

УДК 573.6.086.83

Разработка инновационных препаратов моноклональных антител

© 2017 г. А.В. КАРАБЕЛЬСКИЙ*, Т.А. НЕМАНКИН, А.Б. УЛИТИН, А.С. ВАГАНОВ, Е.А. МОСИНА, Р.А. ИВАНОВ

Биотехнологическая компания ЗАО «БИОКАД», Санкт-Петербург, 198515

*e-mail: karabelskij@biocad.ru

Поступила в редакцию 21.06.2016

Принята в печать 01.09.2016

Описаны последние достижения и обсуждаются наиболее перспективные направления в области создания и использования терапевтических препаратов на основе моноклональных антител. В настоящее время наиболее эффективным подходом к получению таких антител является создание библиотек генов иммуноглобулинов с последующей селекцией и скринингом вариантов, обладающих специфичностью к определенным мишеням, а также желаемыми функциональными свойствами. Высокий уровень развития современной молекулярной биологии, использование автоматизированных лабораторных методик и биоинформатических подходов позволяет одновременно вести работу по созданию библиотек генов иммуноглобулинов и их скринингу в отношении множества мишеней, а также разрабатывать инновационные терапевтические препараты, активность которых выше и отличается большей целенаправленностью по сравнению с традиционными лекарственными средствами более широкого спектра действия.

Ключевые слова: моноклональные антитела, фаговый дисплей, рекомбинантные терапевтические белки, гуманизация, высокопроизводительный скрининг.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-10-29

С каждым годом моноклональные антитела (моноАТ) становятся все более популярными в терапии заболеваний различной этиологии. Десятки антител уже активно используются в клинике, сотни находятся на различных стадиях доклинических и клинических исследований. На сегодняшний день антитела составляют приблизительно одну треть от общего количества белков, используемых в терапии различных заболеваний в развитых странах.

Широкое распространение в качестве средства для диагностики и лечения, а также активное изучение связаны с уникальным свойством моноАТ специфично и с высоким сродством взаимодействовать с антигеном.

В данном обзоре приводятся последние достижения и наиболее перспективные направления в области создания и использования терапевтических моноклональных антител.

ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РЫНКА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Антитела – это класс растворимых гликопротеинов, синтезируемых В-лимфоцитами и участвующих в реализации гуморального иммунитета в ответ на присутствие в организме чужеродных веществ.

Список сокращений: ЛП – лекарственный препарат; МНН – международное непатентованное наименование; моноАТ – моноклональные антитела; НИР – научно-исследовательские работы; ПО – программное обеспечение; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТПО – торможение роста опухоли; ADCC (Antibody-Dependant Cell-Mediated Cytotoxicity) – антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность; ADCP (Antibody-Dependant Cell Phagocytosis) – антитело-зависимый клеточный фагоцитоз; CDC (Complement-Dependant Cytotoxicity) – комплемент-зависимая цитотоксичность; CD3, CD20, CD80 – рецепторы на поверхности Т- или В-лимфоцитов; CDRs (Complementary Determining Regions) – регионы антител, определяющие комплементарность антитела; EGFR, HER2 – белковые маркеры онкологических заболеваний; IL – интерлейкин; QTMP (Quality Target Molecule Profile) – целевой профиль качества молекулы; QTPP (Quality Target Product Profile) – целевой профиль качества препарата; VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) – фактор роста эндотелия сосудов; TNF (Tumor Necrosis Factor) – фактор некроза опухолей.

Родоначальником термина «антитело» в начале XX века стал Пауль Эрлих (Paul Ehrlich), который первым предложил идею о так называемой «магической пуле». Он утверждал, что в том случае, если может быть создана молекула, селективно связывающаяся с организмом, вызвавшим заболевание, то и токсин может быть доставлен к этому организму вместе с данной молекулой. Эта идея послужила началом многолетних поисков такой селективной молекулы и впоследствии получила развитие в создании целой индустрии новых лекарственных препаратов – моноАТ.

Терапевтическое применение первых антител началось еще до появления четких научных представлений о них. Так, в 1890-х годах после успешного научного эксперимента Беринга и Китазато (Behring, Kitasato), когда они продемонстрировали защитные свойства сыворотки из крови животных, выживших после дифтерии и столбняка, иммунные сыворотки начали использовать для предотвращения развития инфекционных заболеваний. Применение так называемой пассивной иммунотерапии в широкой врачебной практике получило существенное развитие и привело к созданию целого класса лекарственных препаратов (ЛП) на основе иммуноглобулинов. Однако уже в первой половине XX столетия были определены основные проблемы, связанные с использованием препаратов на основе иммуноглобулинов того времени: высокая иммуногенность (развитие иммунного ответа на вводимый ЛП), поликлональность (препараты, получаемые из сывороток крови, содержали антитела разной специфичности) и как следствие неблагоприятный профиль безопасности и эффективности.

Некоторые из этих проблем были решены благодаря разработке технологии получения антител одинаковой специфичности из одной клетки-предшественника. Так, в 1975 г. Мильштейну и Келеру (Milstein, Köhler) удалось добиться продукции антител к нужному антигену в колонии клеток, полученных от одной гибридомной клетки-продуцента, созданной благодаря слиянию В-лимфоцита с миеломной клеткой [1]. Данный метод позволил устранить недостаток, связанный с поликлональностью антител, и создать, а позже и зарегистрировать в 1986 г препарат муромонаб – первый ЛП на основе моноАТ. Данный препарат обладает иммуносупрессирующим действием за счет средства к CD3-рецептору на поверхности

Т-лимфоцитов и индукции апоптоза CD3-положительных Т-лимфоцитов, а также комплемент-зависимой и антитело-зависимой цитотоксичности по отношению к CD3-положительным Т-лимфоцитам¹.

Муромонаб был одобрен как терапевтическое средство для предотвращения отторжения трансплантатов почки, сердца и печени, но позже был отозван производителем. Одной из причин такого решения была высокая иммуногенность препарата; муромонаб относился к первому поколению моноАТ мышинового типа. В 1988 г. Винтер (Winter) и его команда разработали технологию гуманизации («очеловечивания») моноклональных антител [2], что в дальнейшем позволило синтезировать моноАТ химерного типа и вывести на рынок первые мировые блокбастеры, такие как ритуксимаб и инфликсимаб, применение которых стало новым стандартом терапии целого ряда онкогематологических и аутоиммунных заболеваний.

Дальнейшее развитие биофармацевтических технологий позволило существенно повысить безопасность и эффективность современной терапии антителами. В результате за последние 40 лет моноАТ трансформировались из инструмента научных исследований в высокоэффективные лекарственные препараты для лечения социально значимых и угрожающих жизни заболеваний и получили широкое распространение за рубежом и в России (рис. 1).

На рынках США и Европейского союза в 2015 г. насчитывалось 56 зарегистрированных лекарственных препаратов на основе сложных рекомбинантных белков.

Согласно данным из раздела “Фармакодинамика” в инструкциях к лекарственным препаратам, доступным на сайте Государственного реестра зарегистрированных лекарственных средств, на 01.06.2016 было зарегистрировано 42 препарата моноАТ и слитых белков к 24 терапевтическим мишеням:

TNF.....6	EGFR.....2
CD20.....6	CD80.....2
VEGF.....4	HER2.....4
Другие.....18	

Из них более 75% ЛП официально применяются в терапии онкогематологических и аутоиммунных заболеваний; 33 относятся к категории

¹ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00075>

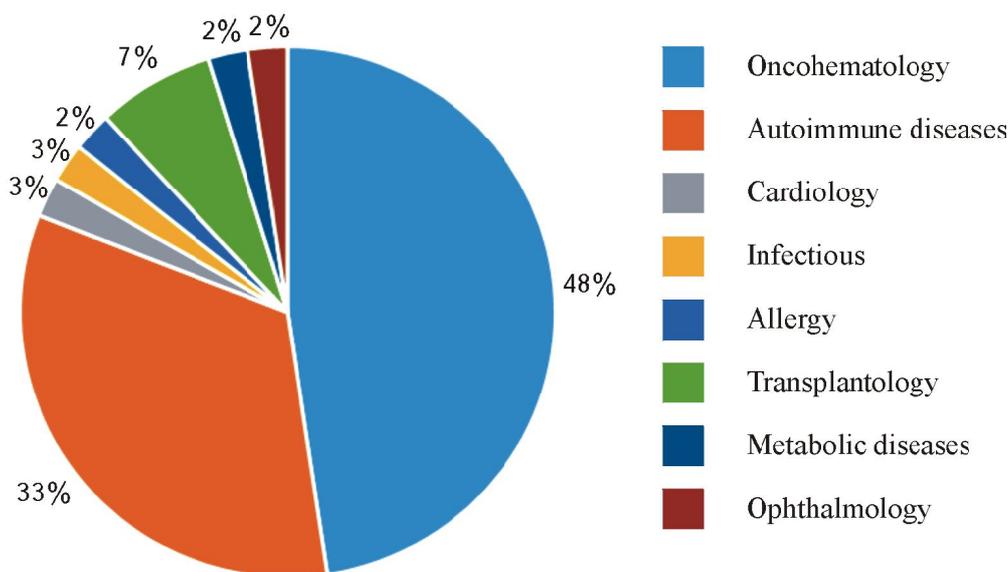


Рис. 1. Область терапевтического применения в РФ моноклональных антител со сложной структурой (по данным Государственного реестра зарегистрированных лекарственных средств на 01.06.2016 г.)

Fig. 1. Fields of therapeutic application of monoclonal antibodies with complex structure in Russia (according to the State Registry of Certified Medicinal Preparations, June 1, 2016)

классических, так называемых «голых» моноАТ (т.е таких, структура которых не отличается от природной, отсутствуют дополнительные домены, химические модификации и т.п.); 4 препарата являются конъюгированными моноАТ; 4 препарата относятся к категории слитых белков; а один препарат принадлежит к биспецифичным (см. далее) моноАТ (катумаксомаб).

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ РАЗРАБОТКИ И ПОИСКА АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ КЛАССАМ МИШЕНЕЙ

Терапевтические рекомбинантные белки, в том числе антитела, синтезируются в клетках-продуцентах, в которые методами генной инженерии внедрены гены, кодирующие целевой белок. В случае антител – это два гена, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела. Для получения стабильной высокопродуктивной клеточной линии необходимо провести длительное исследование, состоящее из нескольких этапов: выбор системы экспрессии интересующего продукта; конструирование ДНК-вектора; внедрение его в клетку-реципиент; отбор высокопродуктивных клонов-продуцентов; оптимизация условий их культивирования; разработка схемы очистки и масштабирование процесса для производства.

Большинство рекомбинантных терапевтических антител на сегодняшний день производится

культурой клеток яичников китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary, *CHO*), обеспечивающей получение биологически активных, должным образом модифицированных, растворимых и стабильных антител [3]. С точки зрения промышленного культивирования, достоинством клеток *CHO* является их способность к суспензионному росту и адаптации при изменении условий культивирования, что позволяет масштабировать процесс в различных объемах и использовать культивирование в биореакторах.

В отличие от процесса разработки биоаналогичных препаратов (см. далее), при создании оригинальных препаратов (типа “next-in-class”, “best-in-class”, “first-in-class”) исследователям неизвестны последовательности генов, которые кодируют белки с нужными свойствами. Стадия поиска соответствующей белковой молекулы становится лимитирующей и плохо поддается прогнозированию. Однако при этом разработчикам может быть известно, какими именно молекулярными, *in vitro*- и *in vivo*-свойствами должен обладать белок, чтобы стать основой нового лекарственного средства. Поэтому до начала экспериментальных работ эти свойства могут быть зафиксированы в сводном документе, который называется целевой профиль качества препарата (Quality Target Product Profile, QTPP) и содержит предварительный набор показателей качества ЛП (включая фармакотерапевтические и фармаколо-

гические характеристики) с учетом безопасности и эффективности.

Более частным случаем может быть QTMP (Quality Target Molecule Profile – целевой профиль качества молекулы). Данный документ является одним из первых при реализации проекта согласно принципам QbD (Quality by Design, «качество через разработку», «спланированное качество»)². В QTTP/QTMP отмечают не только критические параметры структуры молекулы и ее физико-химические свойства, но и требования к специфической активности в модельных системах *in vitro*, а также требования по безопасности, фармакокинетике, фармакодинамике и т.д. в моделях *in vivo*.

Достижение заранее определенных критических параметров молекулы на каждом этапе разработки гарантирует в итоге успешное прохождение клинических исследований и регистрацию нового эффективного лекарственного средства.

Определив целевой профиль качества молекулы в основе будущего лекарственного препарата, разработчики могут выбрать одну из двух технологий. Согласно первой, исторически более зрелой технологии, для поиска оригинальных антител используются так называемые гибридомы, согласно второй, более молодой, – методы дисплея.

Классический метод создания гибридом заключается в слиянии В-лимфоцитов (как правило, выделенных из селезенки мышей после предварительной иммунизации) и миеломных клеток с образованием бессмертных гибридных клеток – гибридом [1, 4]. Из пула гибридом можно отобрать клетки, которые синтезируют антитела нужной специфичности, и получить эти антитела в препаративных количествах в культуре. Антитела, продуцируемые такими клетками, называются моноклональными, т.к. они продуцируются потомками одной единственной исходной клетки – клоном.

Однако это не единственный путь получения нужного антитела: благодаря развитию методов генетической инженерии и знанию последовательности соответствующих генов, можно создать рекомбинантное антитело в подходящей системе экспрессии, например, в суспензионной культуре *CHO*.

Подавляющее большинство зарегистрированных препаратов антител были получены с помощью гибридомной технологии. Однако, несмот-

ря на высокую эффективность *in vitro*, лечение пациентов этими препаратами часто сопровождалось нежелательными побочными эффектами. Некоторые из аминокислотных последовательностей антител воспринимались иммунной системой человека как антигенные детерминанты из-за природной разницы структуры переменных и константных участков антител животных и человека. Проблему иммуногенности таких антител решили методами гуманизации – изменения (или замены) аминокислотной последовательности полипептидов легкой и тяжелой цепей с сохранением биологической активности антитела. Один из первых методов гуманизации заключался в замещении константных регионов антител мыши соответствующими участками антител человека [2]. Полученные таким образом антитела получили наименование химерных, а в название препаратов обязательно входил суффикс “-xi-” (например, rituximab) или “-zu-” (при точечной гуманизации на уровне аминокислот, например, bevacizumab). Сейчас гуманизация – это обязательный этап оптимизации любого антитела, антиген-специфичная последовательность которого была создана иммунной системой животного – мыши, кролика, коровы, ламы и др. [5, 6].

Существуют различные способы повышения эффективности классического гибридомного метода. Например, можно модулировать процесс слияния лимфоцитов и миеломных клеток, что позволяет использовать большую часть исходного репертуара антител, а также применять методы предварительной селекции В-лимфоцитов по способности связываться с нужным антигеном [7]. Для поиска антител к сложным для разработчиков белкам, например, к белкам ионных каналов или интегрированным в мембрану рецепторам (например, CD20 на поверхности В-лимфоцитов – мишень для антитела ритуксимаб), возможна экспрессия в миеломных клетках генов, кодирующих такие белки-мишени.

Существуют подходы, использующие *in vitro*-иммунизацию (сенсбилизацию) наивных В-лимфоцитов [4, 7]. Применение трансгенных животных с внедренным в геном кластером генов иммуноглобулинов человека позволяет получать гибридомным методом полностью человеческие антитела и таким образом решить одну из главных проблем антител животного происхождения –

² ICH Q8 Pharmaceutical Development Workshop: Quality by Design in pharmaceutical development and manufacture. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2009/10/WC500004892.pdf

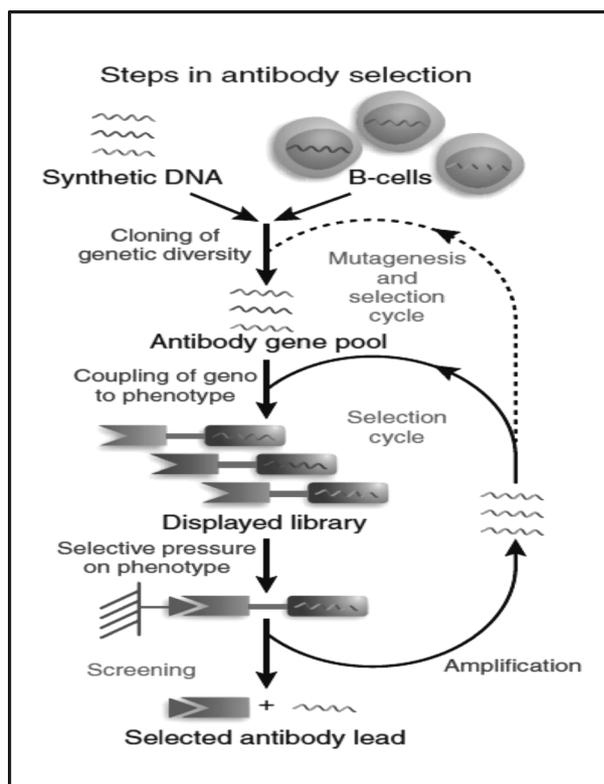


Рис. 2. Общая схема дисплейных методов ([10] с модификациями)

Fig.2. General scheme of display methods ([10] modified)

проблему иммуногенности, сохранив при этом высокую специфичность антител [8].

С начала 2000-х годов в качестве альтернативы гибридной технологии активно развиваются методы дисплея, чаще всего фагового дисплея. Зарегистрированные препараты (блокбастеры хумира, лусентис, бенлиста (Humira®, Lucentis®, Benlysta®) и др., большинство антител на стадиях доклинических и клинических исследований) получены дисплейными методами из библиотек, содержащих гены разных животных или синтетические гены [9].

Методы дисплея дают возможность одновременной работы с геном и с продуктом его экспрессии в одном молекулярном комплексе, вирусной частице или клетке. Дисплейные методы начинаются с создания многообразия нуклеотидных последовательностей рекомбинантных антител (так называемых библиотек генов) с после-

дующим отбором из них последовательностей антител с требуемыми свойствами, например, с нужной специфичностью или аффинностью к антигену-мишени. Библиотеки генов терапевтических антител могут быть иммунными (например, полученными из лимфоцитов животных, прошедших курс иммунизации антигеном) и неиммунными (наивными или синтетическими, полученными с помощью ПЦР) (рис. 2).

Антигеном-мишенью, как правило, является один из белков человека, ассоциированный с патогенезом определенного заболевания (например, EGFR, HER2, HER3, MET и др. для различных онкологических заболеваний или IL6R, IL17A, TNF, IL12/23 и др. – для аутоиммунных заболеваний) [11, 12]. Существует несколько десятков молекул с неформальным названием “low-hanging fruits” – это валидированные в клинике мишени, с которыми вдобавок удобно работать исследователю. Другая группа мишеней – это десятки так называемых “high-hanging fruits”, валидированных мишеней для лечения онкологических и инфекционных заболеваний, нарушений метаболических процессов и т.д., которые, однако, сложны для разработки, например, многочисленные GPCR (G-Protein Coupled Receptors, рецепторы, сопряженные с G-белком) или белки ионных каналов [13]. Несмотря на технические ограничения, существует ряд стратегий отбора антител к таким сложным белкам. Например, с этой целью используют комплекс методов отбора по специфичности к коротким синтетическим пептидам, липосомам с заякоренными в мембранах антигенами, клеткам-гиперэкспрессорам антигенов, вирусным частицам с мембранной оболочкой или растворенным в детергентах молекулам-мишеням³ [13].

Среди существующих методов дисплея наиболее распространенным и универсальным является фаговый дисплей (рис. 3), согласно которому гены из имеющейся библиотеки с репертуаром 10^8 – 10^9 (например, гены Fab-фрагментов антител) с помощью методов генетической инженерии клонируют в одной рамке считывания (“сшивают”) с генами одного из поверхностных белков оболочки фага M13 – белка рIII [9]. При сборке фаговых частиц в бактериальной культуре фрагменты антител оказываются экспонированы на поверхности фаговой частицы, что позволяет легко отбирать только те вирусные частицы, на по-

³ <https://www.morphosys.com/science/main-research-areas#antibodies-targeting-gpcrs>

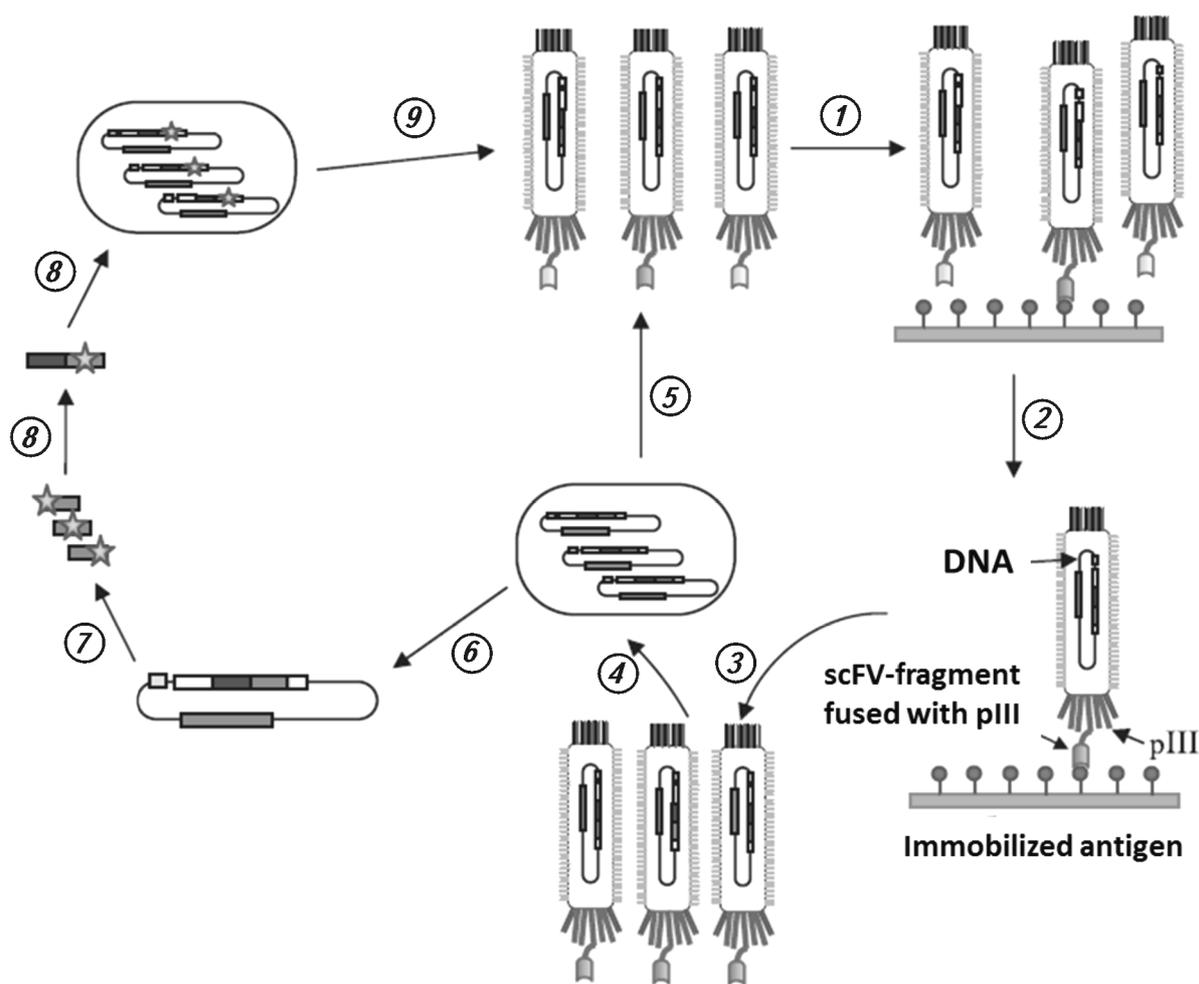


Рис. 3. Схема последовательных процедур метода фагового дисплея [14]: 1 – инкубация фаговой библиотеки с антигеном в лунке планшета; 2 – удаление низкоаффинных фаговых частиц; 3 – элюция фаговых частиц; 4 – инфицирование фагом культуры бактериальных клеток; 5 – повторение цикла селекции, например, в более жестких условиях; 6 – выделение ДНК из фагов; 7 – мутагенез генов антител, создание библиотеки; 8 – клонирование генов антител в фагмидах; 9 – получение новой библиотеки фрагментов антител, экспонированных на поверхности фаговых частиц

Fig. 3. A scheme of successive procedures within the phage display method [14]: (1), incubation of phage library with antigen in plate well; (2), elimination of low-affinity phage particles; (3), elution of phage particles; (4), phage infection of bacterial culture; (5), repeats of selection cycle, for example, under harder conditions; (6), phage DNA isolation; (7), mutagenesis of antibody genes, creation of library; (8), cloning of antibody genes in phagemids; and (9), obtaining of a new library of antibody fragments exposed on the phage surface

верхности которых находятся наиболее специфичные фрагменты антител. Цикл отбора можно повторять несколько раз и таким образом обогащать библиотеку фагов частицами нужного свойства.

За стадией первичного обогащения на антигене следует стадия скрининга – анализа отдельных генов и белков, в том числе оценка функционала, секвенирование и при необходимости оптимизация последовательности (аффинная матурация и гуманизация).

Выбор метода дисплея зависит от исходного материала (например, объема и разнообразия библиотеки), а также от особенностей мишени.

Методы рибосомного, или РНК-дисплея, которые основаны на бесклеточных системах трансляции, позволяют осуществлять одновременный мутагенез в циклах отбора и проводить очень быструю селекцию библиотек с самым большим итоговым репертуаром 10^{13} – 10^{14} . В связи с тем, что метод очень чувствителен и позволяет работать только с полипептидами (scFv), его применяют главным образом для увеличения аффинности отобранных кандидатов антител [9, 14, 15]. Технологии клеточного дисплея, например, эукариотического [10, 16], позволяют работать лишь с библиотеками значительно меньшего размера (в основном

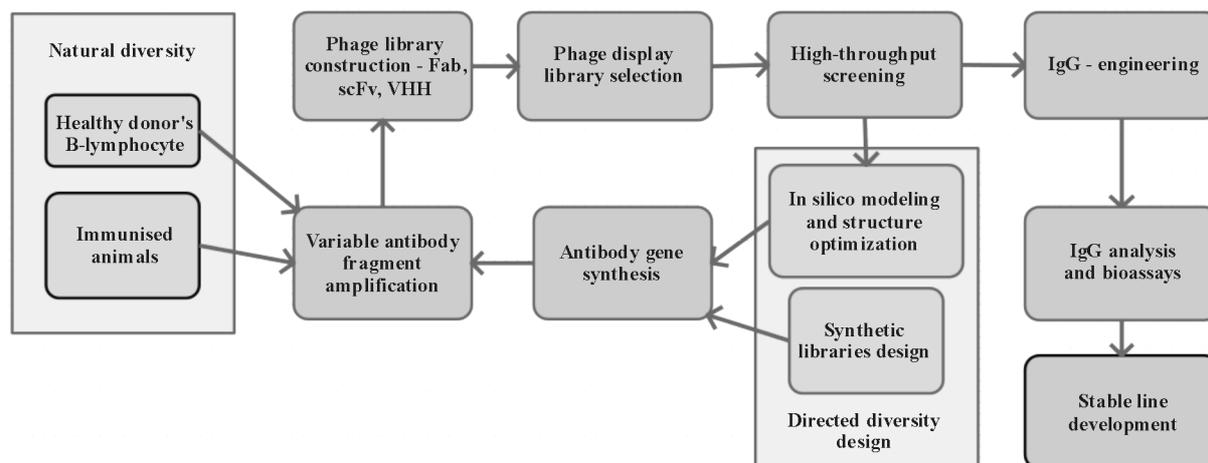


Рис. 4. Схема этапов разработки моноклональных антител (ЗАО “БИОКАД”)

Fig. 4. A scheme of the monoclonal antibodies construction (BIOCAD)

10^6 – 10^7 , максимум – 10^9 в случае дрожжевого дисплея). Основным преимуществом клеточного дисплея является возможность манипулировать с полноразмерным форматом антитела – IgG, что позволяет сортировать клетки (например, с помощью FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting, проточной цитометрии)) не только по аффинности и специфичности, но и по уровню экспрессии генов антител. Это делает последующую фармацевтическую разработку кандидатов антител более предсказуемой [9, 10].

Развитие методов биоинформатики в последние годы позволило многократно увеличить эффективность, надежность и предсказуемость работ по поиску терапевтических молекул, автоматизировать процессы обработки больших массивов биологических данных и проводить моделирование как самих молекул, так и соответствующих научно-исследовательских и производственных процессов [17]. Разработка собственных алгоритмов для решения информационных задач в R&D-подразделениях фармацевтических компаний позволяет работать независимо от внешних сервисов и построить единую интегрированную платформу. Разработанная в ЗАО “БИОКАД” платформа является наиболее полной и самодостаточной по сравнению с известными аналогами. Она позволяет работать с данными классического Сэнгер-секвенирования, NGS-данными, хранить, передавать и быстро обрабатывать огромные массивы экспериментальных данных, формировать дизайн-библиотеки генов, генерировать и разрабатывать алгоритмы и скрипты для автоматизации молекулярно-генетических процессов, анали-

зировать структуры и последовательности белков, оптимизировать последовательности антител для снижения иммуногенности, увеличения аффинности и стабильности, осуществлять дизайн новых молекул и т.д. Понимание собственных потребностей позволяет разрабатывать уникальные алгоритмы для получения более качественных результатов при решении аналогичных задач.

УНИВЕРСАЛЬНАЯ ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛАТФОРМА ПО СОЗДАНИЮ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ моноАТ

Процесс поиска антител из библиотек состоит из ряда последовательных операций (рис. 4), позволяющих по определенным критериям осуществить отбор антител, соответствующих целевому профилю, из библиотек, содержащих миллиарды различных молекул. В качестве основных критериев отбора используются специфичность (способность связывать только желаемые мишени или определенные их участки), аффинность (сродство) к антигену в тех или иных условиях, специфическая активность (способность вызывать желаемые системные эффекты на уровне клеток/тканей), стабильность при хранении, особенности аминокислотной последовательности (близость к гермлайнам, наличие потенциальных сайтов посттрансляционных модификаций, предсказанная иммуногенность) и др.

Количество образцов, вовлекаемых в анализ на каждом этапе, значительно сокращается и зависит от жесткости отбора (интервала отбираемых значений) и изначального разнообразия

библиотек. Вовлечение в первичный анализ недостаточно большой или недостаточно разнообразной выборки грозит остановкой проекта на одной из последующих стадий разработки из-за отсутствия подходящих молекул-кандидатов. Таким образом, на этапе первичного отбора (скрининга) анализу подвергают десятки тысяч антител.

Работа с большим количеством образцов без автоматизации подготовки проб и их анализа требует значительных трудозатрат и характеризуется очень высоким риском влияния человеческого фактора на результат научно-исследовательских работ. Создание “технологических платформ” для разработки антител позволяет значительно сократить время и снизить влияние человеческого фактора при проведении исследований.

Такая платформа была создана в R&D-подразделениях ЗАО “БИОКАД” в период 2012–2013 г. Она включает в себя все этапы ранней разработки молекул антител – от создания библиотек генов переменных фрагментов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов до выбора финальных кандидатов молекул. Платформа построена по принципу интеллектуальной системы, т.е. способна принимать решения в отсутствие человека – на основании предыдущего опыта.

Автоматизация методик с использованием многофункциональных роботизированных станций на базе жидкостных манипуляторов (Tecan, Швейцария) позволяет сделать систему модульной и гибкой, а также использовать универсальные расходные материалы для большинства методик. Станции платформы оснащены одним или несколькими 8- или 96-канальными манипуляторами жидкости, роботизированными манипуляторами для перемещения штативов, планшетов и других объектов, а также дополнительным оборудованием (центрифуги, вакуумные блоки, шейкеры, вошеры, инкубаторы, карусели, ПЦР-амплификаторы, спектрофотометры, перистальтические диспенсеры и др.).

Использование высокопроизводительных станций позволяет в кратчайшее время проводить пробоподготовку и анализ десятков тысяч молекул, обеспечивая получение значительного массива данных, описывающих их свойства. Обработка такого объема данных с использованием стандартных IT-решений – трудоемкий процесс, при выполнении которого вручную нивелируются преимущества от использования высокопроизводительного оборудования. Таким образом, применение автоматизированных высокопроизводительных систем требует мощного аппарата обработки данных, полученных от анализаторов.

В ранней разработке моноклональных антител используются следующие основные приборы: спектрофотометры (для анализа результатов ИФА); генетические анализаторы (секвенаторы), с помощью которых проводят анализ хроматограмм, интерпретацию нуклеотидной последовательности, сборку длинных последовательностей после секвенирования с помощью нескольких праймеров; биослойные интерферометры и приборы поверхностного плазмонного резонанса (для анализа кинетики белок-белковых взаимодействий). Вопрос автоматизации обработки данных актуален для любых анализаторов при оценке большого количества образцов и решается на различных уровнях:

- адаптация стандартных решений для работы с данными (например, с использованием MS Office) позволяет производить пакетную обработку и анализ данных, прошедших первичную оценку с помощью базового программного обеспечения (ПО) к оборудованию;

- локальные решения (например, ПО для обработки хроматограмм), позволяют провести первичную обработку сырых данных, получаемых от приборов и провести их статистический анализ, сравнение и т.д.;

- централизованные решения (лабораторные информационные системы) объединяют несколько модулей в единую систему, позволяющую проводить анализ самых разнообразных первичных данных, а также формировать рабочие листы, скрипты и протоколы для функционирования манипуляторов, объединяя различное оборудование в единую систему. Наиболее рациональна реализация подобных систем анализа сложных процессов, ведущихся несколькими рабочими группами, в виде облачных сервисов и межлабораторных информационных систем.

Внедрение автоматизации методик, обработки данных, создания и хранения документации позволило значительно сократить время, затрачиваемое на ведение НИР, при сокращении штата сотрудников и увеличении количества одновременно анализируемых образцов. Кроме того, автоматизация обеспечивает четкое планирование временных рамок проведения исследований, а наличие общих принципов проведения работ, нормативной и отчетной документации, а также упорядоченного ее хранения позволяет задавать и сохранять выбранный вектор работы, ставить четкие задачи, делает работу взвешенной и прозрачной. Синхронизация потоков материалов и информации в ходе разработки лекарственных средств в описываемой технологической

платформе реализуется путем создания единого информационного центра, интегрированного с оборудованием и включающего все уровни решений для обработки и хранения информации. Так формируется единое информационное поле, которое минимизирует зависимость системы от отдельных сотрудников, а платформа, организованная в единую систему и поддерживаемая бесперебойным обеспечением материалами и техническим обслуживанием оборудования, превращается в мощный инструмент по разработке лекарственных средств.

Рассмотренные выше подходы к созданию высокоэффективной системы по разработке ЛП на основе моноАТ позволяют быстро и эффективно осуществлять поиск антител с заданными свойствами в библиотеках различной природы. Однако такой подход существенно ограничивается изначальным разнообразием библиотек.

Возможность использования потенциала методов математического моделирования в сочетании с потенциалом синтеза огромного разнообразия принципиально любых нуклеотидных и белковых молекул (синтез олигонуклеотидов, сборка генов, клонирование, препаративное получение рекомбинантных белков в клетках бактерий и млекопитающих) делает платформу способной решать широчайший круг задач с минимальным привлечением ресурсов. Такая технологическая платформа не зависит от ограничений исходного материала (наличие/отсутствие природного разнообразия) и способна направленно оптимизировать молекулы в ходе разработки субстанций при небольшом количестве итераций процесса “оптимизации *in silico*/синтеза оптимизированных библиотек”.

МНОГООБРАЗИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ СТРУКТУРНЫХ ВАРИАНТОВ МОЛЕКУЛ АНТИТЕЛ (ФОРМАТОВ) И ОБЛАСТЕЙ ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Целью направленной инженерии молекул антител, которая стала обычной практикой улучшения их характеристик, является матурация антител, уменьшение потенциальной иммуногенности, изменение различных эффекторных свойств, корректировка фармакокинетических показателей и др.

Наиболее востребованной основой для лекарственных препаратов на основе моноАТ является классическая Y-образная молекула иммуноглобулина (IgG) с двумя плечами – Fab-фрагментами, и основанием – Fc-фрагментом.

Классическое антитело IgG является моноспецифичным и бивалентным. Регионы, определяющие комплементарность (CDRs), являются частью переменных доменов легкой и тяжелой цепи и обуславливают узнавание и связывание антителом молекулы антигена. N-концевая часть Fc-фрагмента, содержащая остатки СН2-константных доменов, отвечает за связывание так называемых Fcγ-рецепторов (Fc-gamma receptors), расположенных на NK-клетках, макрофагах, нейтрофилах и других клетках иммунной системы. Связывание с рецептором запускает процессы антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), антитело-зависимого фагоцитоза (ADCP) и цитокинового высвобождения. Кроме того, определенные участки Fc-фрагмента (СН2- и СН3-доменов), связывают Fc-неонатальный рецептор (FcRn), ответственный за гомеостаз антител – длительное время полужизни в плазме крови (до 21 сут). Большинство антител, уже представленных на рынке, принадлежат к доминирующему в норме у человека IgG1-изотипу, который характеризуется наличием ярко выраженных эффекторных свойств и достаточной стабильностью. Однако значительный интерес представляют и низкоэффекторные IgG2- и IgG4-изотипы, основным терапевтическим механизмом действия которых является блокирование функционально значимого эпитопа антигена.

На рис. 5 представлены возможные стратегии изменения структуры классического антитела, которые могут приводить к улучшению физико-химических и терапевтических свойств. Например, широко используется направленное изменение последовательности аминокислот антитела для улучшения его связывания с антигеном – аффинная матурация [18, 19]. Усиление сродства антитела к мишени, как правило, снижает необходимую дозировку ЛП и тем самым уменьшает его потенциальную токсичность. Методики получения высокоаффинных антител разнообразны, включают различные дисплейные техники, такие как фаговый [20, 21], дрожжевой [22] и рибосомный дисплей [23], а также сканирующий мутагенез и дизайн *de novo* [24, 25]. Например, ЗАО “БИО-КАД” с помощью метода фагового дисплея разработало, а затем оптимизировало по аффинности и специфичности антитело BCD-085 против интерлейкина 17А (IL17A), предназначенное для лечения псориаза, которое обладает *K_d*, близкой или ниже 1 пМ. Эта величина является рекордно низкой среди указанных в литературе значений других аналогичных по специфичности кандидатов.

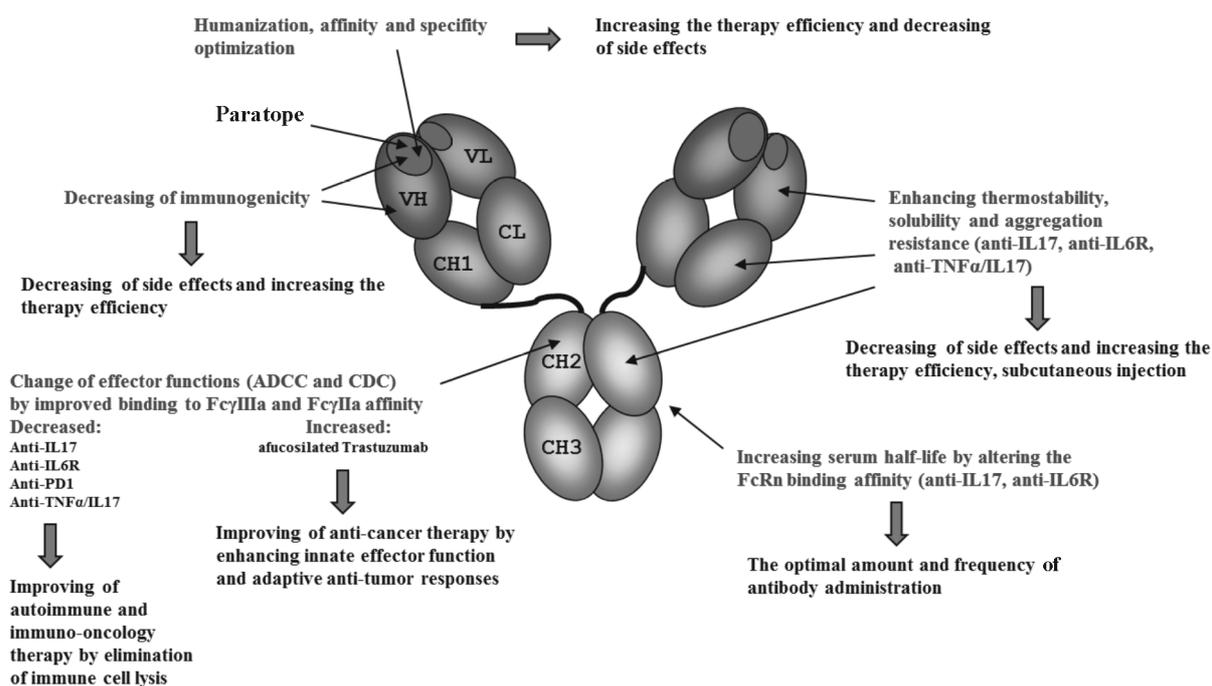


Рис. 5. Стратегии направленной инженерии терапевтических антител: VL – переменный домен легкой цепи, VH – переменный домен тяжелой цепи, CH1 – первый константный домен тяжелой цепи, CH2 – второй константный домен тяжелой цепи, CH3 – третий константный домен тяжелой цепи; CL – константный домен легкой цепи

Fig. 5. Antibody structure engineering for therapy: VL, variable domain of light chain; VH, variable domain of heavy chain; CH1 – first constant domain of heavy chain; CH2, second constant domain of heavy chain; CH3, third constant domain of heavy chain; CL – constant domain of light chain

Уменьшение потенциальной иммуногенности, так называемая “гуманизация”, является доминирующим направлением в разработке терапевтических антител; исторически оно развивалось от создания химерных антител через гуманизированные и далее к полностью человеческим антителам [26–28]. Использование *in silico* методов гуманизации и баз данных иммуногенных пептидов, а также биохимических и клеточных платформ обнаружения Т-клеточных эпитопов повысило скорость и эффективность разработки неиммуногенных антител [26, 29].

Крайне важным инструментом оптимизации терапевтических антител является направленное изменение их эффекторных свойств – ADCC, ADCP и CDC [30–32]. Так например, было показано, что увеличение ADCC в 10 и более раз за счет удаления фукозы из состава N-гликозилированного анти-HER2-IgG1 (например, у препарата трастузумаб), значительно повышает его онколитическую активность. С другой стороны, ряд молекулярных мишеней для антител синтезируются именно нормальными, здоровыми клетками, которые являются важным звеном иммунного от-

вета, а механизмом действия таких антител является модулирование (репрограммирование) функций клеток посредством воздействия на эти мишени. В этом случае наличие эффекторных свойств терапевтического антитела влечет за собой неспецифический лизис клеток и является нежелательным побочным эффектом. Для подобных антител, как правило, выбирают малоэффекторный изотип, например, IgG2 и IgG4, либо используют модифицированный Fc-регион изотипа IgG1 со сниженным сродством к Fc-рецепторам и, соответственно, с отсутствующими ADCC и CDC [33]. Поэтому для улучшения терапевтических свойств антитела – блокатора рецептора PD-1 (BCD-100), ответственного за супрессию CD4+, CD8+ Т-клеток, в ЗАО “БИОКАД” модифицировали Fc-фрагмент, устранив как ADCC-, так и CDC-свойства антитела, одновременно сохранив его более предпочтительный по стабильности IgG1-изотип. Аналогичный подход был применен при разработке антител, предназначенных для лечения аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит и псориаз (эти антитела являются блокаторами рецептора интерлейкина-6 (BCD-089)),

а также биспецифического антитела BCD-121 против двух цитокинов – фактора некроза опухоли альфа (TNF β) и интерлейкина-17A (IL17A) (см. рис. 5). Полученные кандидаты продемонстрировали отсутствие ADCC и CDC в тестах *in vitro*.

Фармакокинетические свойства – важная характеристика, определяющая эффективность препарата на основе моноклонального антитела и удобство его применения [34, 35]. Механизм пролонгированного действия иммуноглобулинов в крови основан на их взаимодействии с клеточным рецептором FcRn [36]. Модификации, изменяющие силу связывания молекулы IgG с FcRn, позволяют манипулировать фармакокинетическими свойствами антитела в крови. Например, модификация антител BCD-089 против IL6R и BCD-085 против IL17A (производство ЗАО “БИОКАД”) позволила увеличить время полувыведения ($T_{1/2}$) обоих антител в два раза в опытах на нечеловекообразных приматах по сравнению с теми же антителами, содержащими природный немодифицированный Fc-фрагмент.

Терапевтические свойства ЛП на основе моноАТ и/или его производных (V-мономер, scFv, Fab-фрагменты) зависят от структуры антиген-связывающих доменов, их взаимного расположения и модификаций. С целью усиления терапевтических свойств ЛП в сравнении со свойствами препаратов на основе классических IgG разработчики используют новые структурные форматы иммуноглобулинов.

Можно выделить четыре основных варианта дизайна антител, каждый из которых обуславливает определенные функциональные преимущества ЛП и позволяет ему занимать отдельную терапевтическую нишу: 1) классическое моноспецифическое антитело с модификациями в константных доменах, усиливающими различные эффекторные (ADCC, CDC) и биологические (фармакокинетика) функции; 2) асимметричные биспецифические антитела (с возможными дополнительными модификациями в Fc-фрагменте), обладающие IgG-подобной структурой, у которых антиген-специфичные Fab-фрагменты связывают разные мишени; 3) антитела-конъюгаты, например, сшитые с токсинами (ADC, Antibody-Drug Conjugates), способные после проникновения внутрь клеток, содержащих молекулу-мишень, вызывать ее гибель за счет действия молекул токсина; 4) биспецифические мультивалентные антитела с возможными дополнительными модификациями в Fc-фрагменте, обладающие свойствами, аналогичными характеристикам асимметричных биспецифических антител, но имеющих большую валент-

ность (число связей, в которых антитело способно участвовать) по отношению к мишеням или даже мультиспецифичность (способность связывать три и более различных молекул) (рис. 6).

Большинство существующих на рынке антител моноспецифичны, т.е. взаимодействуют только с одной мишенью. Однако многие заболевания (в том числе онкологические) являются мультифакторными; для них характерно наличие одновременно несколько медиаторов заболевания, активация не одного, а целого спектра рецепторов, их перекрестное взаимодействие, взаимозаменяемость и синергия. Соответственно, блокирование нескольких сложных факторов или сигнальных путей может привести к улучшению эффективности терапии антителом [37, 38]. Этого можно достичь, используя комбинации препаратов или биспецифические антитела [39]. В настоящее время в разработке находится около двух сотен различных биспецифических антител, и их количество растет с каждым годом.

Согласно структурным особенностям данную группу молекул можно разделить на два основных класса – асимметричные IgG и мультивалентные IgG (см. рис. 6). Первый класс – молекулы, чья структура принципиально не отличается по структуре от классического IgG, что обеспечивает хорошую продуктивность антитела в клеточных культурах и достаточную стабильность как *in vitro*, так и *in vivo*. Такие антитела становятся способны ассоциировать с образованием асимметричной структуры из двух различных по специфичности половин за счет внесения специфических мутаций в константные регионы. Асимметричные структуры получают либо *in vitro* из произведенных отдельно моноспецифических антител, либо путем коэкспрессии различных по специфичности легких и тяжелых цепей в одной клетке и их попарной селективной ассоциации [40–43]. Гетеродимеры отделяют путем применения специальных технологий, например, различных методов аффинной тандемной очистки [44]. Для всех вариантов получения асимметричных биспецифических антител выход гетероассоциированных продуктов достигает 95–99%.

Однако биспецифические гетеродимерные антитела обладают рядом существенных недостатков: 1) моновалентность Fab-фрагментов для каждого вида специфичности, т.е. меньшая итоговая аффинность по сравнению с бивалентным классическим IgG; 2) гетерогенность продукта из-за образования как гетеродимеров, так и гомодимеров, усложняющая промышленную очистку антитела; 3) необходимость правовой защиты

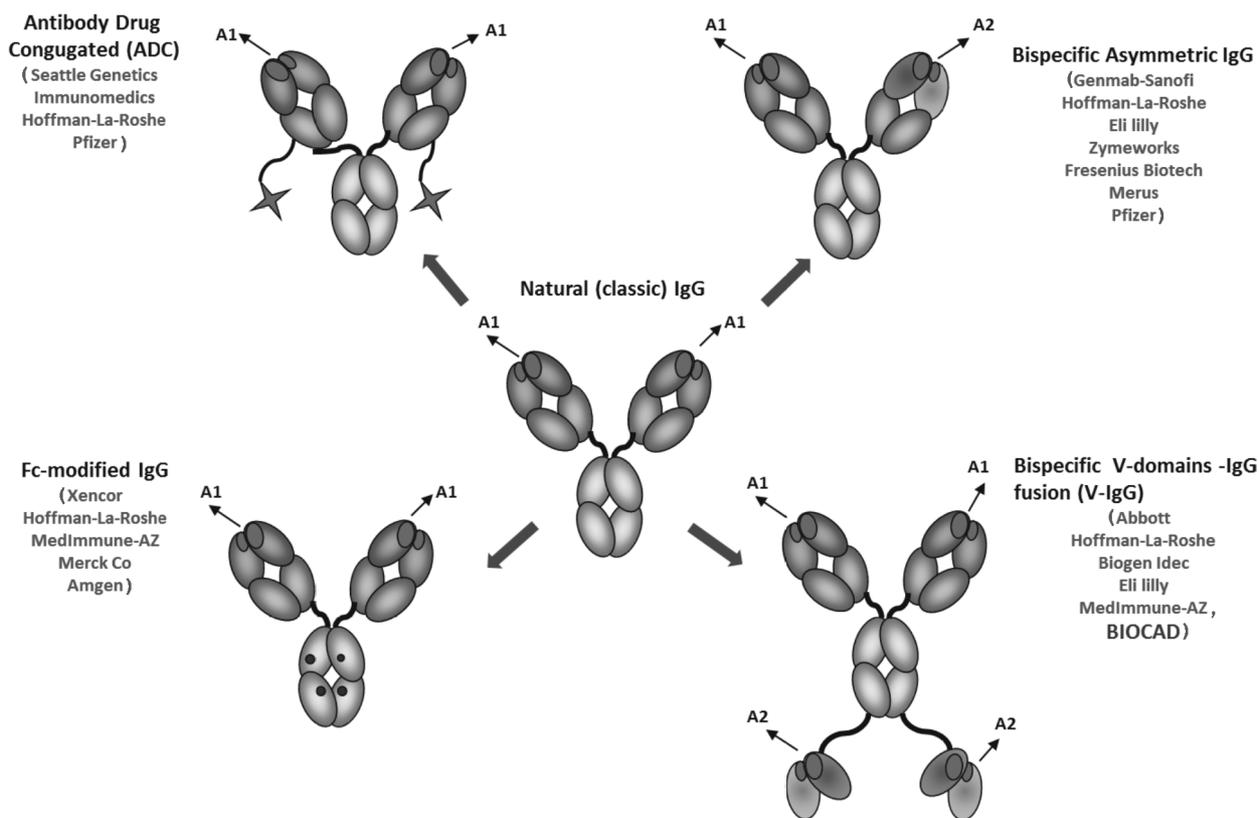


Рис. 6. Структурный формат «магической пули» на основе IgG-антител: A1 и A2 – условные обозначения эпитопов на молекулах-мишенях; в центре – классическое моноспецифическое антитело

Fig. 6. A Structural format of “magic bullet” based on IgG antibodies; A1 and A2, symbols of epitopes on target molecules; in the center, classical monospecific antibody

большинства аминокислотных замен моноАТ, обуславливающих эффективную гетеродимеризацию *in vivo*, а также способов получения асимметричных антител *in vitro*.

Проблему моновалентности решает другой популярный биспецифический формат – мультивалентный IgG, число валентностей в котором может достигать шести и более. Самыми распространенными являются комбинации стандартных IgG одной специфичности и переменных доменов антител в форматах Fv, scFv, Fab, Diabody и др., специфичных к другой мишени [39]. Сборка таких структур для белкового инженера фактически является манипуляцией с молекулярным конструктором “LEGO®” [33]. В ЗАО “БИОКАД” был разработан оригинальный биспецифический вариант – MINOTAVR (bispecific Monoclonal Immunoglobulin of Tandem Variable domains), полученный путем сшивания VHH-монодомена (варибельного домена тяжелой цепи одноцепочечного антитела *Lama glama* [45]) с N-концом легкой цепи классического IgG (рис. 7).

В клеточных тестах *in vitro* были изучены свойства биспецифических антител anti-EGFR/anti-HER3 (BCD-087) и anti-HER2/anti-HER3 (BCD-090) для лечения онкологических заболеваний и anti-TNF α /anti-IL17A (BCD-121) для лечения аутоиммунных патологий. Показано, что BCD-087 и BCD-090 имеют преимущества над существующими моноспецифическими антителами, заключающиеся в более сильном ингибировании пролиферации культур – производных эпителиальных опухолей, а BCD-121 способно более активно подавлять продукцию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 и интерлейкин-8, в ответ на действие TNF α и IL17A в клеточной линии HT1080. Кроме того, все три кандидата характеризуются достаточной продуктивностью для разработки процесса в культуре клеток млекопитающих (более 100 мг/л в транзентной системе экспрессии и более 1 г/л для стабильных линий продуцентов), что свидетельствует о промышленной перспективности данной биспецифической структуры [46, 47]. Кроме того,

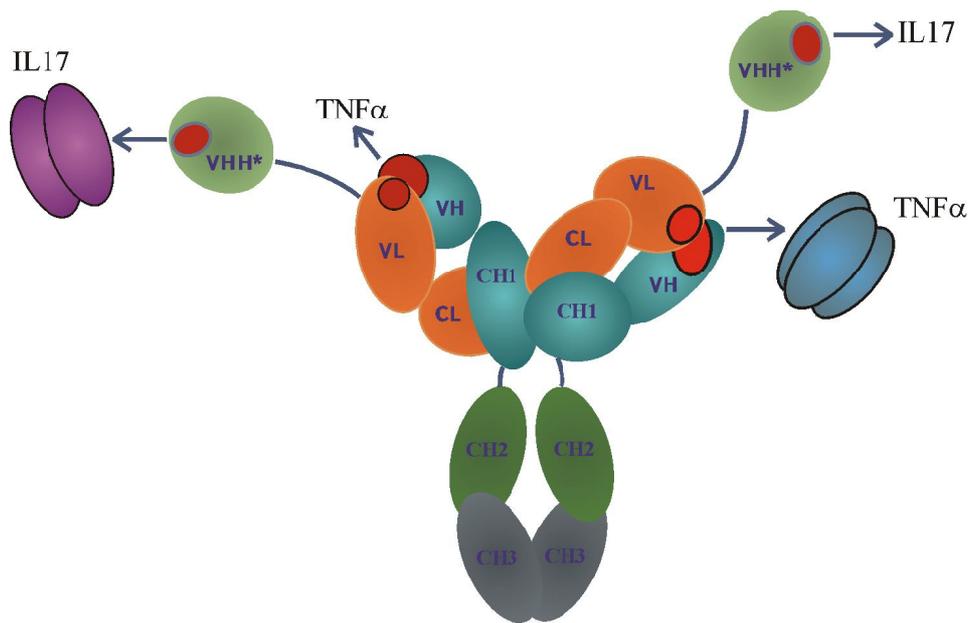


Рис. 7. Структура варианта биспецифического антитела «MINOTAVR» («БИОКАД»): VHH* – варивельный домен тяжелой цепи одноцепочечного антитела *Lama glama*, CH1 – первый константный домен тяжелой цепи антител, CH2 – второй константный домен тяжелой цепи антитела; VL – вариавельный домен легкой цепи; CL – константный домен легкой цепи

Fig. 7. Bispecific antibody structure of Monoclonal ImmuNOglobulin of Tandem Variable domains (MINOTAVR) (BIOCAD): VHH*, variable domain of *Lama glama* single-chain antibody heavy chain; CH1, first constant domain of antibody heavy chain; CH2, second constant domain of antibody heavy chain; VL, light chain variable domain; and CL, light chain constant domain

anti-TNF α /anti-IL17A моноАТ обладает значительной стабильностью при хранении в высококонцентрированной форме (свыше 100 мг/мл), что отвечает самым высоким требованиям для такого типа молекул и позволит в ближайшем будущем создать удобную для пациентов лекарственную форму для подкожных инъекций. Нужно отметить, что вышеупомянутые характеристики стабильности и продуктивности формата MINOTAVR в ряде случаев значительно превосходят опубликованные в литературе данные для различных вариантов асимметричных и мультивалентных IgG [43, 48, 49].

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА моноАТ НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗРАБОТКИ КАК ОСНОВА ЭФФЕКТИВНОСТИ БУДУЩЕЙ ТЕРАПИИ

Поиск кандидатов антител способом, описанным выше – это первый и чрезвычайно важный этап отбора, на котором оцениваются в основном молекулярные и физико-химические свойства будущего антитела. Важным звеном любой разработки является оценка функциональности кандидатов антител *in vitro* и их работоспособности *in vivo* на модельных животных, таких как мышинные экспериментальные модели (ксенографты) и приматы *Macaca mulatta* [50–52].

Если молекула антитела соответствует всем заявленным в QTMP свойствам, можно приступать к созданию вектора для получения моноклональной линии-производителя и разработке биотехнологического процесса.

В настоящее время в ЗАО «БИОКАД» ведется разработка оригинального препарата моноклональных антител (BCD-088) против рецептора фактора роста гепатоцитов c-MET (Mesenchymal-Epithelial Transition Factor). Рецептор c-MET/HGFR – трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью [53]. Основным лигандом c-MET/HGFR является фактор роста гепатоцитов (HGF). Этот пептид представляет собой многофункциональный агент, который индуцирует диссоциацию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток, а также участвует в стабилизации клетки и предотвращении апоптоза; он необходим на эмбриональном этапе развития и впоследствии для заживления ран организма [54]. Ген *c-MET/HGFR* является протоонкогеном. Изменение уровня его экспрессии, амплификация гена или мутации, вызывающие конститутивную активность рецептора, обнаружены в клетках многих видов рака (плоскоклеточная карцинома ротовой полости, гепатоцеллюлярная карцинома, почечно-клеточная карцинома, карцинома желудка и др.) [53, 55, 56–58]. Так, например, при раке ободочной киш-

ки наблюдается по меньшей мере пятикратное увеличение уровня экспрессии *MET* [58]. Нарушение регуляции *c-MET* запускает не только разрастание опухоли и активный ангиогенез, но и метастазирование переродившихся клеток.

Таким образом, блокирование активации *c-MET* является перспективным подходом к терапии широкого спектра злокачественных новообразований. Существование разных механизмов возникновения нарушений регуляции *c-MET/HGFR* делает очень гетерогенной группу пациентов с *c-MET*-ассоциированными формами рака. Поэтому особое значение приобретает создание ЛП, эффективного как при возникновении активирующих мутаций *c-MET*, амплификации гена, кодирующего *c-MET/HGFR*, так и при нарушении регуляции в ответ на применение анти-VEGF-препаратов, а также при совместной терапии с анти-EGFR-препаратами. На рынке пока не существует лекарственных средств на основе моноАТ против нарушений, связанных с гиперактивностью *c-MET/HGFR*. Для лечения *c-MET*-ассоциированных заболеваний в основном используют ингибиторы тирозинкиназной активности, главным недостатком которых является невысокая специфичность [59].

Сравнительный анализ находящихся в разработке антител против *c-MET* позволил сформировать оптимальное сочетание тестов (включенных в QTMP), необходимых для отбора из библиотек генов наиболее универсальной и эффективной молекулы, которая должна была обеспечить высокую противоопухолевую активность антитела *in vivo* (таблица). Согласно заложенному механизму действия антител, они должны были включать блок взаимодействия (антагонизма) с лигандом, блок фосфорилирования, блок димеризации, иметь минимальную агонистическую активность, способность к индукции интернализации и при этом сохранять эффекторные свойства (ADCC).

Из иммунных библиотек после того, как 20 тыс. клонов были подвергнуты нескольким раундам фагового дисплея и высокопроизводительного автоматизированного скрининга, был отобран высокоаффинный кандидат ($K_d \sim 10^{-11}$) с антагонистической активностью, почти на порядок превышающей аффинность антитела онартузумаб (Onartuzumab, Genentech) [60]. Последовательность кандидата была оптимизирована (гуманизация, матурация, увеличение стабильности, редактирование сайтов посттрансляционных модификаций путем создания на основе генов тяжелой и легкой цепей антитела новой синтетической

фаговой библиотеки и повторного скрининга. Выбранный вариант оптимизированного антагонистического BCD-088 обладал минимальной агонистической активностью, не вызывал аутофосфорилирование рецептора, сохранял ADCC и обуславливал интернализацию и последующую деградацию *c-MET*.

Анализ эффективности препарата *in vivo* включал сравнительные исследования противоопухолевой активности молекулы-кандидата BCD-088 в формате классического антитела IgG и формате одновалентного антитела “one-arm” (аналога антитела 5D5 (МНН – онартузумаб)). Проводили многократное внутрибрюшинное введение препаратов иммунодефицитным бестимусным мышам (*Nu/Nu*) (модель подкожных ксенографтов) с использованием линии клеток карциномы желудка (*MKN45*) и линии клеток глиобластомы человека (*U87MG*).

Клетки линии *MKN45* характеризуются HGF-независимым типом активации *c-MET* [61, 62]. Эффективность моноклональных антител против *c-MET* в данном случае обусловлена блокированием димеризации рецептора, необходимой для его активации и дальнейшего сигналинга. Противоопухолевая активность препарата BCD-088 в дозе 50,0 мг/кг, оцененная по показателю торможения роста опухоли (ТРО), рассчитанного на момент окончания эксперимента, была сопоставима с индексами ТРО, полученными для препарата AM7 [64] и составляла около 62%.

Глиобlastома человека (линия *U87MG*) – это наиболее частая и наиболее агрессивная форма опухоли мозга. Клетки глиобlastомы экспонируют на своей поверхности рецептор *c-MET* с HGF-зависимым типом активации. Опухолевая линия глиобlastомы человека обладает аутокринным типом активации рецептора *c-MET* [63, 64]. Эффективность моноклональных антител против *c-MET* в данном случае обусловлена ингибированием связывания рецептора с его лигандом HGF, предотвращающим активацию рецептора и дальнейший сигналинг.

Противоопухолевая активность препарата BCD-088 в дозе 50,0 мг/кг была значительно выше соответствующих значений для контрольного препарата AM7 (популярный коммерческий ингибитор тирозинкиназ) [64] и составляла около 92%.

Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что препарат BCD-088 имеет ряд преимуществ по сравнению с существующими в разработке аналогами, должен быть эффективен при разных механизмах возникновения *c-MET*-опо-

Многообразие клеточных тестов, использованных для отбора анти-c-MET/HGFR препаратов
Diversity of cell tests used to selection of anti-c-MET/HGFR antibodies

Характеристики	Антитело (фирма-производитель)							
	Onartuzumab (Genentech)	LY2875358 (Lilly)	Anti-c-MET (Samsung)	Anti-c-MET (Novartis)	CE-355621 (Pfizer, Abgenix)	HuMax-c-MET (Genmab)	ARGX-111 (arGEN-X)	BIOCAD
Изотип	G1	G2/G4	G1	G1/G4	G2	G1	G1	
Эпитоп								
Неспецифичное связывание								
Конкуренция								
Агонизм-фосфорилирование								
Агонизм-активация								
Интернализация								
Агонистическая активность								
Индукция апоптоза								
Влияние на ангиогенез								
Тубулярный морфогенез								
Scatter assay (тест на изменение морфологии – рассеивание эпителиальных клеток)								
Scratch assay(тест на изменение морфологии – анализ раневой поверхности)								
Тест на изменение морфологии – инвазивный рост								
Кросс-реактивность								
Тест на ксенографтах								
Снижение уровня экспрессии с помощью проточной цитометрии								
ADCC								

средованной опухоли и является потенциальным кандидатом для терапии немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), колоректального рака, рака желудка и почек и прочих солидных опухолей.

В настоящее время активно развивается область иммунотерапии онкологических заболеваний (иммуноонкология), основной задачей которой является активация иммунной системы па-

циента с помощью антител, связывающихся с рецепторами на поверхности иммунных клеток, например, PD1 [65]. Рецептор программируемой клеточной смерти PD1 (или CD279) является членом семейства ингибиторных костимулирующих рецепторов. Функциональная значимость белков этого семейства и их лигандов сводится к тонкой регуляции баланса между активацией лимфоцитов, толерантностью и иммунопатологическими процессами. PD1 подавляет эффекторные функции Т-клеток через внутриклеточные и внеклеточные механизмы. Ингибиторный сигнал через PD1 инициирует статус анергии иммунореактивных Т-клеток, приводя к тому, что клетки становятся неспособны к клональной экспансии и продукции оптимального уровня эффекторных цитокинов. В целом взаимодействие PD1 с лигандами обуславливает иммуносупрессию Т-клеток [66]. Известно, что раковые клетки экспонируют на своей поверхности большое количество лигандов (PD-L), причем высокий уровень этой экспозиции часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом при лечении. Механизмы «невидимости» для собственного иммунитета включаются на самых ранних стадиях развития онкологических заболеваний. Именно это делает анти-PD1-антитела перспективным компонентом разрабатываемых препаратов для моно- и комбинированной терапии рака на ранних стадиях и при метастазировании, что подтверждается экспериментальными данными. Наиболее востребованы препараты анти-PD1 (анти-PD-L1)-антител в терапии агрессивных опухолей, в особенности при лечении метастатической меланомы, НМРЛ, почечной карциномы и др. [65].

В отличие от сложного процесса отбора функциональных молекул антител, контролирующей работу доминантных протоонкогенов (как в случае с c-MET), при разработке анти-PD1-антител ключевым свойством является связывание антитела с мишенью и блокировка его взаимодействия с лигандами – преимущественно предотвращение образования комплекса PD-L1. В ЗАО «БИОКАД» с помощью фагового дисплея библиотеки донорских антител человека MeganLib™ и последующего мутагенеза было создано полностью человеческое антагонистическое антитело против рецептора PD1 – BCD-100. В сравнительных клеточных тестах препарат BCD-100 превос-

ходил коммерческие препараты антител опдиво и кейтруда (Opdivo®, Bristol Myers Squibb, и Keytruda®, Merck & Co). Оптимизация свойств молекулы позволила добиться высокого уровня продукции белка в культуре CHO (более 2 г/л), а также повышенной агрегационной стабильности, что обеспечит минимальную иммуногенность препарата и улучшенные фармакокинетические и фармакодинамические свойства.

В настоящее время препарат BCD-088 находится на стадии разработки биотехнологического процесса, а BCD-100 – на стадии подготовки к проведению клинических исследований I фазы. Параллельно ведутся работы по оценке эффективности комбинаций BCD-088 с антагонистическими антителами против рецепторов ErbB-семейства и комбинаций BCD-100 с различными чекпойнт-ингибиторами.

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ КАЧЕСТВА ПРИ РАЗРАБОТКЕ И ПРОИЗВОДСТВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Важно отметить, что размер молекул активного вещества в составе биологических препаратов в 200–1000 раз превышает размер соответствующих молекул в химических препаратах и структурно первые значительно сложнее вторых. Этим, в частности, объясняются существенные различия в разработке, производстве и контроле качества биотехнологических препаратов.

Возросшая мировая конкуренция привела к ужесточению требований, предъявляемых регуляторными органами и потребителями к качеству продукции, а значит, и к качеству разработки этой продукции, и ее производству. При создании препарата главный ориентир для фармацевтической компании – потребности пациента и врача; путь для достижения этого ориентира намечен международными требованиями стандартов качества. В 2005 г. на «Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека» (International Conference of Harmonization — ICH) был создан документ Q8 Pharmaceutical Development⁴ («Фармацевтическая разработка»), который содержит понятие жизненного цикла лекарственного средства и алгоритм его разработки. Фармацев-

⁴ ICH Q8(R2) Pharmaceutical Development. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073507.pdf>

тическая разработка — это комплексные экспериментальные исследования, в рамках которых осуществляется обоснование состава, этапов технологического процесса и условий производства ЛП. Таким образом, качество лекарственного средства закладывается уже на этапе его разработки.

В течение более, чем полувека, разрабатывались и совершенствовались различные стандарты надлежащей практики (GP – Good Practice). Эти стандарты обеспечивают качество лекарственного средства на всех этапах его жизненного цикла.

После разработки лекарственного средства в лаборатории проводят доклинические исследования препаратов с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice — GLP). Эти правила охватывают организационный процесс и условия, в которых проводятся доклинические исследования, связанные прежде всего с определением профиля безопасности.

После успешных доклинических исследований подается заявка на проведение клинических испытаний. Они проводятся в соответствии с требованиями надлежащей клинической практики – GCP (Good Clinical Practice). GCP – международный этический и научный стандарт качества планирования и проведения клинических исследований лекарственных средств с участием людей, а также документального оформления и представления их результатов.

Далее следует этап регистрации препарата. Получение регистрационного удостоверения означает одобрение производства препарата в промышленном масштабе и его дальнейшей реализации.

Производство лекарственных средств контролируется специфическим для фармацевтического производства сводом правил — надлежащей производственной практикой (Good Manufacturing Practice — GMP). Соблюдение этой практики обуславливает принципиальное отличие современной компании, которая работает в соответствии с актуальными правилами GMP, от фармацевтических производителей, живущих по старым правилам (или вообще без их соблюдения). Первая обеспечивает надлежащее качество на всех этапах производства — от закупки сырья, материалов и их контроля (через валидацию и тщательный мониторинг технологического процесса) до проверки качества конечного продукта и контроля первого этапа дистрибуции. Вторые основной упор делают только на контроль качества готового продукта.

Все международные требования к разработке и производству лекарственных средств «живые и подвижные», т.е. над ними ведется непрерывная работа, они пересматриваются, совершенствуются и выносятся на обсуждение специалистов отрасли и экспертов*.

БИОАНАЛОГИ: УВЕЛИЧЕНИЕ ДОСТУПНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛП ДЛЯ НАСЕЛЕНИЯ

Внедрение в рутинную практику биологических ЛП является непростой задачей для системы здравоохранения. С одной стороны, терапия генно-инженерными биологическими препаратами позволяет добиться высоких клинических результатов и улучшить качество и продолжительность жизни пациентов. С другой стороны, подобное лечение ассоциируется с колоссальными затратами и поднимает проблему доступа к высокоэффективным лекарственным препаратам. Так, средняя стоимость стандартного курса терапии одного пациента препаратом трастузумаб составляет более 1 млн 292 тыс. руб., а затраты на терапию комбинациями препаратов могут превышать 6 млн. руб. (курсовая стоимость рассчитана исходя из 17 введений препарата, эквивалентных 7280 мг ЛП трастузумаб по средней цене 178 руб/мг (по данным информационно-аналитической системы Headway Co за 2014 г.).

Одним из решений, снижающих стоимость терапии, является использование воспроизведенных ЛП – биоаналогов, создание которых становится возможным по мере истечения срока действия патента для существующей на рынке референтной позиции. Ввиду сложной биологической структуры в международной и российской практике большое внимание уделяется регуляторным аспектам, связанным с оценкой биоподобия (см. ниже) референтного препарата и биоаналога ЛП (разработке нормативных документов/рекомендаций по объему необходимых испытаний для характеристики структуры, свойств молекулы и ее терапевтической эквивалентности).

В 2005 г. Европейское медицинское агентство (ЕМА) установило нормативные требования для регистрации биоподобных ЛП. В 2009 г. Всемирная организация здравоохранения (World Health Organization, WHO) опубликовала рекомендации, регламентирующие разработку и оценку биоаналогов. При этом ЕМА издает рекоменда-

* О проблеме стандартизации препаратов на основе АТ см. также статью И.Г.Осиповой и др., стр.80–90 настоящего издания (ред.)

ции по доказательству биоподобия отдельных классов биологических препаратов (Г-КСФ, моноклональные антитела, низкомолекулярные гепарины, интерфероны и т.д.) и по регламентации объема испытаний, необходимых для регистрации биоаналога на территории Европы. Рекомендации ВТО в большей степени служат целям формирования принципов, необходимых для лицензирования биологических препаратов через разработку биоаналога (также регламентируется объем минимально необходимых испытаний, но эти рекомендации скорее имеют в качестве адресата развивающиеся рынки). 22 декабря 2014 г. были внесены изменения в Федеральный закон РФ № 61, в соответствии с которыми зафиксировано определение биоподобного лекарственного препарата и определены минимально необходимые требования для доказательства биоподобия. Иными словами, измененный закон содержит нормативную базу для регистрации и обращения биоаналогов на территории РФ, которая включает адаптированные рекомендации ЕМА. Биоаналог (биоподобный лекарственный препарат) определен как биологический лекарственный препарат, схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим лекарственным препаратом, существующий в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный с ним способ введения.

В 2014 г. в РФ был зарегистрирован первый биоподобный лекарственный препарат на основе моноАТ – ацеллбия (ЗАО “БИОКАД”, МНН – ритуксимаб), что позволило снизить затраты на обеспечение одного пациента стандартным курсом терапии более, чем на 26 тыс. руб. Принимая во внимание тот факт, что по Федеральной целевой программе в 2014 г. ритуксимабом было обеспечено около 12 тыс. российских пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, суммарная экономия исчисляется в сотнях миллионов рублей ежегодно. Регистрация в 2015 г. двух других биоаналогов наиболее востребованных жизненно необходимых лекарственных препаратов трастузумаба и бевацизумаба позволила уже в 2016 г. достичь экономии в размере 35% и 80% от стоимости оригинальных препаратов, соответственно (по данным электронных торгов: <http://zakurki.gov.ru>). Бюджетные средства, высвобожденные благодаря внедрению в широкую практику биоаналогов, позволят обеспечить большее число нуждающихся больных высокоэффективной лекарственной терапией.

Таким образом, препараты направленной терапии, созданные на основе моноАТ, в настоящее время успешно применяются в клинической

практике. Они используются для лечения больных, страдающих болезнями с длительным прогрессирующим течением, такими как онкологические, аутоиммунные, инфекционные и аллергические заболевания.

Десятки компаний по всему миру ведут работы, направленные на получение терапевтических моноАТ, а арсенал врачей ежегодно пополняется несколькими препаратами на их основе.

В настоящее время наиболее эффективным подходом к получению терапевтических моноАТ является создание библиотек генов иммуноглобулинов с последующей селекцией и скринингом вариантов, обладающих специфичностью к определенным мишеням и желаемыми функциональными свойствами. Высокий уровень развития современной молекулярной биологии, использование автоматизированных лабораторных методик и биоинформатических подходов позволяют параллельно вести работу по созданию библиотек и их скринингу на связывание с множеством мишеней и разрабатывать инновационные терапевтические препараты, способные действовать более эффективно и направленно по сравнению с традиционными ЛП широкого спектра действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256(5517), 495–497.
2. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 1988, 332(6162), 323–327.
3. Fischer S., Handrick R., and Otte K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(8), 1878–1896.
4. Tomita M., Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, 2011, 3(3), 371–380.
5. Safdari Y., Farajnia S., Asgharzadeh M., et al. Antibody humanization methods - a review and update. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2013, 29, 175–186.
6. Olimpieri P., Marcatili P., and Tramontano A. Tabhu: tools for antibody humanization. *Bioinformatics*, 2015, 31(3), 434–435.
7. Tomita M., Tsumoto K. New hybridoma technology based on antigenspecific immunoglobulin receptors. *FEBS J.*, 2010, 50, 277 (Suppl. 1).
8. Baas T. Superhuman mice. *SciBX*, 2014, 7(17).
9. Chan C.E., Lim A.P., MacAry P.A., et al. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.*, 2014, 26(12), 649–657.
10. Hoogenboom H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23(9), 1105–1116.
11. Scott A.M., Wolchok J.D., and Old L.J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2012, 12, 278–287.

12. Cho J.H., Feldman M. Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nat. Medicine*, 2015, 21, 730–738.
13. Hutchings C.J., Koglin M. and Marshall F.H. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MABS*, 2010, 2(6), 594–606.
14. Altshuler E.P., Serebriyanaya D.V., and Katrukha A.G. Obtaining of recombinant antibodies and methods for improving their affinity. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii (Proc. Biol. Chem.)*, 2010, 50, 203–220.
15. Xu L., Aha P., Gu K., et al. Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem. Biol.*, 2002, 9, 933–942.
16. Swers J.S., Kellogg B.A. and Wittrup K.D. Shuffled antibody libraries created by in vivo homologous recombination and yeast surface display. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 36.
17. Shirai H., Prades C., Vita R., et al. Antibody informatics for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1844(11), 2002–2015.
18. Chowdhury P.S. Engineering hot spots for affinity enhancement of antibodies. *Methods Mol. Biol.*, 2003, 207, 179–196.
19. Zhang M.Y., Shu Y., Rudolph D., et al. Improved breadth and potency of an HIV-1-neutralizing human single-chain antibody by random mutagenesis and sequential antigen panning. *J. Mol. Biol.*, 2004, 335(1), 209–219.
20. Schier R., McCall A., Adams G.P., et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.*, 1996, 263(4), 551–567.
21. Lu D., Shen J., Vil M.D., et al. Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(44), 43496–43507.
22. Rajpal A., Beyaz N., Haber L., et al. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(24), 8466–8471.
23. Schaffitzel C., Hanes J., Jeremius L., et al. Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J. Immunol. Methods*, 1999, 231(1-2), 119–135.
24. Corrada D., and Colombo G. Energetic and dynamic aspects of the affinity maturation process: characterizing improved variants from the bevacizumab antibody with molecular simulations. *J. Chem. Inf. Model.*, 2013, 53(11), 2937–2950.
25. La Porte S.L., Eigenbrot C., Ultsch M., et al. Generation of a high-fidelity antibody against nerve growth factor using library scanning mutagenesis and validation with structures of the initial and optimized Fab-antigen complexes. *MABS*, 2014, 6(4), 1059–1068.
26. Harding F.A., Stickler M.M., Razo J., et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *MABS*, 2010, 2(3), 256–265.
27. Gonzales N.R., Padlan E.A., De Pascalis R., et al. SDR grafting of a murine antibody using multiple human germline templates to minimize its. *Mol. Immunol.*, 2004, 41(9), 863–872.
28. Hwang W.Y., Almagro J.C., Buss T.N., et al. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods*, 2005, 36, 35–42.
29. De Groot A.S., and Moise L. Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 2007, 10(3), 332–340.
30. Shields R.L., Namenuk A.K., Hong K., et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(9), 6591–6604.
31. Satoh M., Iida S., and Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2006, 6(11), 1161–1173.
32. Iida S., Kuni-Kamochi R., Mori K., et al. Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood. *BMC Cancer*, 2009, 9, 58.
33. Chan A. C., Carter P.J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10(5), 301–316.
34. Zhao L., Shang E.Y. and Sahajwalla C.G. Application of pharmacokinetics-pharmacodynamics/clinical response modeling and simulation for biologics drug development. *J. Pharm. Sci.*, 2012, 101(12), 4367–4382.
35. Shah D.K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for the next generation protein therapeutics. *J. Pharmacokinetic Pharmacodyn.*, 2015, 42(5), 553–571.
36. Kuo T.T., and Aveson V.G. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *MABS*, 2011, 3(5), 422–430.
37. Schubert I., Stein C. and Fey G.H. Dual-Targeting for the Elimination of Cancer Cells with Increased Selectivity. *Antibodies*, 2012, 1(1), 2–18.
38. Byrne H., Conroy P.J., Whisstock J.C., et al. A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications. *Trends Biotechnol.*, 2013, 31, 621.
39. Kontermann R.E. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MABs*, 2012, 4(2), 182–197.
40. Schaefer W., Regula J.T., Böhner M., et al. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108(27), 11187–11192.
41. Labrijn A.F., Meesters J.I., de Goeij B.E., et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(13), 5145–5150.
42. Spiess C., Merchant M., Huang A., et al. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(8), 753–758.
43. Lewis S.M., Wu X., Pustilnik A., et al. Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32(2), 191–198.
44. Fischer N., Elson G., Magistrelli G., et al. Exploiting light chains for the scalable generation and platform purification of native human bispecific IgG. *Nat. Commun.*, 2015, 6, Art. 6113.

45. Vu K.B., Ghahroudi M.A., Wyns L., et al. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.*, 1997, 34(16-17), 1121–1131.
46. Dong J., Sereno A., Snyder W.B., et al. Stable IgG-like bispecific antibodies directed toward the type I insulin-like growth factor receptor demonstrate enhanced ligand blockade and anti-tumor activity. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(6), 4703–4717.
47. Michaelson J.S., Demarest S.J., Miller B. et al. Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTbetaR. *MAbs*, 2009, 1(2), 128–141.
48. Choi H.J., Kim Y.J., Lee S., et al. A heterodimeric Fc-based bispecific antibody simultaneously targeting VEGFR-2 and Met exhibits potent antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.*, 2013, 2(12), 2748–2759.
49. Orcutt K.D., Ackerman M.E., Cieslewicz M., et al. A modular IgG-scFv bispecific antibody topology. *Protein. Eng. Des. Sel.*, 2010, 23(4), 221–228.
50. Richmond A., Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis. Model. Mech.*, 2008, 1(2-3), 78–82.
51. Feavers I., and Walker B. Functional antibody assays. *Methods Mol. Biol.*, 2010, 626, 199–211.
52. Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2012, (6), 338–350.
53. Maulik G., Shrikhande A., Kijima T., et al. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, 13, 41–59.
54. Comoglio P.M. Pathway specificity for Met signaling. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3(7), 161–162.
55. Dharmawardana P.G. Giubellino A. and Bottaro D.P. Hereditary papillary renal carcinoma type I. *Curr. Mol. Med.*, 2005, 4(8), 855–868.
56. Cooper, C.S., Park M., Blair D.G., et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 1984, 311, 29–33.
57. Park M., Dean M., Cooper C.S., et al. Mechanism of met oncogene activation. *Cell*, 1986, 45, 895–904.
58. Di Renzo M.F., Olivero M., Giacomini A., et al. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, 147–154.
59. Matsumoto K., and Nakamura T. NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci.*, 2003, 94 (4), 321–327.
60. Merchant M., Ma X., Maun H.R., et al. Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(32), E2987–E2996.
61. Birchmeier C., Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell. Biol.*, 1998, 8(10), 404–410.
62. Liu L., Zeng W., Wortinger M.A., et al. LY2875358, a neutralizing and internalizing anti-MET bivalent antibody, inhibits HGF-dependent and HGF-independent MET activation and tumor growth. *Clin. Cancer Res.*, 2014, 20(23), 6059–6070.
63. Bellon S.F., Kaplan-Lefko P., Yang Y., et al. c-Met Inhibitors with Novel Binding Mode Show Activity against Several Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma-related Mutations. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 2675–2683.
64. Maim F., Casagrande F., Audero E., et al. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor *in vivo* reveals complex roles in muscle development. *Cell*, 1996, 87, 531–542.
65. Philips G.K., and Atkins M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int. Immunol.*, 2015, 27(1), 39–46.
66. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, 26, 677–704.

Design of Innovative Therapeutic Monoclonal Antibodies

A.V. KARABELSKII*, T.A. NEMANKIN, A.B. ULITIN, A.S. VAGANOV, E.A. MOSINA, and R.A. IVANOV

The Biotechnological Company BIOCAD, St.-Petersburg, 198515 Russia

*e-mail: karabelskij@biocad.ru

Received June 21, 2016

Accepted September 01, 2016

Abstract – The review is focused on the latest achievements and perspectives in the field of the creation and use of novel therapeutic monoclonal antibodies. Today, the collection of immunoglobulin gene libraries with the subsequent selection and screening for the molecules with the desirable functional properties and specificity is the most effective approach to obtaining of corresponding antibodies. The high level of the current molecular biology methods, use of automated laboratory techniques and integration with bioinformatics allow the simultaneous creation and screening of several gene libraries on a set of targets and make it possible to design innovative therapeutics with higher effectiveness and specificity as compared to routine medicines characterized by broad activity spectra.

Key words: high-throughput screening, humanization, monoclonal antibodies, phage display, recombinant therapeutic proteins.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-10-29