивидуальный подбор культуральной среды с целью оптимизации синтеза и секреции МКА

СТАДИЯ 3. ПЕРЕХОД ОТ ЛАБОРАТОРНОГО НАКОПЛЕНИЯ К ПРОМЫШЛЕННОМУ ПРОИЗВОДСТВУ

Масштаб *продукции* *человеческих* *МКА* в лабораторных условиях определяет возможность перехода на промышленный уровень

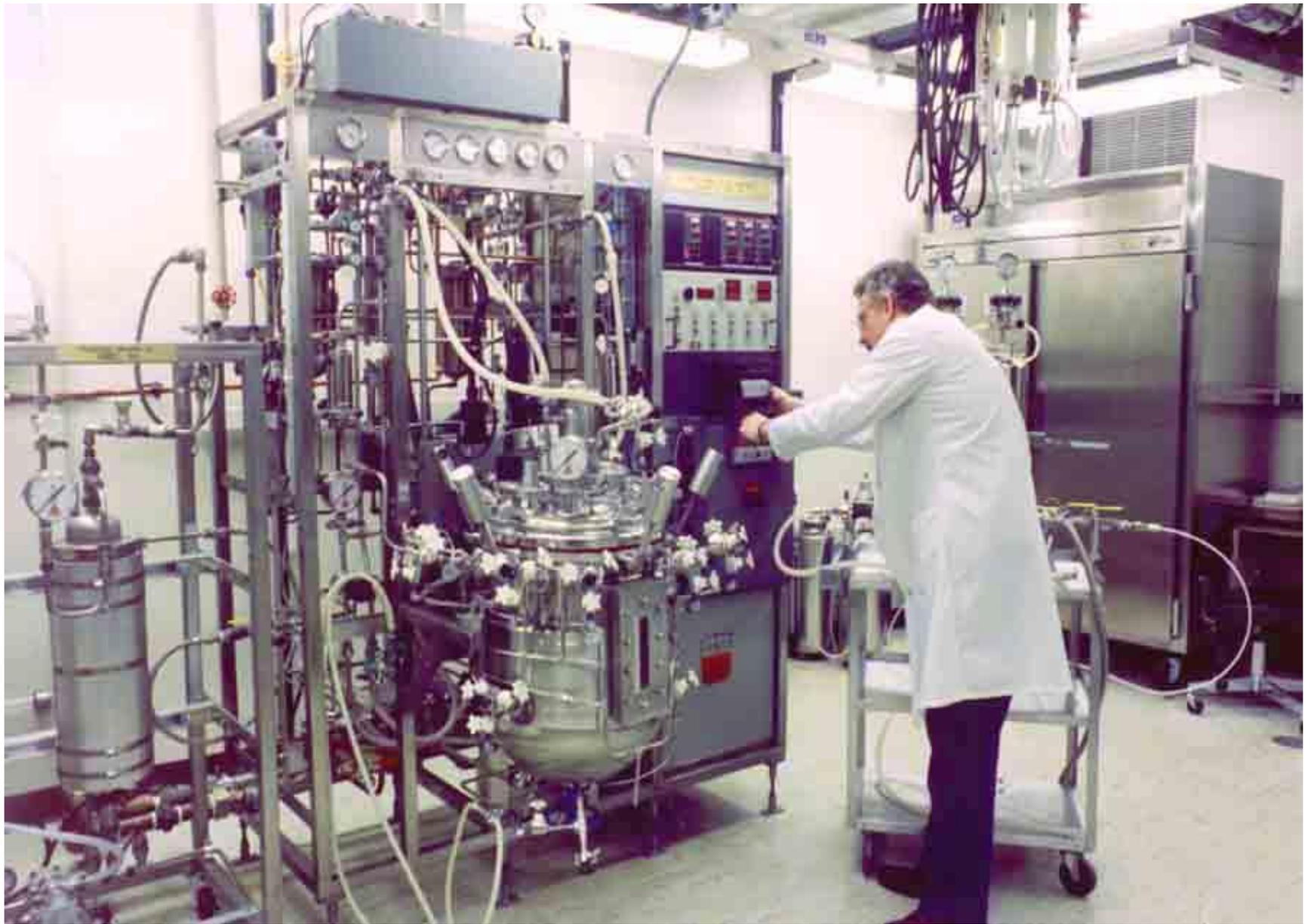
Переход *осуществляется* *поэтапно*:

I этап - адаптация клеточной культуры к росту в относительно небольших объемах, например в роллерных бутылках, с целью уточнения температурного режима, содержания CO₂, pH среды, значений основных компонентов среды

II этап – биореакторные методы культивирования







СТАДИЯ 4. ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ МКА

Процессы очистки и концентрирования МКА включают 3 стадии:

I – стадия начального обогащения до концентрации 3-5 мг/мл

II – промежуточная очистка на основе техники для широкомасштабной очистки антител (различные модификации хроматографических методов)

III – конечная фильтрационная фаза для достижения максимальной степени чистоты продукта

Контроль конечного продукта:

- отсутствие денатурации
- выход МКА ~ 75 %
- чистота 99,5 %

Дополнительно для препаратов, предназначенных для иммунотерапии:

- контроль отсутствия контаминации вирусами и вирусной ДНК (при позитивном результате требуется дополнительная очистка)
- контроль чистоты МКА (аффинная хроматография, ЭФ в ПААГ`е, молекулярная гибридизация, изоэлектрофокусирование, электронная микроскопия, ЯМР)

СТАДИЯ 5. ТРЕБОВАНИЯ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МКА

Препарат должен представлять собой стабильный лиофилизированный продукт, содержащий стандартизованное количество МКА, которое определяется схемой последующего лечения (дозы, способ введения)

Обязателен подбор адекватной среды для разведения МКА.

Предпочтение отдают средам, содержащим компоненты человеческой сыворотки (альбумин)

СТАДИЯ 6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КОНЕЧНОГО ПРОДУКТА (ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ, СТЕРИЛЬНОСТИ, СТАБИЛЬНОСТИ, ПИРОГЕННОСТИ, БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ, НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ, ТОКСИЧНОСТИ)

Тесты контроля качества делятся на тесты первого и второго уровня

Тесты первого уровня обязательны для каждой новой серии и включают:

- скрининг на наличие бактериальной и вирусной контаминации;
- определение активности обратной транскриптазы;
- контроль на отсутствие денатурации иммуноглобулина;
- выявление человеческой ДНК и ДНК ВЭБ методами молекулярной гибридизации

Тесты второго уровня проводятся с определенной периодичностью (обычно ежегодно) и включают:

- проверку канцерогенной активности на искусственно иммунодепрессированных крысах и обезьянах;
- изучение кариотипической характеристики клонов для выявления хромосомных дефектов;
- электронномикроскопический анализ клонов;
- выявление ВЭБ-продуцирующих культур

*Только при отрицательных результатах всех этих тестов возможно
проведение клинических испытаний*

В связи с высокими требованиями, предъявляемыми к стандартизации МКА, каждая стадия технологического процесса должна быть контролируемой и доступной для проверки



Трастузумаб (Trastuzumab, Герцептин) – рекомбинантное МкАТ, которое избирательно связывается с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток многих солидных опухолей. Препарат Herceptin (Trastuzumab) был разработан компанией Genentech и введен в клиническую практику в 1998 году.



Ритуксимаб (Ритуксан, Мабтера) представляет собой химерные моноклональные антитела мыши/человека **специфически связывающиеся с CD20+ антигеном**. Этот антиген локализуется на поверхности пре-B-лимфоцитов и зрелых B-лимфоцитов, но отсутствует на стволовых гемопоэтических клетках, нормальных плазматических клетках и здоровых клетках других тканей. Этот антиген экспрессируется более чем в 90% **B-клеточных неходжкинских лимфом**. Механизм действия Ритуксана связан с развитием опосредованной антитело–зависимой клеточной и комплемент–зависимой цитотоксичности, что вызывает гибель клеток лимфомы, положительных по CD20. Происходит снижение уровня циркулирующих CD20+ B–лимфоцитов, как лимфомных, так и нормальных.

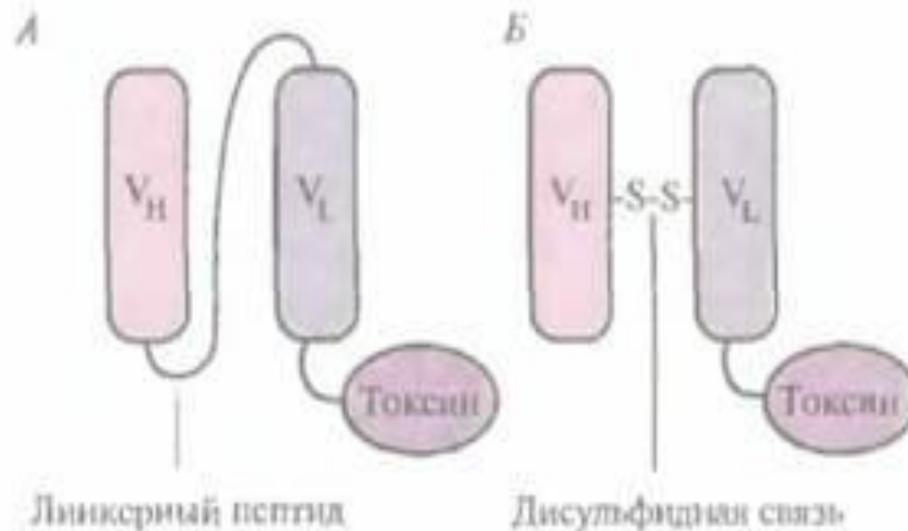


Препарат Алемтузумаб (Кампат, Кэмпас, Campath) – гуманизированное МКА, связывающееся с CD52. Антиген CD52 экспрессируется на мембране большинства зрелых нормальных и опухолевых Т- и В-лимфоцитов с очень высокой плотностью — примерно 500 000 молекул на клетку (по сравнению с антигеном CD20, плотность экспрессии которого составляет около 8000 молекул на клетку). Этим объясняется чрезвычайно высокая активность алемтузумаба в отношении хронического лимфолейкоза и Т-клеточных лимфом



Бевацизумаб (Авастин) представляет собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, которые избирательно связываются с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и нейтрализуют его, что приводит к нарушению ангиогенеза, снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли.

Иммунотоксины



К моноклональным антителам пришиваются (конъюгируются) токсины бактериального или растительного происхождения

Ибритумомаб (ibritumomab, Зевалин)

Бексар (J131Tositumomab, Веххар)

Ремикейд

