

Моноклональные антитела: мировой и украинский опыт

Ряд открытий, сделанных во второй половине XX века, в частности обнаружение и расшифровка ДНК и генетического кода белков, а также создание технологии получения моноклональных антител (МКАТ), фактически обусловили эволюцию биологии и медицины от феноменологических до точных наук. Сегодня МКАТ прочно вошли в клиническую практику в онкологии и ряде других областей медицины, обусловив серьезный прогресс в лечении целого ряда заболеваний, а также существенно изменили диагностические подходы.

Моменты истории

Немецкий фармаколог и иммунолог, лауреат Нобелевской премии Пауль Эрлих назвал антитела «магической пулей» не случайно, и с каждым годом появляется все больше новых тому подтверждений. Помимо прорыва в клинической практике, технология получения МКАТ существенно разнообразила арсенал новых диагностических методов. Созданные с использованием этой технологии уникальные реагенты на основе МКАТ широко используются для анализа молекулярных механизмов, лежащих в основе функционирования клеток в норме и при патологии. По мнению ведущих экспертов, дальнейший прогресс в диагностике и терапии злокачественных новообразований невозможен без применения реагентов, основанных на МКАТ. Сегодня МКАТ признаны наиболее быстро развивающимся классом терапевтических средств, в их создание во всем мире вкладываются значительные средства.

Авторами современной технологии получения МКАТ являются Георг Кёлер и Сесар Милштейн (G. Kohler и C. Milstein), которые в 1975 г. опубликовали протокол слияния клеток мышинной миеломы с лимфоцитами мыши, предварительно иммунизированной антигеном, разрешив свободное использование этой технологии. Используемая этими учеными технология включала несколько этапов: у мыши вырабатывался иммунитет к известному антигену, затем из ее селезенки выделялись антителопродуцирующие клетки, эти клетки с помощью особой технологии сливали с клетками миеломы, получая гибридные клетки (гибридомы). В свою очередь клетки гибридомы непрерывно и в большом количестве синтезировали антитела против определенного антигена. Эта методика произвела переворот в иммунологии, поскольку позволила получать антитела с точным соответствием определенной структуре.

Перспективы использования гибридомной технологии были высоко оценены, и в 1984 г. ее создатели были удостоены Нобелевской премии в области биологии и медицины.

Получение и селекция гибридом

Главный принцип гибридомной технологии заключается в том, что при слиянии миеломной клетки и В-лимфоцита гибридома наследует от миеломной клетки способность к неограниченной пролиферации и бессмертию, а от иммунного В-лимфоцита — способность синтезировать антитела определенной специфичности.

Клеточные линии миеломного (плазмацитомного) происхождения целенаправленно создавались и адаптировались к условиям культивирования вне организма. Следует отметить, что у клеток миеломы, которые используются для гибридизации, отсутствует фермент гипоксантин гуанин-фосфорибозилтрансфераза, участвующий в синтезе ДНК. Этот фермент обеспечивает запасной путь синтеза аденозинмонофосфата в тех условиях, когда нормальная цепь ферментативных реакций заблокирована (например, в присутствии ингибитора — аминоптерина). В питательной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ-среда), такие миеломные клетки могут делиться.

Вторым партнером для слияния являются иммунные В-лимфоциты селезенки или лимфатических узлов, которые нежизнеспособны при длительном культивировании, но имеют ген гипоксантин гуанин-фосфорибозилтрансферазы.

Таким образом, селекция гибридных клеток основывается на том, что в ГАТ-среде выживают и делятся только те клетки, которые унаследовали бессмертие от клеток миеломы, а резервный путь синтеза предшественников нуклеиновых кислот — от нормальной клетки. Такие гибриды (гетерокарионы) синтезируют специфические антитела и при этом сохраняют способность к пролиферации.

Гибриды-гомокарионы — миелома-миелома и лимфоцит-лимфоцит, а также клетки миеломы и лимфоциты, которые не образовали гибриды, погибают в культуре in vitro через 2–3 недели.

После селекции гибридом проводят их клонирование с целью получения клонов конкретных клеток, секретирующих антитела желаемой специфичности и аффинности (рис.). Целевые клоны гибридом выращивают в культуре in vitro в больших объемах, либо in vivo (у мышей) как асцитную форму опухоли. В итоге культуральная среда и асцитическая жидкость служат источником МКАТ.

Этапы изучения моноклональных антител

Благодаря высокой специфичности и чувствительности, МКАТ стали неотъемлемой ключевой составляющей фундаментальных медико-биологических исследований и клинической лабораторной практики. С помощью МКАТ были открыты сотни новых антигенов нормальных и злокачественно трансформированных клеток, изучены свойства уже известных молекул.

Начиная с 1981 г., осуществляется международное научное сотрудничество в области изучения поверхностных антигенов лейкоцитов, в рамках которого осуществляется обмен МКАТ, полученных в лабораториях разных стран, и изучение их специфичности с использованием статистического метода кластерного анализа.

Результатом такого сотрудничества стало создание унифицированной номенклатуры антигенов лейкоцитов человека (CD — cluster of differentiation). Начиная с 1982 г. было проведено девять Международных рабочих совещаний по изучению антигенов лейкоцитов человека, на которых было создано 363 кластера дифференцировки (CD).

В Украине научные работы по получению гибридом, продуцирующих МКАТ к антигенам дифференцировки лейкоцитов человека, были начаты в 1982 г. под руководством профессора Д.Ф. Глузмана в отделе цитохимии и иммуноцитологии Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (ИЭПОР). В 1983 г. научными сотрудниками отдела А.П. Ветровой и С.П. Сидоренко были получены первые гибридомы, продуцирующие МКАТ к поверхностным антигенам лейкоцитов человека. С того времени учеными ИЭПОР создана панель отечественных

МКАТ (серия IPO), послужившая толчком для идентификации антигенов и их всестороннего изучения.

Некоторые из этих МКАТ были включены в исследование Международных рабочих совещаний по изучению антигенов лейкоцитов человека и получили номенклатуру CD37 (МКАТ IPO-24), CD95 (МКАТ IPO-4) и CD150 (МКАТ IPO-3). Кроме того, указанные МКАТ были референтными антителами на V, VI, VII и IX Международных рабочих совещаниях, которые проходили в городах Бостоне (США, 1993), Кобе (Япония, 1996), Харрогейте (Великобритания, 2000) и Барселоне (Испания, 2010). Эти и другие МКАТ серии IPO защищены авторскими свидетельствами и прошли апробацию в научно-исследовательских лабораториях многих стран мира, включая Украину, Россию, США, Великобританию, Францию, Чехию, Германию, Кубу, Израиль.

Использование технологии МКАТ позволило коллективу авторов ИЭПОР впервые идентифицировать ряд антигенов, прежде всего, антиген CD150/IPO-3/SLAM. В результате многовекторных и комплексных исследований в лаборатории сигнальных каскадов клеток (заведующий профессор С.П. Сидоренко) была получена целостная картина структуры, экспрессии и функций антигена CD150, а также CD150-опосредованных сигнальных каскадов в нормальных и злокачественно трансформированных Т- и В-клетках, открыт новый сигнальный мотив ITSM — структурная единица цитоплазматического участка CD150.

В 1993 году в г. Бостоне на Международном рабочем совещании по антигенам дифференцировки лейкоцитов, МКАТ IPO-4 стало одним из трех МКАТ, которыми определяли антиген, получивший международную номенклатуру CD95. Известно, что IPO-4 (IgM) индуцирует апоптоз клеток без лигации вторичными антителами и имеет наиболее высокую аффинность к CD95 среди всех антител, которые были исследованы в рамках Международных рабочих совещаний.

Кроме того, в ИЭПОР получены МКАТ IPO-38 к антигену, который, в отличие от Ki-67, экспрессируется на всех активных стадиях клеточного цикла, кроме G0, а также обнаруживается в ранней G1-фазе клеточного цикла. Учеными ИЭПОР установлена диагностическая и прогностическая значимость определения этого маркера при злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях, раке грудной железы, раке желудка и опухолях центральной нервной системы.

Сегодня лаборатория сигнальных каскадов клеток ИЭПОР имеет широкую панель МКАТ для научных, лабораторных и диагностических исследований (о чем мы неоднократно писали на страницах наших изданий). Среди них — МКАТ к основным маркерам Т-клеток (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD27, CD28), В-лимфоцитов (CD10, CD19, CD20, CD22, CD37), NK-клеток (CD16, CD56), активированных лимфоцитов (CD25, CD95, CD150). Эти МКАТ, наряду с МКАТ, специфичных к CD15, CD34, CD38, CD43, CD45, CD45RA, CD 48, CD54, CD66e, p53, панцитокератину, цитокератину 18, муцину-1 (Muc-1), EpCAM (CD326), легким цепям иммуноглобулинов, HLA-A, B, C и HLA-Dq, применяют при исследовании антигенов тканей различного гистогенеза.

После проведения технических, доклинических и клинических испытаний ИЭПОР получил Свидетельство о государственной регистрации на медицинское изделие «Антитела моноклональные ТУ У 24.4-05416946-002:2011» № 11072/2011 (MD № 033900, срок действия свидетельства неограничен). Приказом Государственной службы Украины по лекарственным средствам от 14.12.2012 г. № 1050 разработка внесена в государственный регистр медицинской техники и изделий медицинского назначения и разрешена для применения на территории Украины.

Применение в диагностике и клинической практике

В условиях повышения распространенности онкологической патологии, СПИДа, гепатитов, туберкулеза, ряда других инфекционных и аллергических заболеваний актуально создание специфических наборов МКАТ для мониторинга иммунологического статуса больных и своевременной оценки эффективности лечения. Применение этих высокоспецифичных реагентов дает возможность усовершенствовать проведение иммунофенотипирования клеток при лейкозах и лимфомах, что, в свою очередь, влияет на тактику лечения больных и прогноз течения заболевания.

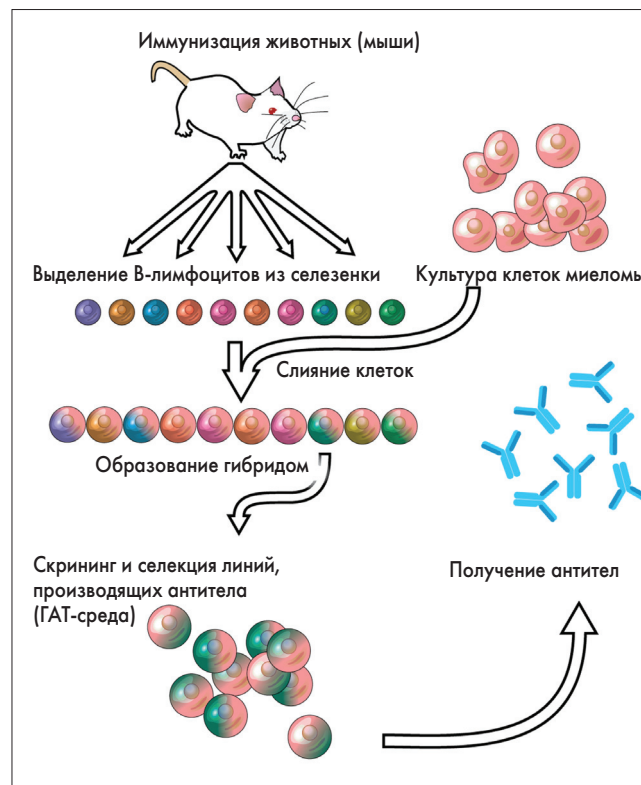


Рис. Гибридная технология

МКАТ также используют в современных подходах к дифференциальной и уточненной диагностике злокачественных новообразований на клеточном и тканевом уровнях. В частности, таким образом выявляют гистогенетические маркеры, опухольассоциированные антигены и маркеры пролиферирующих клеток. Понимание значимости решения этих проблем послужило основанием для проведения в ИЭПОР целенаправленной работы по комплектации наборов МКАТ.

Для повышения конкурентной способности МКАТ украинского производства с аналогичной импортруемой продукцией, которая сегодня доминирует на рынке, а также обеспечения ими научно-исследовательских и медицинских лабораторий Украины были созданы наборы МКАТ, предназначенные для:

- дифференциальной диагностики опухолей различного гистогенеза, включающие МКАТ, которые выявляют антигены CD45, CD56, CD66e, панцитокератин, кератин 18, CD227/MUC1, CD326/ErCAM, p53, антиген пролиферирующих клеток IPO-38;

- дифференциальной диагностики лейкозов и лимфом, включающие МКАТ, которые выявляют CD3, CD5, CD7, CD10, CD15, CD13, CD16, CD19, CD20, CD22, CD34, CD37, CD38, CD43, CD45, CD56, HLA-DR, легкие цепи иммуноглобулинов и антиген пролиферирующих клеток IPO-38;

- оценки иммунологического статуса человека, включающие МКАТ, которые выявляют антигены Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD27), В-лимфоцитов (CD19, CD20, CD22, CD37), NK-клеток (CD16, CD56);

- определения активированных лимфоцитов, содержащих МКАТ, которые выявляют антигены CD25, CD48, CD54, CD95, CD150, HLA-DR.

- мониторинга клинических проявлений и лечения ВИЧ-инфицированных больных с использованием МКАТ к антигенам CD3, CD4 и CD45.

Значимым аспектом использования МКАТ (в том числе разработанных в ИЭПОР) является исследование опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной тканей. Для проведения уточненной диагностики отдельных нозологических форм и цитологических вариантов лейкозов и лимфом, на базе отдела иммуноцитохимии и онкогематологии ИЭПОР была создана Референтная лаборатория (заведующий профессор

Д.Ф. Глузман, ведущий научный сотрудник доктор медицинских наук Л.М. Склярченко). При проведении диагностики в лаборатории руководствуются современной классификацией ВОЗ 2008 года. Данная классификация основывается на анализе клинико-гематологических данных, использовании морфологических и цитохимических методов исследования клеток периферической крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов, иммунофенотипировании с применением МКАТ к линейно-специфическим и дифференцированным антигенам гемопоэтических стволовых клеток кроветворных клеток-предшественников, а также различных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов.

Сотрудники Референтной лаборатории ежегодно проводят современные диагностические исследования у больных разными формами злокачественных заболеваний системы крови, среди которых миелоидные новообразования, миелодиспластические/миелолипролиферативные новообразования, острые лейкозы миелоидного, лимфоидного и неопределенного происхождения, неходжкинские лимфомы из В-, Т- и NK-клеток, ассоциированные с иммунодефицитом лимфопролиферативные заболевания, опухоли из гистиоцитов и дендритных клеток. Ежегодно в сотрудничестве с клиницистами-гематологами обследуется 2,5-3 тыс. пациентов из г. Киева и 20 областей Украины.

С целью внедрения современных иммуноцитохимических методов диагностики гемобластозов с использованием МКАТ проводятся научно-методические семинары, круглые столы, выступления с докладами для практических врачей. Сотрудники ИЭПОР являются авторами ряда монографий и научных пособий, среди которых наиболее известны «Диагностическая иммуноцитохимия опухолей» (2003), «Иммуноцитохимическая диагностика опухолей кроветворной и лимфоидной тканей у детей» (2005) и «Диагностическая онкогематология» (2011).

Сегодня с целью оптимизации лечения онкологических больных в схемы лечения включаются современные терапевтические средства, содержащие МКАТ. Такие препараты способны взаимодействовать с различными антигенами-мишенями, которые присутствуют на клетках. Использование МКАТ в терапии опухолей позволяет добиться уничтожения опухолевых клеток с помощью иммунологических реакций, обеспечить транспорт

противоопухолевых агентов в злокачественно трансформированные клетки, а также модификацию сигнальных систем опухолевых клеток — и в итоге повлиять на пролиферацию, рост, дифференцировку и жизнеспособность этих клеток. В настоящее время на основе МКАТ, одобренных для лечения онкологических больных, созданы препараты для лечения больных В-клеточными неходжкинскими лимфомами и раком грудной железы, которые позволили существенно повлиять на исходы заболевания. Серьезными преимуществами использования этих препаратов является селективное связывание с опухолевыми клетками и отсутствие значимой системной токсичности. Сотрудники ИЭПОР также имеют опыт проведения экспериментальных исследований по оценке терапевтической эффективности препаратов на основе МКАТ.

Помимо онкологической практики, препараты на основе МКАТ сегодня применяются при воспалительных реакциях различного генеза, системном склерозе, идиопатическом фиброзе легких, гепатите В, СПИДе, ревматоидном артрите, системной красной волчанке, аллергических реакциях, мышечной дистрофии, болезнях Альцгеймера, астме, диабете и других заболеваниях.

Сегодня МКАТ, которые создаются на базе ИЭПОР, используются в ряде клинико-диагностических лабораторий и научных институтов Украины. Эта разработка входит в цикл научных работ «Моноклональные и рекомбинантные антитела для экспериментальной биологии, медицины и ветеринарии» (авторы Э.В. Луговской, Д.В. Колибо, И.М. Колесникова, А.С. Олейник, А.П. Костюченко, Д.Ф. Глузман, С.П. Сидоренко, Л.М. Склярченко, Л.М. Шлапацкая) и представлена на соискание Государственной премии Украины в области науки и техники 2014 года.

Подготовила Катерина Котенко



НОВОСТИ

Перспективы в лечении рака шейки матки

14 августа 2014 г. Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США (U.S.FDA) одобрило новое показание для применения таргетного препарата Авастин® (бевацизумаб) для лечения пациенток с персистирующим, рецидивировавшим или метастатическим раком шейки матки (РШМ)*.

Наиболее распространенной причиной РШМ является вирус папилломы человека (ВПЧ), который распространяется через сексуальный контакт и провоцирует канцерогенез. Несмотря на наличие двух лицензированных вакцин для профилактики многих типов ВПЧ, которые могут вызвать рак шейки матки, по предварительной оценке Национального института рака США, в 2014 г. РШМ будет диагностирован у 12,360 американских женщин, и 4,020 из них умрут от этого заболевания.

Бевацизумаб воздействует на рост кровеносных сосудов, которые способствуют развитию клеток рака. Новое показание, касающееся РШМ, предполагает использование бевацизумаба в комбинации с химиотерапевтическими препаратами: комбинацией паклитаксела и цисплатина либо в сочетании с паклитакселом и топотеканом**.

«Авастин® является первым, начиная с 2006 года, препаратом, одобренным для лечения пациентов с поздними стадиями РШМ в сочетании с химиотерапией, — отметил доктор Richard Pazdur, директор отделения гематологической и онкологической продукции в Центре оценки и исследования лекарственных средств (Center for Drug Evaluation and Research) FDA. — Кроме того, это первый биологический препарат, одобренный для лечения пациенток с поздними стадиями РШМ и утвержденный менее чем за четыре месяца в рамках программы приоритетного рассмотрения FDA, что демонстрирует политику агентства в отношении того, чтобы перспективные методы лечения становились доступны пациентам как можно быстрее».

FDA рассмотрело Авастин® в рамках программы приоритетного рассмотрения, поскольку препарат продемонстрировал потенциал, обеспечивающий значительные преимущества относительно безопасности и эффективности по сравнению с доступным лечением серьезного заболевания. Статус

приоритетного рассмотрения обеспечивает оперативное рассмотрение FDA лекарственного применения.

Безопасность и эффективность бевацизумаба были оценены в клиническом исследовании, в котором приняли участие 452 больных с персистирующим, рецидивировавшим или метастатическим РШМ. Участницы были рандомизированы в группы, получавшие комбинацию паклитаксела и цисплатина либо комбинацию паклитаксела и топотекана, соответственно с добавлением бевацизумаба или без него.

Результаты исследования показали увеличение общей выживаемости до 16,8 мес у женщин, получавших химиотерапию в комбинации с бевацизумабом, по сравнению с 12,9 мес для пациенток, получавших только химиотерапию.

Наиболее частыми побочными эффектами, связанными с применением бевацизумаба у больных РШМ являются быстрая утомляемость, снижение аппетита, гипертония, повышение уровня глюкозы в крови, гипомagnesемия, инфекции мочевыводящих путей, головная боль и снижение веса. Перфорации желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечные и вагинальные фистулы также наблюдали при лечении данным препаратом.

Для справки

По данным Национального канцер-регистра, в 2011 г. в Украине зарегистрировано 5344 случая заболевания РШМ, а общее количество умерших вследствие РШМ составило 2194. Благодаря профосмотрам выявлено почти половину случаев РШМ. Чаще всего (82% случаев) заболевание удалось обнаружить на ранней стадии, но в 15% случаев обнаруживали РШМ III-IV стадии. В структуре заболеваемости населения Украины РШМ занимает 5-е место среди 10 основных злокачественных заболеваний и 4-е место среди всех злокачественных опухолей женского населения, причем большинство пациенток с РШМ составляют женщины в возрасте 30-54 лет. Каждая седьмая женщина с РШМ не прожила 1 года с момента установления диагноза.

Источник: www.fda.gov

Перевод с англ. и адаптация Катерины Котенко

*Заявка в FDA была подана компанией-производителем 24 апреля 2014 г. и основана на результатах исследования III фазы GOG-0240, представленных на ежегодной встрече Американского общества клинической онкологии ASCO в 2013 г. и опубликованных в New England Journal of Medicine в феврале 2014 г. (Tewari K.S., Sill M.W., Long H.J. et al. N Engl J Med. 2014; 370: 734-743).

**В Украине зарегистрированными показаниями для медицинского применения препарата Авастин® являются: метастазирующий колоректальный рак, метастазирующий рак молочной железы, распространенный неоперабельный, метастазирующий или рецидивирующий немелкоклеточный рак легкого, распространенный и/или метастазирующий почечно-клеточный рак, распространенный эпителиальный рак яичника, фаллопиевой трубы и первичный рак брюшины.