

*ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МКА.  
ПОЛУЧЕНИЕ МКА ДЛЯ  
ПРОИЗВОДСТВА  
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ  
ПРЕПАРАТОВ. ПЕРСПЕКТИВЫ  
ПРИМЕНЕНИЯ МКА В КЛИНИКЕ*

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

## *Основные направления использования моноклональных антител*

- ◉ *Диагностика (in vitro и in vivo)*
  - ◉ *Очистка антигенов*
- ◉ *Профилактика и лечение различных заболеваний*

## *Области применения МКА и диагностических препаратов, приготовленных на их основе*

### *in vitro*

- ⊙ Экспериментальная медицина
- ⊙ Микробиология
- ⊙ Иммунология
- ⊙ Онкология
- ⊙ Трансплантология
- ⊙ Гематология
- ⊙ Кардиология
- ⊙ Эндокринология
- ⊙ Акушерство и гинекология

### *in vivo*

- ⊙ Онкология
- ⊙ Гематология
- ⊙ Эндокринология

# *Моноклональные средства, применяемые для лечения и профилактики заболеваний различной этиологии*

*in vivo*

- ⊙ **Онкология**
- ⊙ **Трансплантология**
- ⊙ **Гематология**
- ⊙ **Эндокринология**
- ⊙ **Инфекционные  
болезни**

*ex vivo*

- ⊙ **Онкология**
- ⊙ **Гематология**
- ⊙ **Эндокринология**
- ⊙ **Кардиология**
- ⊙ **Токсикология**

# ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ИММУНОЛОГИЯ

- Изучение антигенных систем человека
- Исследование и типирование антигенов клеточной поверхности и антигенов гистосовместимости человека
- Идентификация дифференцировочных антигенов клеток человека, поверхностных структур лимфоцитов
- Анализ структуры иммуноглобулинов, изучение идиотипических детерминант иммуноглобулинов
- Определение функциональной активности отдельных биополимеров, их эпитопов
- Конструирование иммуногенных полипептидов и получение МКА к заданным индивидуальным антигенным детерминантам
- Изучение репертуара генетического полиморфизма тканевых антигенов
- Созданы панели МКА для определения классов и субклассов иммуноглобулинов человека
- Созданы панели МКА к антигенам главного комплекса гистосовместимости I и II классов (системы HLA)
- Получено большое количество МКА к дифференцировочным антигенам практически всех субпопуляций иммуноцитов человека: Т-хелперов/индукторов, Т-супрессоров /киллеров, нормальных киллеров, моноцитов и т.д.
- Определение точной концентрации различных субпопуляций иммуноцитов в крови и суспензиях клеток лимфоидных органов (ф. ORTHO, США)

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МКА КАК СТРУКТУРНЫХ ЗОНДОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ТИПИРОВАНИИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

## *Коммерческие препараты МКА:*

- - «Лимфоцитарные наборы образцов МКА» для диагностики иммунопатологических состояний и лейкозов человека
- - «Наборы изотипспецифических флуорохромированных МКА»
- специфическое связывание с антигенами клеточных мембран
- для обнаружения маркеров разных стадий дифференцировки лейкоцитов человека (CD-Cluster Differentiation)
- для обнаружения антигенов субпопуляций Т- и В-лимфоцитов
- для маркирования антигенов HLA класса II - главного комплекса гистосовместимости человека
- панели МКА, специфичных к антигенам всех групп крови эритроцитов человека: системы АВО, резус, Н-фактора

# ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЯ

- Созданы большие панели МКА к различным клеткам крови
- Выделены в чистом виде отдельные молекулы антигенов групп крови и системы HLA, изучен их химический состав, аминокислотные последовательности
- Созданы коммерческие наборы для типирования практически всех группспецифических антигенов эритроцитов крови: систем АВО, резус, Н, Левис, N, Р и др. (в основном использованы мышьиные МКА; для выявления резус-антигена D применяют только человеческие МКА)
- Получены МКА к компонентам плазмы: факторам свертывания крови VIII, С, IX, X, фактору Виллебранда, фибрину, фибриногену и т.д., используемые для
  - 1) количественного определения содержания этих антигенов в крови,
  - 2) изучения механизмов нормальной гемокоагуляции *in vitro*,
  - 3) изучения патогенеза различных заболеваний

## *В клинической практике*

1) МКА к фибрину используют *in vivo* для точной радиоиммулокализации венозных тромбов,

2) МКА к фибрину, но не взаимодействующие с фибриногеном, предложены для разрушения тромбов с помощью конъюгатов этих МКА с урокиназой.

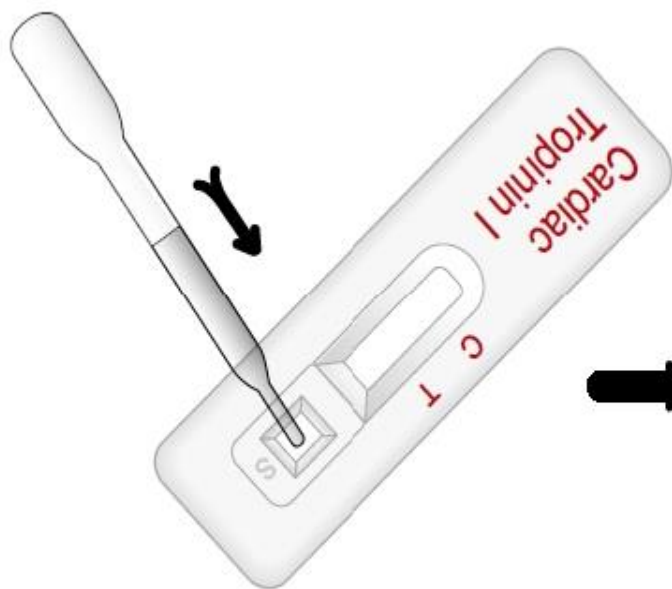
В доклинических испытаниях этот метод на два порядка был более эффективен, чем лизис тромбов под действием свободной урокиназы.

# КАРДИОЛОГИЯ (ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ)

- МКА к низкоплотному липопротеиду (ароВ) сыворотки крови человека используют для:
  - 1) изучения его генетического полиморфизма,
  - 2) определения концентрации липопротеида ароВ в сыворотке, так как это имеет диагностическое и прогностическое значение для пациентов с заболеваниями коронарных артерий,
  - 3) специфического освобождения крови *ex vivo* от избыточного количества липопротеида ароВ (экстракорпоральная гемосорбция)



## Процедура теста



Внести 3 капли образца



20 минут



Интерпретация результата

# ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

## *Диагностика*

- Высокоспецифичное определение отдельных гормонов в биологических жидкостях человека:
  - хорионического гонадотропина,
  - гормона роста,
  - тиреотропного и др.

## *Лечение*

Коррекция эндокринных взаимодействий с помощью МКА с выраженной биологической функцией (in vivo)

# АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

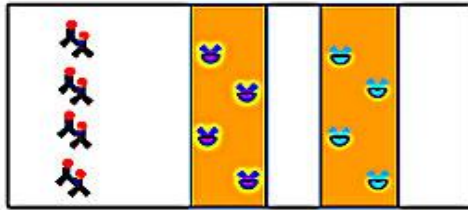
## Диагностика

- Ранняя диагностика беременности
- МКА к специфическому эстроген-зависимому белку эндометрия (P24) позволяют проводить дифференциальную диагностику различных гипо- и гиперпластических, а также неопластических изменений в эндометрии (иммуногистохимический метод)
- МКА к одному из пептидов хорионического гонадотропина используют :
  - 1) для контроля течения нормальной беременности,
  - 2) диагностики ранних стадий хорионэпителиомы

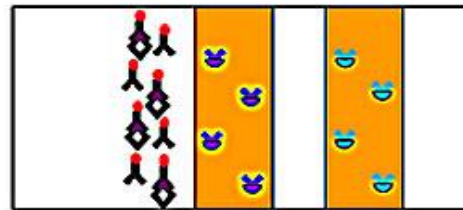
## ○ Перспективы

- Экспериментально установлено, что МКА к антигенам гамет (сперматозоидов или блестящей оболочки яйцеклетки) способны препятствовать оплодотворению *in vitro*
- Обоснован выход на создание контрацептивных вакцин или пассивную сероконтрацепцию с помощью высокоспецифичных МКА к антигенам гамет или гормонов и биологически активных факторов беременности

## Принцип иммунохроматографии

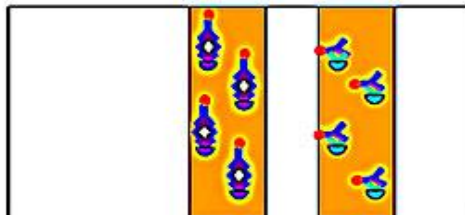


**А** – «сухая» ИХА-полоска. В специальной зоне хроматографической мембраны находятся моноклональные антитела к белку-маркеру, меченые коллоидным золотом. Антитела к другому эпитопу маркера, а также вторичные антитела к меченым моноклональным антителам иммобилизованы в соответствующих зонах захвата.

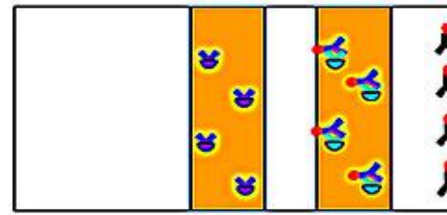


**Б** – на полоску нанесена сыворотка, плазма или цельная кровь. Фронт биологической жидкости мигрирует по полоске. При этом молекулы маркера связываются с соответствующими антителами.

Хроматографической поток →







**В** – положительный результат анализа. Меченые антитела фиксируются в обеих зонах захвата.



**Г** – отрицательный результат анализа. Меченые антитела фиксируются только в контрольной зоне. Несвязавшиеся антитела мигрируют далее в абсорбционную мембрану.

### Условные обозначения

-  Моноклональные антитела против белка-маркера, меченые коллоидным золотом
-  Иммобилизованные моноклональные антитела против маркера
-  Иммобилизованные вторичные антитела против моноклональных антител
-  Молекулы белка- маркера

# EVITEST

## HCG URINE PREGNANCY TEST ЭВИТ

тест для иммунохроматографического определения хорионического гонадотропина (ХГЧ) в моче для ранней диагностики беременности

IVD in vitro diagnostic


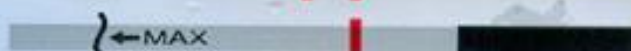

НЕ ПРИНИМАТЬ  
ВО ВНУТРИ!



Способ применения:

• Тест для самостоятельного использования. • Вскройте пакет, достаньте тест-полоску.



-  тест **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ** (беременность есть)
-  тест **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ** (беременности нет)
-  тест **недействителен** (повторите тест)



ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ: 20 мМЕ/мл

Определение беременности в 1 день задержки менструального цикла. Хранить при температуре (4°C-30°C)  
производитель: Хелм Медикал ГмБХ (Helm Medical GmbH), D-20097, Гамбург, Нордканалштрассе, 28, Ге

## *ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МКА В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ В КАЧЕСТВЕ ИММУНОСУПРЕССОРОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОТТОРЖЕНИЯ ОРГАНОВ*

- ◉ МКА взаимодействуют с антигенами главного комплекса гистосовместимости HLA II класса

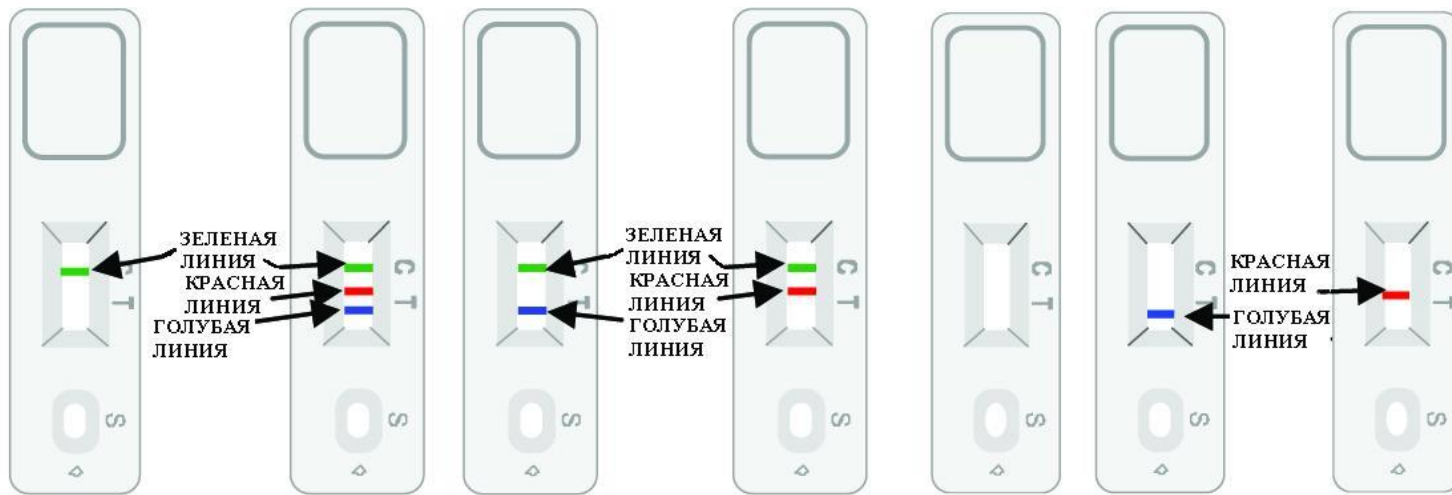
Фирма ORTO (США) выпускает наборы

МКА ОКТ-3 (к общей для Т-лимфоцитов детерминанте)

При введении в организм МКА способны блокировать эффекторные функции Т-лимфоцитов. Подавляют иммунный ответ на трансплантат

# ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ НАПРАВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ

- Получение новых данных, которые ранее, при использовании ПКА, отсутствовали
- Изучение антигенов возбудителей бактериальных, вирусных паразитарных, микотических и других инфекций
- Классификация видов микроорганизмов
- Выявление слабо выраженных антигенных различий между вариантами одного и того же штамма микроорганизма
- Внутривидовое типирование
- Изучение структуры антигенов и их локализации в микробной клетке
- Изучение “дрейфа” антигенов у вирусов, выявление отличий у циркулирующих “уличных” и вакцинных вариантов вирусов (поликлональные антитела не пригодны)
- Стадиейспецифические антигены паразитов (малярия)
- Получение диагностических препаратов нового поколения на основе моноклональных антител для МФА, ТИФМ, РИА
- Эпиднадзор за возбудителями опасных инфекционных заболеваний, в том числе природно-очаговых инфекций
- Исследование проб клинического материала, объектов внешней среды
- Индикация и идентификация возбудителей особо опасных инфекций в различных объектах исследования



ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Рота-Аденовирус  
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

Аденовирус  
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

Ротавирус  
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫЙ

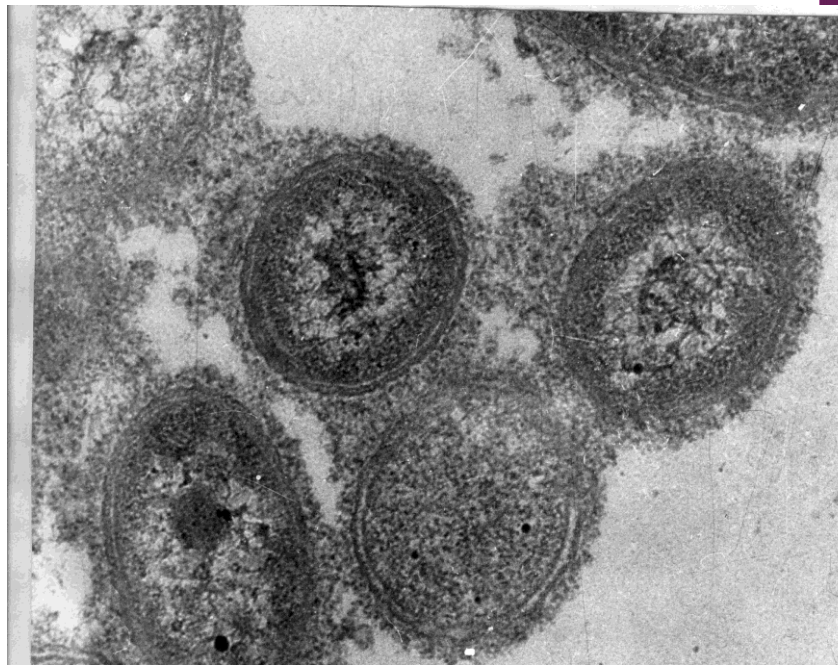
НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫЙ



## Изучение структуры антигенов и их локализации в микробной клетке



Ультратонкий срез клеток *B. pseudomallei* VPA, инкубированных с МКА против АГ 6. Для выявления иммунного комплекса использован антимышиный ИПКонъюгат. Увеличение  $\times 80000$



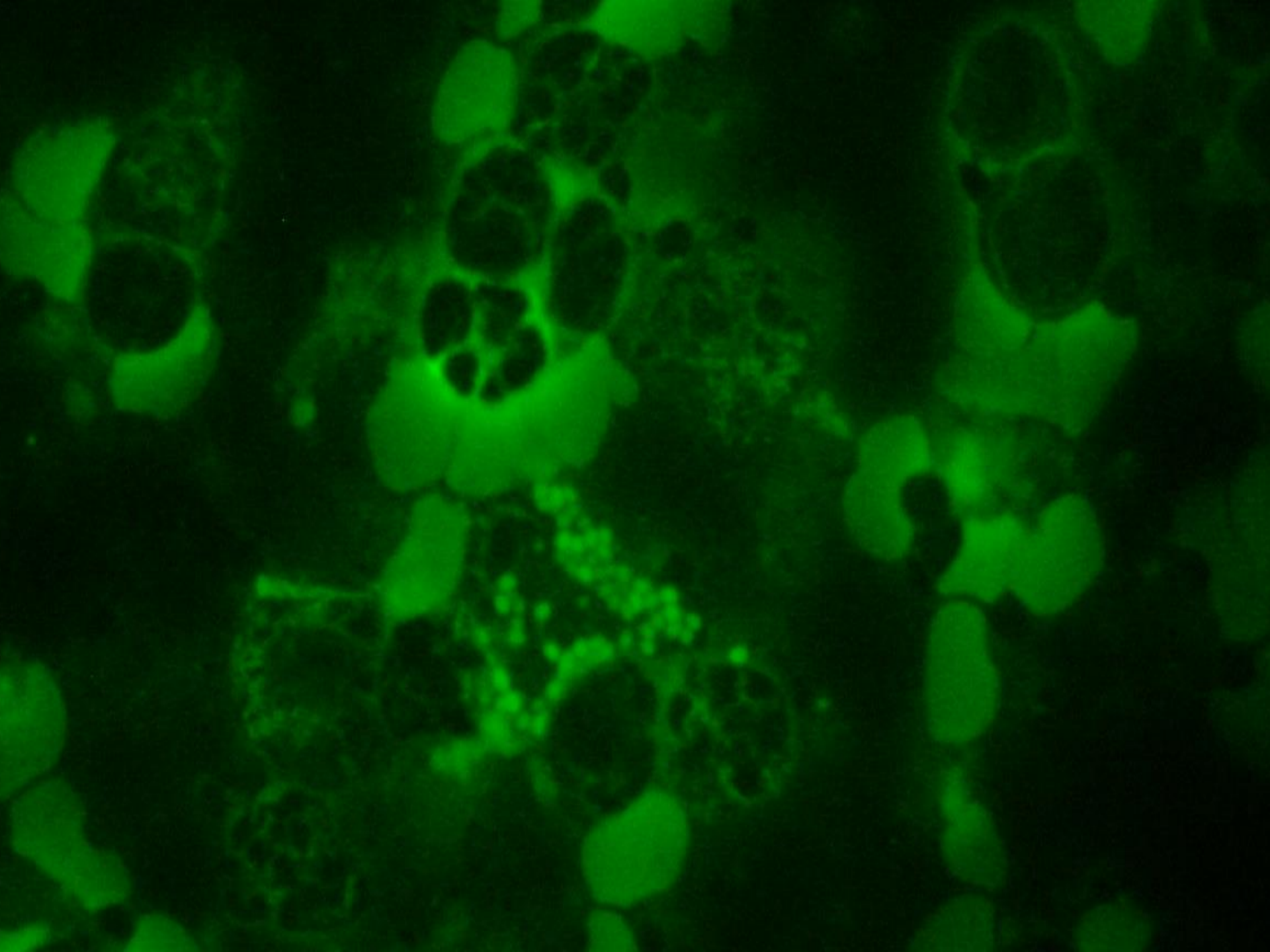
Ультратонкий срез клеток *B. pseudomallei* 114, инкубированных с МКА против АГ 8. Для выявления иммунного комплекса использован антимышиный ИПКонъюгат. Увеличение  $\times 60000$

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МКА В СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДАХ  
ТИФМ, РИА, МФА, ИММУНОБЛОТТИНГ,  
МИКРОЦИТОФЛУОРОМЕТРИЯ  
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ:**

- вирусов
- бактерий
- риккетсий
- микоплазм
- легионелл
- лептоспир
- хламидий
- возбудителей микозов
- простейших
- паразитов
- бактериальных токсинов и микотоксинов

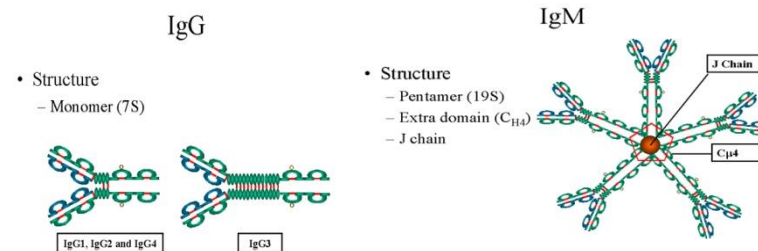
Использование МКА в серологических методах:

- повышает специфичность анализа
- устраняет фоновые (перекрестные) реакции
- увеличивает вероятность обнаружения микроорганизмов в пробах внешней среды и образцах клинического материала
- повышает достоверность и воспроизводимость анализа
- требуются чрезвычайно малые количества МКА (нг)



# ПРОИЗВОДСТВО МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И ТЕСТ-СИСТЕМ

- США и Японии производят диагностические препараты на основе МКА на сумму более 2 млрд долларов/год
- К 2000 году в США доля препаратов, приготовленных на основе МКА, составила 90% всех иммунодиагностических препаратов, к 2009 году - более 95 %
- Стоимость препаратов моноклональных антител составляет 200–500 долларов за 1 мг.



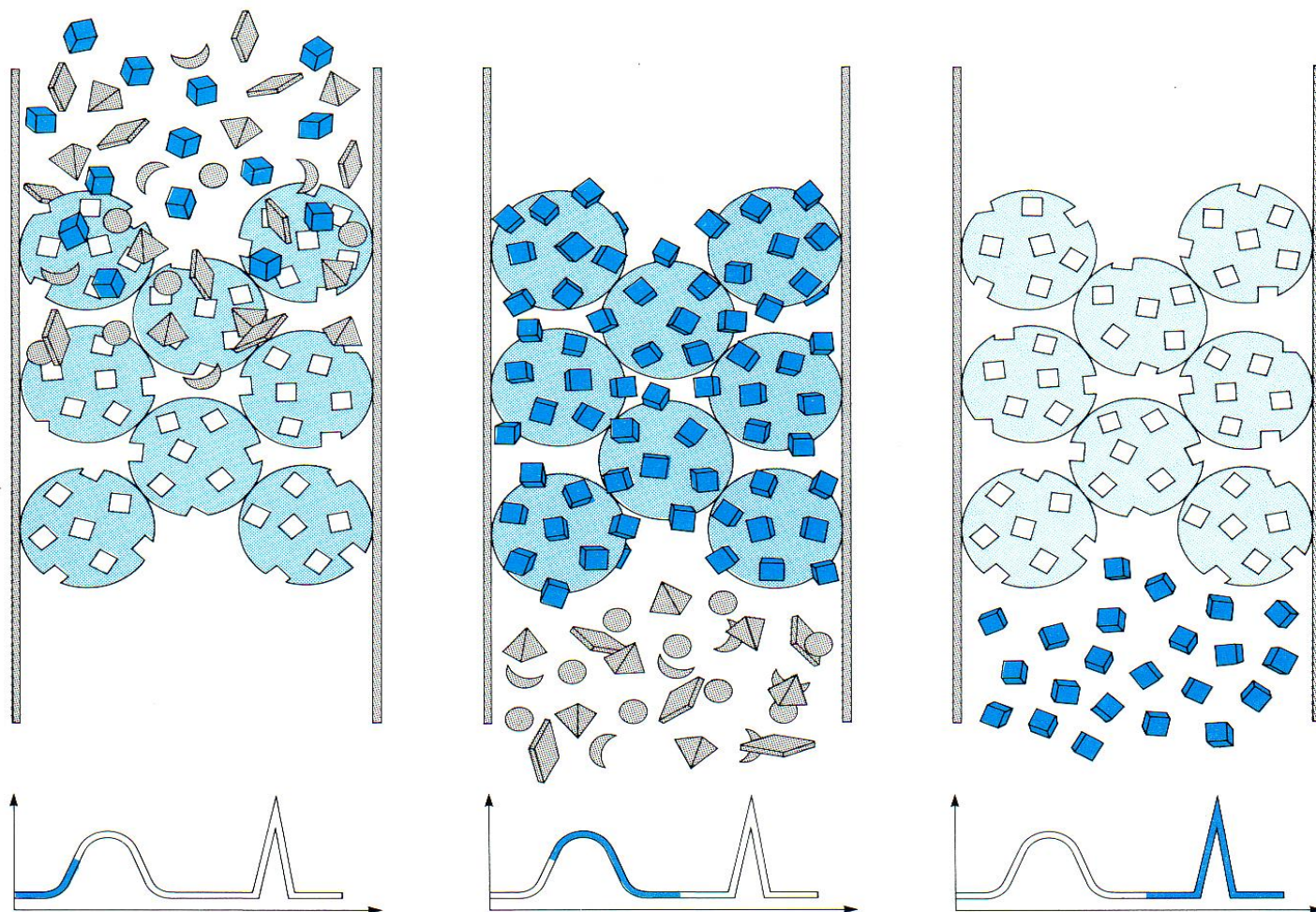
# ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ АНТИГЕНОВ ИЗ СЛОЖНЫХ СМЕСЕЙ

## МЕТОД

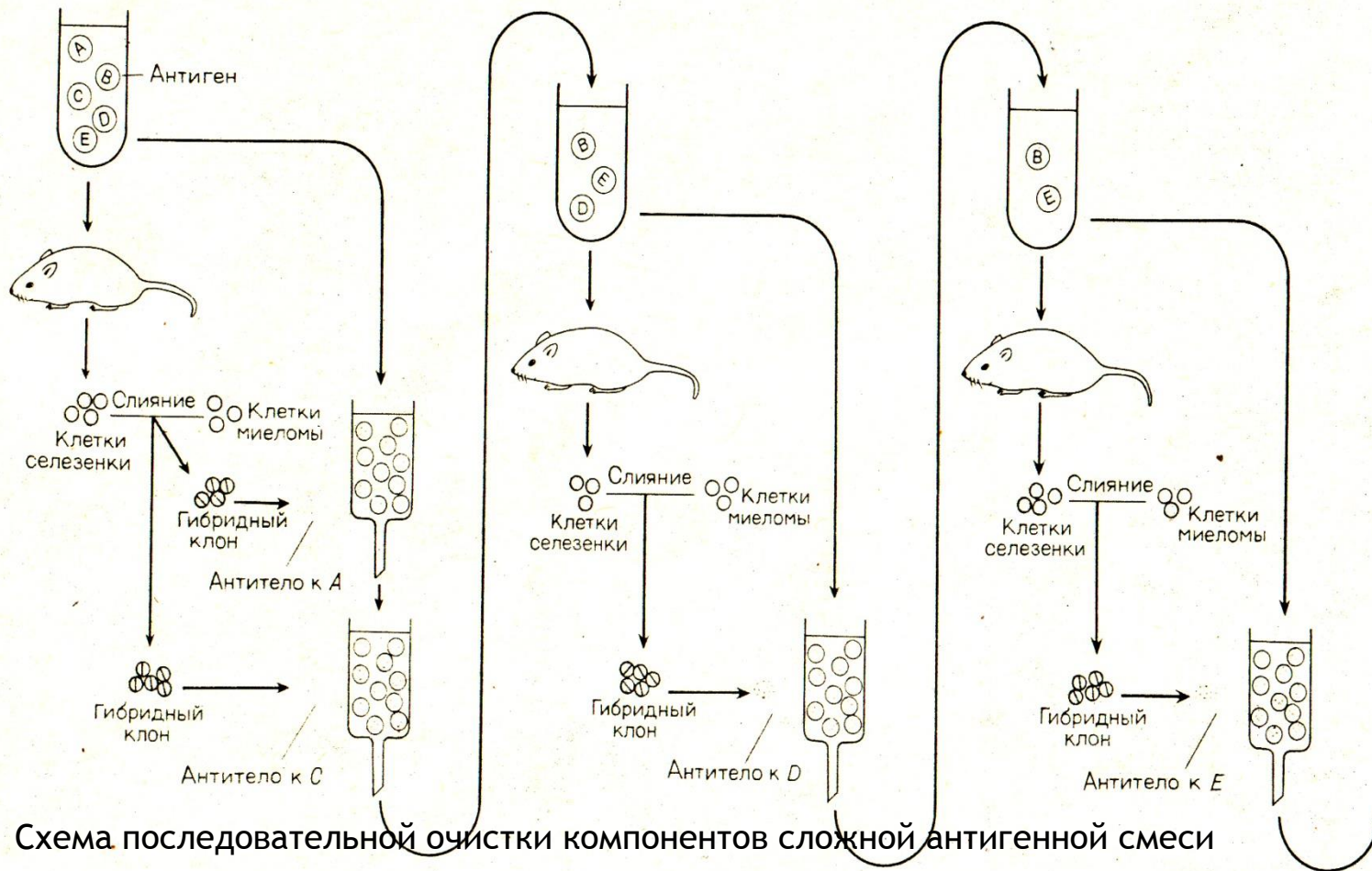
- *Аффинная очистка антигенов на колонках с иммуносорбентом, приготовленным с использованием МКА в качестве лиганда*
- Применение метода:
- очистка ферментов, гормонов, токсинов, антигенов микроорганизмов, биополимеров с различными м.м.
- выделение биологически активных веществ из сложных смесей
- идентификация ранее неизвестных молекул в комплексных смесях
- изучение структуры и функции различных антигенов, вплоть до исследования последовательностей в молекулах НК
- изучение поверхностных антигенов бактерий и выделение их в чистом виде

# АФФИННАЯ ОЧИСТКА АНТИГЕНОВ ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОСОРБЕНТОВ

Схема. Этапы проведения иммуносорбции



# КАСКАДНАЯ ОЧИСТКА АНТИГЕНОВ



### **Иммунодиагностика опухолей**

- Обнаружение и идентификация опухолевых антигенов, в том числе стадийспецифических антигенов
- Иммуногистохимическая диагностика опухолей и метастазов, иммунолокализация опухоли
- Радиоиммуносканирование опухоли и метастазов с помощью конъюгатов МКА против опухолеспецифических антигенов с радиоактивными изотопами

### **Лечение**

- Терапия злокачественных заболеваний (разрушение злокачественного новообразования, регресс опухоли, предупреждение лимфо- и гематогенного метастазирования как следствие введения иммунотоксина, иммуноцитостатика или иммуносупрессора)
- Экстракорпоральная очистка крови
- Противоопухолевая терапия



## ***МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ***

- применение препаратов МКА in vivo в чистом виде
- применения радиоактивных иммуноглобулинов с неоперабельным первичным раком
- соединение МКА с цитотоксическими веществами (иммунотоксины)

# ИММУНОТОКСИНЫ

Способ применения моноклональных антител с цитотоксическими веществами

Для конъюгирования с МКА используют:

- ❑ токсины биологического происхождения (рицин, дифтерийный токсин,  $\alpha$ -аманитин)
- ❑ радиоактивные изотопы
- ❑ липосомы, с заключенными в них лекарственными веществами

## **ПРИМЕНЕНИЕ МКА EX VIVO В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

- При онкологических заболеваниях кроветворной системы костный мозг или периферическую кровь подвергают экстракорпоральной очистке на колонках с моноклональными иммуносорбентами
- В настоящее время предпринимаются успешные попытки использовать МКА против Т-лимфоцитов, а также лейкозных клеток
- Для обработки клинического материала ex vivo используют мышинные МКА, а затем их вновь вводят пациентам

# ПРИМЕНЕНИЕ МКА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРОТЕКТИВНЫХ И ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

## Терапевтические (протективные) иммуноглобулины

➤ наиболее дорогие лекарственные средства

➤ реагенты недолговечны

➤ имеют небольшие рынки сбыта

- Введение МКА для специфической защиты против инфекции
- Развитие немедленного иммунитета у больного (пассивная иммунизация)
- Пассивная иммунизация человеческими МКА (10 МКА )
- Получены протективные человеческие МКА к:
  - ботулиническим токсинам АВСДЕ
  - стафилококковому токсину В
  - столбнячному токсину
  - возбудителям вирусных энцефалитов
  - *Listeria monocytogenes*
  - *Candida albicans*
  - *Micobacteria tuberculosis*
  - *P.aeruginosa* 5 серотипа

## *КОММЕРЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ*

Компания PharmAthene (США) осуществляет выпуск коммерческого препарата Valortim, представляющего собой человеческие сибиреязвенные МКА для биозащиты населения. Кроме того, сотрудниками компании Medarex (США) получены полностью охарактеризованные человеческие МКА MDX-1303 к протективному антигену возбудителя сибирской язвы, находящиеся в стадии доклинических испытаний с целью последующего использования для защиты от этого особо опасного микроорганизма.

В настоящее время обе вышеназванные компании, специализирующиеся на разработке и выпуске средств биозащиты, объявили о соглашении, предусматривающем дальнейшее совершенствование производства полностью охарактеризованных человеческих МКА MDX-1303.