Клиническая онкогематология. 2016;9(3):237–44
ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

Clinical oncohematology. 2016;9(3):237–44
ONCO clinical HEMATOLOGY

ОБЗОРЫ

REVIEWS

Моноклональные антитела: от создания до клинического применения

Ю.И. Будчанов

ГБОУ ВПО «Тверской медицинский университет», ул. Советская, д. 4, Тверь, Российская Федерация, 170000

РЕФЕРАТ

Создание моноклональных антител (МКА) привело к революционным достижениям в диагностике и лечении онкогематологических заболеваний. В обзоре рассматриваются история создания, новые улучшенные технологии получения моноклональных антител на примере анти-CD20-МКА, распознающих различные эпитопы антигена CD20 и обладающих повышенной противоопухолевой активностью. Инженерные модификации должны помочь понять эффекторные механизмы использования новых анти-CD20-МКА и направлены на дальнейшее улучшение результатов лечения.

Ключевые слова: моноклональные антитела, ритуксимаб, офатумумаб, обинутузумаб, гибридомная технология.

Получено: 13 января 2016 г.
Принято в печать: 17 марта 2016 г.

Для переписки: Юрий Иванович Будчанов, 1-й пер. Красной Слободы, д. 3, Тверь, Российская Федерация, 170001; e-mail: budjur@mail.ru

Для цитирования: Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела: от создания до клинического применения. Клиническая онкогематология. 2016;9(3):237–44.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244

Monoclonal Antibodies: from Development to Clinical Application

Yul Budchanov

Tver' Medical University, 4 Sovetskaya str., Tver', Russian Federation, 170000

ABSTRACT

The development of monoclonal antibodies (MABs) resulted in revolutionary achievements in diagnosing and treating of oncohematological disorders. The review dwells on the history of the development and improved technologies for production of monoclonal antibodies illustrated by anti-CD20-MABs which recognize different epitopes of the CD20 antigens and have a higher antitumor activity. Engineering techniques can contribute to understanding the effector mechanisms of the application of the novel anti-CD20-MABs and are intended for further improvement of the treatment results.

Keywords: monoclonal antibodies, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, hybridoma technology.

Received: January 13, 2016
Accepted: March 17, 2016

For correspondence: Yurii Ivanovich Budchanov, 3 1st per. Krasnoi Slobody, Tver', Russian Federation, 170001; e-mail: budjur@mail.ru

For citation: Budchanov Yul. Monoclonal Antibodies: from Development to Clinical Application. Clinical oncohematology. 2016;9(3):237–44 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244

ВВЕДЕНИЕ

Получение антител для нужд человека начинается с иммунизации животных. После нескольких инъекций антигена в присутствии стимуляторов иммунного ответа в сыворотке накапливаются специфические антитела. Такие сыворотки называются иммунными. Антитела выделяют в виде γ-глобулиновой фракции путем осаждения их из сыворотки сульфатом аммония, спиртом, ПЭГ (полиэтиленгликолем) и другими веществами. Самое главное, что полученные таким образом антитела содержат много молекул с различной специфичностью, т. е. имеющих сродство ко многим антигенным детерминантам. Иными словами, антитела направлены как против антигена, которым проводилась иммунизация, так и других антигенов, с которыми встречалось животное-донор.

С помощью иммунных сывороток получить стандартные препараты антител очень сложно или практически невозможно, поскольку их состав зависит от вида животного, его индивидуальных особенностей, цикла иммунизации и других мало контролируемых факторов. В то же время для современного иммунохимического анализа и клинического применения чрезвычайно важное значение имеет специфичность и стандартизованность

применяемых антител. Это может быть достигнуто получением абсолютно идентичных антител, что невозможно сделать с помощью иммунных сывороток.

КЛАССИЧЕСКИЕ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Решение проблемы было предложено в 1975 г. учеными Георгом Кёлером и Цезарем Мильштейном (рис. 1). Они разработали методику получения клеточных гибридов — гибридом. Гибридомы (гибридные опухолевые клетки) образуются в результате слияния лимфоцитов, полученных от иммунизированных животных, с клетками множественной миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*.

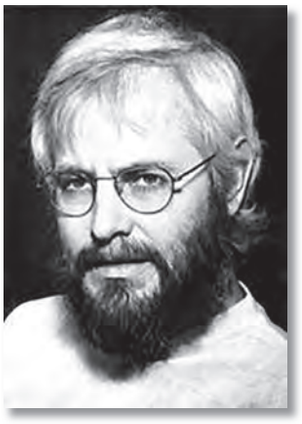
Необходимо отметить, что В-лимфоциты могут жить только в организме хозяина, а в искусственной питательной среде они быстро погибают. Длительное культивирование В-лимфоцитов вне организма невозможно. Наоборот, клетки плазмоцитарной опухоли (плазмоцитомы или множественной миеломы) хорошо культивируются и размножаются *in vitro* и их называют «бессмертными».

В 1970-е годы немецкий иммунолог Георг Кёлер изучал генетическую изменчивость антител. Для исследования было необходимо изолировать клон антителообразующих клеток (АОК) — плазмоцитов (производных В-лимфоцитов). С целью реализовать проект Г. Кёлер прибыл в Англию, в лабораторию Ц. Мильштейна, изучавшего клоны плазмоцитом, и они вместе разработали оригинальный подход к решению этой проблемы.

Ученые решили получить соматический гибрид нормальной антителопродуцирующей и опухолевой клеток. В случае успеха такой гибрид унаследовал бы от нормальной В-клетки способность к синтезу антител, а от опухолевой — «бессмертие» и способность к неограниченному и бесконтрольному росту. Это им удалось осуществить путем создания гибридомной технологии [1].

Принципиальная схема получения моноклональных антител. Мышей интенсивно иммунизировали определенным антигеном — белком, бактериальными клетками или клетками животного происхождения. Когда в их крови появлялись антитела, у них удаляли селезенку, из которой готовили взвесь клеток (с большим содержанием В-лимфоцитов).

Цезарь Мильштейн (Cesar Milstein)



Георг Кёлер (George Kohler)

Рис. 1. Цезарь Мильштейн (Cesar Milstein) и Георг Кёлер (George Kohler)

Fig. 1. Cesar Milstein and George Kohler

Если к суспензии В-лимфоцитов, полученных из селезенки иммунизированных животных, добавить клетки плазмоцитомы и ПЭГ, то после инкубации, требующейся для слияния клеток, в системе находились следующие клеточные элементы:

- гибриды АОК и АОК (В-лимфоцитов и В-лимфоцитов);
- гибриды АОК и клеток плазмоцитомы, оставшиеся свободными (не слившимися);
- АОК и клетки плазмоцитомы.

Проблема заключалась в том, как отделить заданную гибридому от присутствующих в системе отдельных несливших клеток и от гибридов иной специфичности.

Для достижения этой цели авторы разработали специальную схему с отбором клеток в селективной питательной среде, т. е. в среде, с помощью которой можно выделять желаемый клон клеток.

Метаболическая селекция гибридов основана на том, что нормальные соматические клетки (В-лимфоциты) могут использовать два метаболических пути синтеза нуклеотидов (пуринов и пиримидинов): основной и резервный.

При ***основном пути*** синтез нуклеотидов *de novo* осуществляется из аминокислот и углеводных предшественников, а при ***резервном*** — из гипоксантина (пурины) или дезокситимидина (пиримидины).

Если по каким-либо причинам основной метаболический путь синтеза нуклеотидов блокируется (например, аминоптерином), то в нормальных клетках используется резервный путь синтеза нуклеотидов. В такой ситуации включаются в работу ферменты гипоксантин-гуанидинфосфорибозилтрансфераза (Г/ГФРТ) и тимидинкиназа, что обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути.

Для гибридизации с В-лимфоцитами были отобраны только мутантные клетки миеломы, у которых не синтезируется Г/ГФРТ, т. е. у них имелся только основной путь синтеза нуклеотидов.

Мутантные клетки миеломы способны синтезировать нуклеотиды только по основному метаболическому пути.

Если в среду для культивирования внести вещество, блокирующее основной путь синтеза нуклеотидов в клетке, — аминоптерин, то в данной среде миеломные клетки, у которых отсутствует Г/ГФРТ, не способны обеспечить синтез нуклеиновых кислот и погибают.

Мутантные клетки гибридомы лишены резервного пути синтеза нуклеотидов, и в среде с гипоксантином они погибают.

Задача селекции сводится к отделению гибридом от миеломных неслившихся клеток. Для решения этой задачи используют селективную среду ГАТ (культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). В такой среде, содержащей аминоптерин, блокируется основной путь синтеза нуклеотидов, а наличие гипоксантина и тимидина обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути. В этих условиях миеломные клетки погибают и функционально активными остаются только гибридомы.

В-лимфоциты не адаптированы к росту *in vitro*, они достаточно быстро разрушаются, что облегчает процесс селекции.

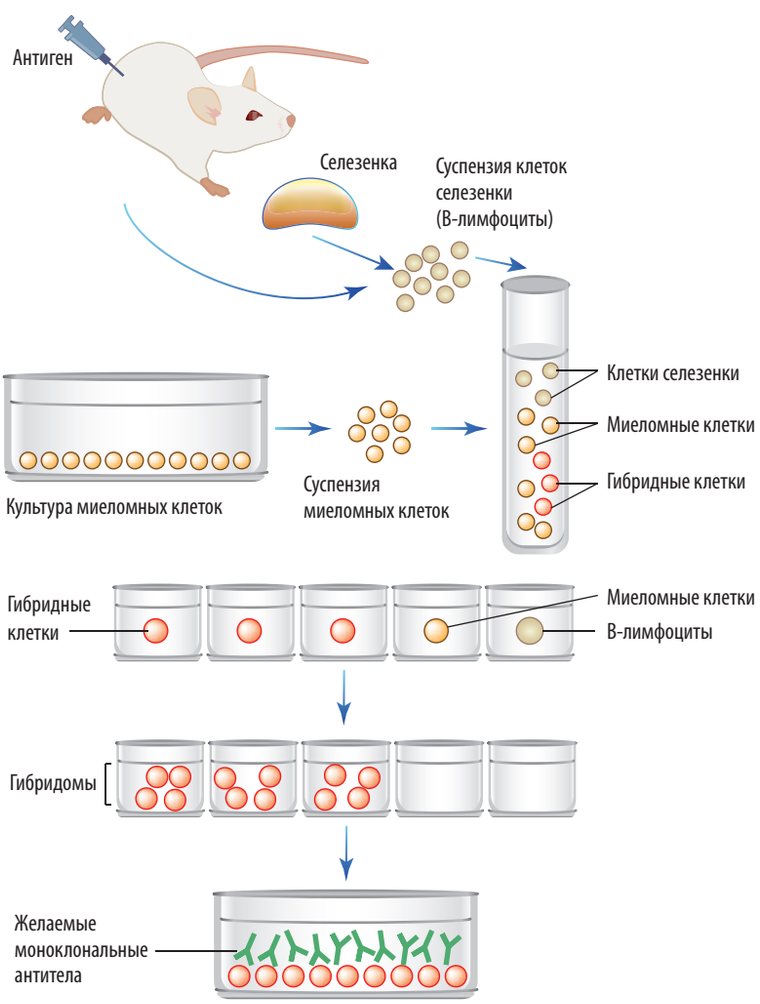
Таким образом, мышей иммунизировали определенным антигеном — белком. После выявления антител в крови из селезенки иммунизированных животных готовили взвесь клеток с большим содержанием В-лимфоцитов. В системе *in vitro* слияние соматических клеток было осуществлено с помощью ПЭГ, а отбор желаемого клона гибридных клеток выполнялся с использованием селективной питательной среды ГАТ, где гибридомы способны непрерывно расти в культуре и продуцировать антитела. Выбранные гибридомы затем культивируют для получения больших количеств моноклональных антител (МКА), не содержащих посторонних антител и настолько однородных, что могут рассматриваться как чистые химические реагенты. Следует отметить, что антитела, продуцируемые одной культурой гибридом, связываются только с одной антигенной детерминантой (эпитопом). В связи с этим к антигену с несколькими эпитопами можно получить столько МКА, сколько имеется антигенных детерминант, и можно отобрать клоны, продуцирующие антитела только одной нужной специфичности [2].

Для получения больших объемов жидкости, содержащей МКА, гибридомы могут быть введены внутрибрюшинно мышам-реципиентам. В результате в брюшной полости размножаются гибридомы и накапливается асцитическая жидкость, являющаяся источником большого количества МКА. В последние годы гибридомы размножают в аппаратах, приспособленных для выращивания культур клеток (рис. 2).

Таким образом, в отличие от поликлональных гетерогенных сывороток, содержащих большое разнообразие антител, которые отличаются своей специфичностью, аффинитетом и физико-химическими свойствами, препараты МКА содержат продукт единственного клона плазматических клеток, направленного к строго определенной антигенной детерминанте и обладающего всегда одинаковыми физико-химическими характеристиками и сродством к антигену.

Разработка технологии получения гибридом имела революционное значение в иммунологии, молекулярной биологии и медицине и позволила создать совершенно новые научные направления. Благодаря гибридомам возникли новые методы диагностики многих заболеваний и открылись новые пути для изучения злокачественных опухолей и многих других заболеваний. Ученые, разработавшие технологию получения МКА, в 1984 г. стали лауреатами Нобелевской премии.

Таким образом, клоны — продуценты МКА (гибридомы) получают слиянием антителообразующих клеток лимфоидной ткани иммунизированного животного и клеток плазмоцитомы. Полученные в результате клетки наследуют от В-лимфоцитов способность к синтезу специфических антител, а от клеток миеломы — спо-



Мыши вводят специфический антиген, который вызывает продукцию антител против этого антигена.

Селезенку мышей удаляют и гомогенизируют для получения суспензии клеток. Эта суспензия содержит В-клетки, которые продуцируют антитела против введенного антигена.

Клетки селезенки затем смешивают с клетками миеломы, которые способны непрерывно расти в культуре, в них также отсутствует резервный путь синтеза нуклеотидов. Некоторые антителопродуцирующие клетки селезенки и клетки миеломы сливаются, образуя гибридные клетки. Эти гибридные клетки теперь способны непрерывно расти в культуре и продуцировать антитела.

Смесь клеток помещают в селективную среду, которая позволяет расти только гибридным клеткам. Погибают неслившиеся миеломные клетки и В-лимфоциты.

Гибридные клетки пролиферируют, образуя клон гибридом. Гибридомы проверяют на продукцию нужных антител.

Выбранные гибридомы затем культивируют для получения больших количеств моноклональных антител.

Рис. 2. Основные этапы получения гибридомы

Fig. 2. Key steps of obtaining hybridoma

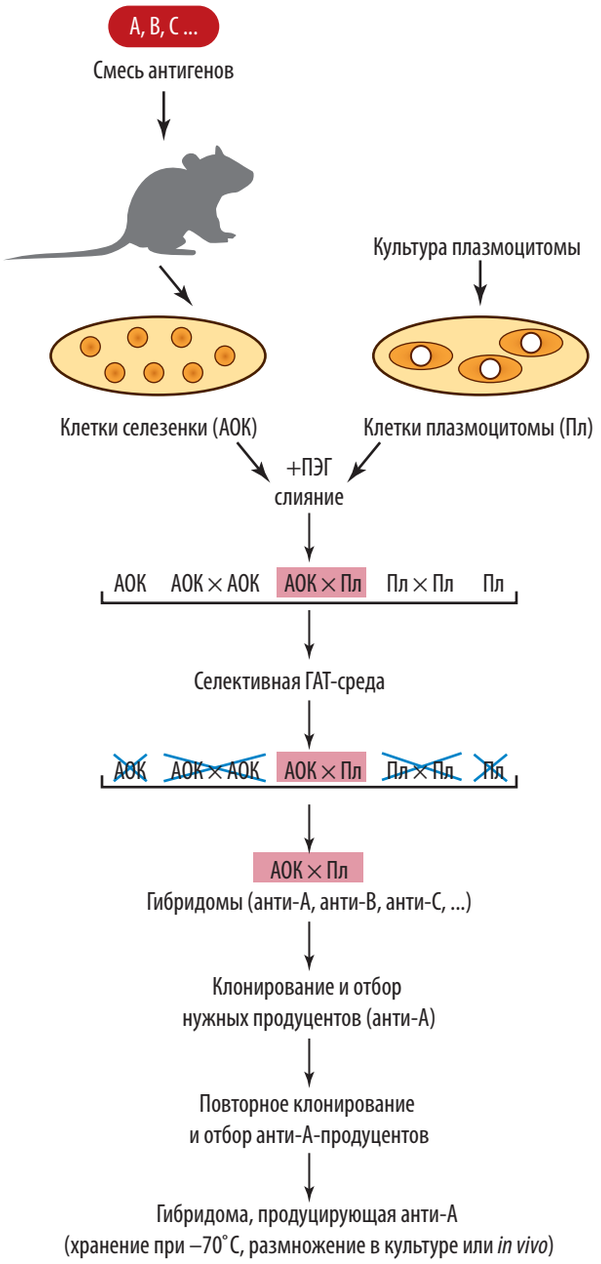


Рис. 3. Схема получения гибридом (Г.И. Абелев, 1998): А, В, С — многокомпонентная смесь антигенов, использованная для иммунизации (или сложные антигены со множеством антигенных детерминант); анти-А, анти-В, анти-С — моноклональные антитела соответственно к А-, В-, С-антигенам (или антигенным детерминантам); АОК — антителообразующие клетки селезенки; ГАТ — среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин, тимидин; Пл — клетки плазмоцитомы, не растущие в селективной ГАТ-среде; ПЭГ — полиэтиленгликоль.

Fig. 3. Diagram of obtaining hybridomas (GI Abelev, 1998): A, B, C — a multicomponent mixture of antigens used for immunization (or complex antigens with numerous epitopes); anti-A, anti-B, and anti-C — monoclonal antibodies against A-, B-, and C-antigens (or epitopes), respectively; АОК — antibody-forming splenic cells; ГАТ — hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium; Пл — plasmacytoma cells which do not grow in the selective HAT-medium; ПЭГ — polyethylene glycol.

собность к неограниченному росту *in vitro* и продукции иммуноглобулинов.

В 1998 г. Г.И. Абелевым также опубликована схема получения моноклональных антител (рис. 3).

После недолгого культивирования одиночные АОК, а также гибриды АОК и АОК погибали, т. к. нормальные В-лимфоциты (АОК) смертны (быстро погибают) в культуре. Они не способны длительно культивироваться.

Клетки плазмоцитомы и их гибриды также погибали, т. к. аминоптерин блокировал основной путь синтеза предшественников нуклеиновых кислот, а гипоксантин и тимидин их не спасали. Следовательно, выживали только гибриды АОК и плазматических клеток, т. к. бессмертие они унаследовали от плазмоцитомы, а резервный путь — от нормальной В-клетки. Такие гибриды (гибридомы) сохраняли способность синтезировать и секретировать антитела, а также пролиферировать.

Следующий этап после получения гибридом — клонирование и отбор нужных клонов. Выжившие в ГАТ клетки рассевали в пластиковые планшеты. В каждую лунку помещали в среднем по 10 гибридомных клеток. После нескольких дней культивирования содержимое каждой лунки проверяли на присутствие антител нужной специфичности. Клетки из лунок, содержащих нужные антитела, клонировали, т. е. повторно рассевали по лункам, но из расчета 1 клетка на лунку, вновь культивировали и проверяли на присутствие нужных антител. Процедуру повторяли 1–2 раза. Таким образом, отбирали клоны, продуцирующие антитела только одной нужной специфичности, т. е. **моноклональные антитела**.

Гибридомы сыграли и продолжают играть огромную роль в фундаментальной и прикладной иммунологии.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА В ДИАГНОСТИКЕ

МКА в силу своей высокой специфичности, стандартности и технологичности оказались исключительно удобным и широко применяемым в настоящее время диагностическим средством. С их помощью определяют маркеры клеточных популяций (фенотипирование клеток крови, в частности лимфоцитов), опухолевые маркеры, гормоны, медиаторы, любые молекулы, обладающие антигенностью.

Именно применение МКА в диагностике позволило значительно увеличить специфичность и чувствительность тест-систем, основанных на реакции антиген-антитело. Так, даже в простой реакции агглютинации МКА (цоликлоны анти-А, анти-В и анти-D) применяют для определения агглютиногенов эритроцитов человека системы АВ0 и резуса (рис. 4). Они обладают высокой стандартностью и чувствительностью, характеризуются быстротой наступления и четкостью агглютинации. За счет своего качества реагенты обеспечивают достоверный результат даже при слабой экспрессии антигенов. Методика определения группы крови с помощью цоликлонов позволяет отказаться от услуг доноров, кровь которых используют для приготовления изогемагглютинирующих сывороток. Главное, что цоликлоны применяются для типирования эритроцитов всех специфичностей, включая редкие [3, 4].

Необходимо также отметить, что иммуноферментный анализ, реакция иммунофлюоресценции, методы проточной цитометрии, иммунохроматографии, радиоиммунный анализ благодаря использованию МКА стали рутинными. Так, с помощью иммуноферментного анализа появилась возможность обнаруживать в крови и других биологических жидкостях опухолеспецифические или

Рис. 4. Цоликлоны анти-A, анти-B и анти-D

Fig. 4. Colyclons anti-A, anti-B, and anti-D

опухолеассоциированные маркеры при злокачественных новообразованиях. Исследование иммунофенотипа клеток методом проточной цитометрии способствовало разделению субпопуляций лимфоцитов в иммунологии, особенно в тех случаях, когда морфологически разграничить их невозможно.

Чрезвычайно важным стало использование иммунофенотипирования в онкогематологии. Иммунофенотипирование позволяет определить с помощью МКА наличие или отсутствие антигенов (маркеров) — кластеров дифференцировки (CD — cluster of differentiation) лимфоцитов, гранулоцитов и бластных клеток по представленным на клеточных мембранах молекулам-маркерам. Показано, что каждые направление и этап дифференцировки клеток крови сопровождаются синтезом определенных структурных и регуляторных молекул, которые экспрессируются и могут быть обнаружены с помощью МКА на мембране, в цитоплазме или ядре клетки, в мазках и срезах, приготовленных из опухолевой ткани. Выделение подклассов стволовых гемопоэтических клеток и классификация острых лейкозов/лимфом, стадирование лимфоидных опухолей, оценка ответа на лечение, установление рецидива или констатация прогрессирования в настоящее время основываются на результатах иммунофенотипирования [5].

Проточная цитометрия с использованием наиболее информативных комбинаций МКА и флюорохромных конъюгатов (многоцветное иммунофенотипирование) позволило многосторонне изучать не только бластную популяцию, но и остаточные лимфоциты и гранулоциты с точки зрения их иммунофенотипических особенностей при различных опухолях системы крови [6–8].

ЛЕЧЕБНЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Впервые гибридомы были получены на основе В-лимфоцитов мыши, и поэтому МКА по своей природе были мышиные. Этим обусловлено первостепенное их использование в лабораторной практике. Применение МКА с лечебной целью было ограничено. Их введение человеку сопровождалось иммунным ответом на чужой (гетерогенный) мышиный белок.

Однако вскоре был разработан подход, значительно уменьшивший их иммуногенность при введении человеку и увеличивший лечебные возможности МКА. С помощью технологии рекомбинантных ДНК константные домены мышиных антител были заменены на соответствующие константные области иммуноглобулинов человека, и только вариабельные домены остались мышиными. Полученные таким способом МКА принято называть химерными. Химерные МКА в своей структуре имеют более 65 % иммуноглобулина человека. Поскольку большая часть антигенных детерминант иммуноглобулинов находится в их константных доменах и с ними же связаны основные эффекторные функции (взаимодействие с Fc-рецепторами, системой комплемента), иммуногенность химерных иммуноглобулинов мышь/человек значительно снижена. При этом сохраняется специфичность к антигену мышиных Fab-фрагментов и функциональность МКА.

Следующим этапом с помощью трансгенных технологий стало создание гуманизированных МКА, которые на 95 % состоят из иммуноглобулина человека. В молекулах гуманизированных МКА мышиными являются только гипервариабельные участки CDR (complementarity-determining regions — регионы, определяющие комплементарность) — области Fab-фрагментов, которые ответственны за специфическое связывание антитела с антигенной детерминантой. Развитие новых биотехнологий, в частности фагового дисплея, позволило полностью избежать использования мышей для создания полностью человеческих МКА [9]. Такие антитела обладают самой низкой антигенностью (иммуногенностью) при введении человеку.

Таким образом, к настоящему времени получены мышиные, химерные, гуманизированные и полностью человеческие МКА, что находит свое отражение в номенклатуре препаратов МКА (рис. 5).

Названия всех моноклональных антител оканчиваются на «**–mab**» (от **m**onoclonal **a**nti**b**ody). Если антитело получено от мыши, добавляется буква «**o**», и окончание у таких антител «**-omab**». Химерные антитела получили окончание «**-ximab**». Гуманизированные антитела имеют окончание «**-zumab**», полностью человеческие — «**-umab**».

Например, trastu**zumab,** который применяется при раке молочной железы, — это гуманизированное МКА; ritu**ximab**, используемый для лечения В-клеточных лимфом, — химерное МКА.

Производство МКА является наиболее быстро развивающимся сегментом фармацевтической индустрии, составляющим третью часть всех биотехнологических продуктов.

За последние 15 лет более 40 терапевтических МКА были утверждены. Большинство из них — молекулы IgG1. Некоторые причины успеха этого класса иммуноглобулинов обусловлены тем, что они обладают долгим временем полужизни в сыворотке, а также эффекторными функциями их Fc-регионов.

МКА в отличие от традиционных препаратов высокоспецифичны к определенным мишеням — антигенам. Использование МКА в качестве лечебных агентов стало в медицине стратегическим этапом. Он ознаменовался сменой концепции лечения от неспецифической к специфической, прицельной (таргетной) терапии. Строгая специфичность МКА позволяет не только обнаружить, но и разрушить клетки/ткани, несущие искомый антиген.

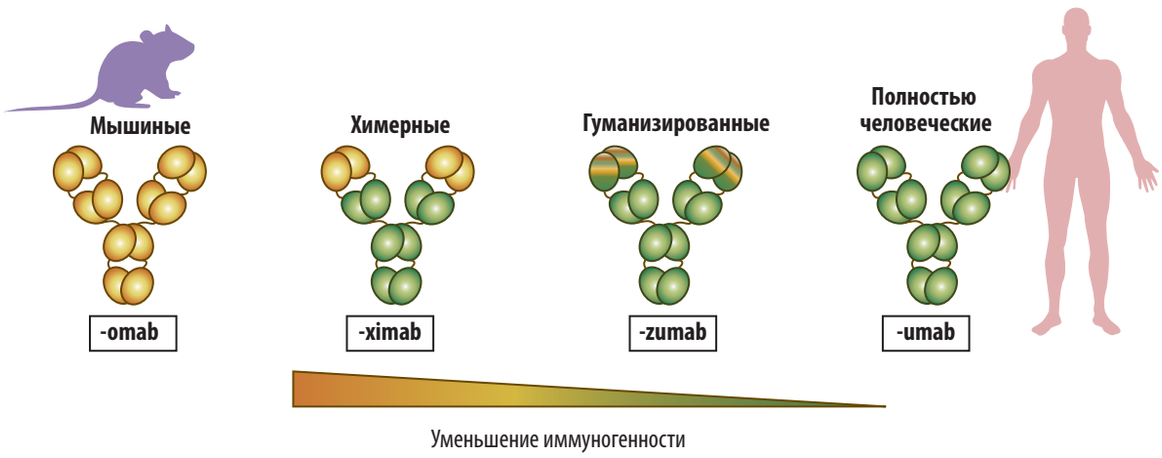


Рис. 5. Типы моноклональных антител и их номенклатура. Окончания названий препаратов моноклональных антител различных типов указаны в рамках

Fig. 5. Types of monoclonal antibodies and their nomenclature. Endings of names of different types of monoclonal antibody products are specified in the boxes

АНТИ-CD20-МКА

Ритуксимаб

Ритуксимаб (Rituximab) представляет собой первое и наиболее изученное к настоящему времени антитело, одобренное Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) еще в 1997 г. Препарат представляет собой химерное МКА мыши/человека, которое специфически связывается с антигеном CD20. Этот антиген — трансмембранный фосфопротеид, экспрессируется на поверхности пре-В-лимфоцитов и зрелых В-лимфоцитов, но отсутствует на стволовых гемопоэтических клетках, нормальных плазматических клетках и клетках других тканей [10, 11]. Это определяет то, что лечение ритуксимабом не влияет на гемопоэтические стволовые и плазматические клетки, т. к. они не имеют антигена CD20 на своей поверхности. Такая избирательность позволяет восстановиться В-лимфоцитам из гемопоэтических предшественников, при этом продолжается продукция иммуноглобулинов плазматическими клетками. Восстановление В-клеток периферической крови, как было показано, происходит примерно через 6–12 мес. после терапии ритуксимабом.

Ритуксимаб, специфически связываясь с антигеном CD20 на В-лимфоцитах, инициирует иммунные реакции, которые вызывают лизис В-клеток. Считается, что механизм действия ритуксимаба связан с развитием антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, комплемент-зависимой цитотоксичности и прямой индукции апоптоза, что вызывает гибель CD20-позитивных клеток лимфомы [12]. Следует отметить, что наряду с этим происходит снижение уровня циркулирующих нормальных В-лимфоцитов CD20+, развивается иммуносупрессия.

Ритуксимаб вызывает гибель клеток-мишеней, он используется в комбинации с полихимиотерапией при В-клеточных иммуноморфологических вариантах неходжкинских лимфом (фолликулярной, диффузной В-крупноклеточной, мантийноклеточной, Беркитта, лимфоплазмоцитарной, лимфоцитарной/ХЛЛ и др.) [13].

Необходимо отметить, что в последние годы препарат применяется для лечения широкого круга аутоиммунных заболеваний с гиперфункцией В-клеток [14]. Уже в 2009 г. H. Gurcan и соавт. [15] отметили использование ритуксимаба в 92 клинических исследованиях с участием 1197 пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Перечисление этих заболеваний указывает на широту использования препарата в лечебной практике: системная красная волчанка, ревматоидный артрит, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, васкулит, связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, болезнь Грейвса, аутоиммунная гемолитическая анемия, пузырчатка обыкновенная, гемофилия А, синдром Шегрена, криоглобулинемия, IgM-опосредованная нефропатия, рассеянный склероз, оптикомиелит (болезнь Девика), дерматомиозит; препарат также используется при реакции «трансплантат против хозяина». К настоящему времени этот список значительно расширен [16–20].

Другой подход предполагает присоединение к молекулам МКА радиоактивных изотопов, цитостатических или токсических веществ, что делает возможным их доставку непосредственно к патологическим В-клеткам и исключает повреждение здоровых тканей. Получается конструкция из структуры, специфичной к опухолевому антигену (МКА), и вещества, способного уничтожить клетку, причем как самой опухоли, так и ее метастазов.

Офатумумаб

Офатумумаб (Ofatumumab, ранее — биопрепарат HuMax-CD20) является полностью человеческим анти-CD20-МКА. Одобрен FDA 17 апреля 2014 г. для лечения хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), не поддающегося терапии флударабином и алемтузумабом. Кроме того, препарат показал свою активность при лечении фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфом [21]. Офатумумаб обладает высокой комплемент-опосредованной цитотоксичностью, относится к МКА I типа, так же как и ритуксимаб. Отличительная особенность офатумумаба — его активный центр. Препарат связывается сразу с двумя внеклеточными петлями. Проводятся исследования по использованию препарата при ревматоидном артрите, рассеянном склерозе и других аутоиммунных заболеваниях.

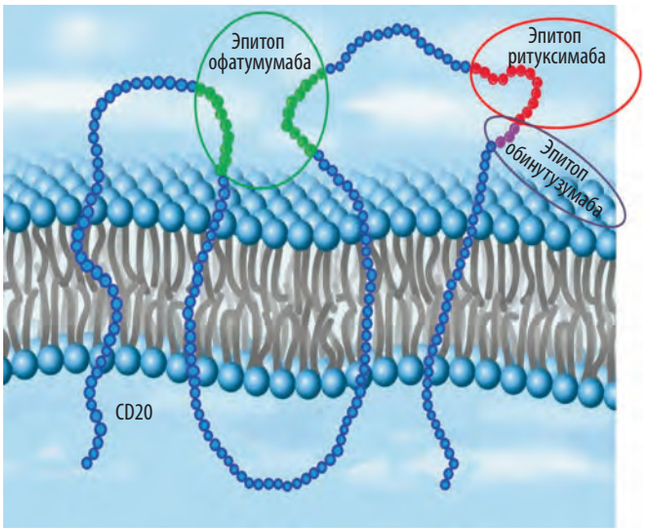


Рис. 6. Структура CD20 и эпитопы, к которым присоединяются ритуксимаб, офатумумаб и обинутузумаб. CD20 имеет 4 трансмембранных участка и 2 внеклеточных петли. Эпитоп, с которым связывается ритуксимаб, окрашен красным цветом; эпитоп связывания офатумумаба находится на 2 петлях, окрашен зеленым цветом; эпитоп связывания обинутузумаба отмечен фиолетовым цветом (цит. по [26])

Fig. 6. The structure of CD20 and epitopes to which rituximab, ofatumumab, and obinutuzumab are attached. CD20 has 4 transmembrane sites and 2 extracellular loops. The epitope to which rituximab is bound is marked with red; the epitope of ofatumumab binding is located in 2 loops and is marked with green; the epitope of obinutuzumab binding is marked with violet (cited according to [26])

Обинутузумаб

Обинутузумаб (Obinutuzumab, ранее — биопрепарат GA101) представляет собой полностью гуманизированное анти-CD20-МКА, которое характеризуется высокой аффинностью и прочно связывается с небольшим участком петли внеклеточного домена CD20, отличающегося от места связывания ритуксимаба. Еще одна особенность этого МКА — гликоинжиниринг Fc-области: изменено гликозилирование путем уменьшения количества фукозы. Все это привело к увеличению цитотоксичности обинутузумаба по сравнению с ритуксимабом. Одобрен FDA в ноябре 2013 г. для лечения ХЛЛ в сочетании с хлорамбуцилом у ранее не получавших терапии больных. Основанием послужило рандомизированное исследование III фазы (CLL11) у первичных пациентов с ХЛЛ CD20+, ранее не получавших лечения. Сравнивались три группы: монотерапия хлорамбуцилом (n = 118), хлорамбуцил + обинутузумаб (n = 333) и ритуксимаб (n = 330). Обинутузумаб вводили внутривенно по 1000 мг в 1, 8 и 15-й дни первого цикла и в 1-й день в течение последующих 6 циклов. Медиана выживаемости без прогрессирования составила 26,7 мес. в группе обинутузумаба + хлорамбуцил. Для сравнения: в группе монотерапии хлорамбуцилом она была 11,1 мес. [22, 23].

Изменение гликозилирования обинутузумаба привело к 100-кратному и более усилению антителозависимой клеточной цитотоксичности, опосредованной взаимодействием Fc-области анти-CD20-МКА и FcγRIIIα на иммунных эффекторных клетках, по сравнению с ритуксимабом и офатумумабом [24]. Обинутузумаб индуцирует прямую гибель клеток, не зависящую от классических путей апоптоза, что также отличает его от ритуксимаба. Однако комплемент-опосредованная цитотоксичность у обинутузумаба снижена. Исследованиями *in vitro* показано, что обинутузумаб может активировать нейтрофилы через FcγRIIIβ (CD16B) и служить лучшим посредником фагоцитоза опухолевых клеток, чем ритуксимаб [25]. Указанные особенности обинутузумаба позволили отнести это МКА к антителам II типа, а ритуксимаб — к антителам I типа (рис. 6) [26].

Обинутузумаб в сочетании с хлорамбуцилом следует рассматривать как новый стандарт лечения у первичных больных ХЛЛ с сопутствующими заболеваниями [27, 28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клинические исследования анти-CD20-МКА продолжаются, равно как и разработка новых препаратов (окрелизумаб — PRO70769, AME-133v — ocaratuzumab, PRO131921). В апреле 2014 г. Министерством здравоохранения Российской Федерации был зарегистрирован первый биоаналог ритуксимаба российского производства [29].

В настоящее время проводятся успешные исследования по получению МКА (включая анти-CD20) с использованием трансгенных тутовых шелкопрядов, что значительно оптимизирует расходы по производству и, как указывают авторы, весьма перспективно [30]. Есть еще один способ менее затратного получения МКА в больших количествах. В 1989 г. была разработана техника сборки функционально активных иммуноглобулинов класса G из легких и тяжелых цепей в растениях табака. В 2014 г. двум заразившимся вирусом Эбола американцам, K. Brantly и N. Writebol, был введен препарат ZMapp, в состав которого входят три гуманизированных МКА, полученных из растений табака — *Nicotiana benthamiana* [31]. Как знать, возможно, в скором будущем появятся теплицы, в которых будет выращиваться трансгенный табак для наработки лечебных МКА.

Создание МКА и их последующая гуманизация привели к революционным достижениям в диагностике и лечении онкогематологических заболеваний. Особое место занимают анти-CD20-МКА, которые показали эффективность в лечении ряда заболеваний, связанных с В-клетками. Новые анти-CD20-МКА, распознающие различные эпитопы антигена CD20, по всей вероятности, позволят улучшить результаты терапии в онкогематологии по сравнению с ритуксимабом.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256(5517):495–7. doi: 10.1038/256495a0.

2. Galfre G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature. 1977;266(5602):550–2. doi: 10.1038/266550a0.

3. Гордеева О.Б., Семикина Е.Л. Современные возможности определения группы крови и резус-принадлежности в педиатрической практике. Вопросы диагностики в педиатрии. 2010;2(4):9–16.

[Gordeeva OB, Semikina EL. Current capabilities of the blood group and Rhesus factor typing in pediatric practice. Voprosy diagnostiki v pediatrii. 2010;2(4):9–16. (In Russ)]

4. Рагимов А.А., Дашкова Н.Г. Трансфузионная иммунология. М.: МИА, 2004. С. 270.

[Ragimov AA, Dashkova NG. Transfuzionnaya immunologiya. (Transfusion immunology.) Moscow: MIA Publ.; 2004. pp. 270. (In Russ)]

5. Freedman A. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management. Am J Hematol. 2014;89(4):429–36. doi: 10.1002/ajh.23674.

6. Preijers FW, Huys E, Moshaver B. OMIP-010: a new 10-color monoclonal antibody panel for polychromatic immunophenotyping of small hematopoietic cell samples. Cytometry A. 2012;81A(6):453–5. doi: 10.1002/cyto.a.22056.

7. Тупицын Н.Н., Гривцова Л.Ю., Купрышина Н.А. Иммунодиагностика опухолей крови на основании многоцветных (8 цветов панелей) европейского консорциума по проточной цитометрии (EURO-FLOW). Иммунология гемопоэза. 2015;13(1):31–62.

[Tupitsyn NN, Grivtsova LYu, Kupryshina NA. Haematopoietic malignancies immune diagnostics based on Euroflow Consortium proposals: 8-color flow cytometry. Immunologiya gemopoeza. 2015;13(1):31–62. (In Russ)]

8. Тупицын Н.Н. Иммунология клеток крови. В кн.: Гематология. Национальное руководство. Под ред. О.А. Рукавицына. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. С. 69–79.

[Tupitsyn NN. Blood cell immunology. In: Rukavitsyn OA, ed. Gematologiya. Natsional'noe rukovodstvo. (Hematology. National guidelines.) Moscow: GEOTAR-Media Publ.; 2015. pp. 69–79. (In Russ)]

9. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. Nat Rev Immunol. 2006;6:343–57. doi: 10.1038/nri1837.

10. Riley JK, Sliwkowski MX. CD20: a gene in search of a function. Semin Oncol. 2000;27(12):17–24.

11. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunol Today. 1994;15(9):450–4. doi: 10.1016/0167-5699(94)90276-3.

12. Renaudineau Y, Devauchelle-Pensec V, Hanrotel C, et al. Monoclonal anti-CD20 antibodies: mechanisms of action and monitoring of biological effects. Joint Bone Spine. 2009;76(5):458–63. doi: 10.1016/j.jbspin.2009.03.010.

13. Martin P, Furman RR, Coleman M, Leonard JP. Phase I to III trials of anti-B cell therapy in non-Hodgkin's lymphoma. Clin Cancer Res. 2007;13(18):5636–42. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1085.

14. St Clair EW. Novel targeted therapies for autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2009;21(6):648–57. doi: 10.1016/j.coi.2009.09.008.

15. Gurcan H, Keskin D, Stern J, et al. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. Int Immunopharmacol. 2009;9(1):10–25. doi: 10.1016/j.intimp.2008.10.004.

16. Castillo-Trivino T, Braithwaite D, Bacchetti P, Waubant E. Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. PLoS One. 2013;8(7):e66308. doi: 10.1371/journal.pone.0066308.

17. Otukesh H, Hoseini R, Rahimzadeh N, Fazel M. Rituximab in the treatment of nephrotic syndrome: a systematic review. Iran J Kidney Dis. 2013;7(4):249–56. doi: 10.13172/2053-0293-1-1-480.

18. Morrison VA. Immunosuppression associated with novel chemotherapy agents and monoclonal antibodies. Clin Infect Dis. 2014;59(5):360–4. doi: 10.1093/cid/ciu592.

19. Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. BMC Med. 2013;11(1):88. doi: 10.1186/1741-7015-11-88.

20. Bhandari PR, Pai VV. Novel applications of Rituximab in dermatological disorders. Indian Dermatol Online J. 2014;5(3):250–9. doi: 10.4103/2229-5178.137766.

21. Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. J Hematol Oncol. 2012;5(1):64. doi: 10.1186/1756-8722-5-64.

22. Rioufol C, Salles G. Obinutuzumab for chronic lymphocytic leukemia. Expert Rev Hematol. 2014;7(5):533–43. doi: 10.1586/17474086.2014.953478.

23. Owen CJ, Stewart DA. Obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: overview and perspective. Ther Adv Hematol. 2015;6(4):161–70. doi: 10.1177/2040620715586528.

24. Shah A. Obinutuzumab: A Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia. Ann Pharmacother. 2014;48(10):1356–61. doi: 10.1177/1060028014543271.

25. Golay J, Da Roit F, Bologna L, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. Blood. 2013;122(20):3482–91. doi: 10.1182/blood-2013-05-504043.

26. Shah A. New developments in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: role of obinutuzumab. Ther Clin Risk Manage. 2015;11:1113–22. doi: 10.2147/TCRM.S71839.

27. Cerquozzi S, Owen C. Clinical role of obinutuzumab in the treatment of naive patients with chronic lymphocytic leukemia. Biol Targ Ther. 2015;9:13–22. doi: 10.2147/BTT.S61600.

28. Seiter K, Mamorska-Dyga A. Obinutuzumab treatment in the elderly patient with chronic lymphocytic leukemia. Clin Interv Aging. 2015;12(10):951–61. doi: 10.2147/cia.s69278.

29. Алексеев С.М., Капланов К.Д., Иванов Р.А., Черняева Е.В. Современный подход к разработке и исследованию биоаналогов на примере первого российского препарата моноклональных антител — Ацеллбия® (ритуксимаб). Исследования и практика в медицине. 2015;2(1):8–12. doi: 10.17709/2409-2231-2015-2-1-8-12.

[Alekseev SM, Kaplanov KD, Ivanov RA, Chernyaeva EV. Current approach to development of biosimilar products containing monoclonal antibodies as an active substance – non-clinical studies of the first Russian rituximab biosimilar, Acellbia®. Research'n Practical Medicine Journal. 2015;2(1):8–12. doi: 10.17709/2409-2231-2015-2-1-8-12. (In Russ)]

30. Tada M, Tatematsu K-I, Ishii-Watabe A, et al. Characterization of anti-CD20 monoclonal antibody produced by transgenic silkworms (Bombyx mori). mAbs. 2015;7(6):1138–50. doi: 10.1080/19420862.2015.1078054.

31. Gonzalez-Gonzalez E, Alvarez MM, Marquez-Ipina AR, et al. Anti-Ebola therapies based on monoclonal antibodies: current state and challenges ahead. Crit Rev Biotechnol. 2015;26:1–16. doi: 10.3109/07388551.2015.1114465.