УДК: 602.68

КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ТЕРАПЕВТИЧНИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ

Чорний С.І.,
serchornyi@gmail.com
Луценко Т.М., *к.т.н.,*
tanywalytsenko@gmail.com
Національний технічний університет України
"Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського",
кафедра трансляційної медичної біоінженерії
м. Київ, Україна

Реферат – *Розвиток розробки та виробництва терапевтичних моноклональних антитіл набирає значних обертів завдяки високим показникам безпечності та ефективності. В даній сфері відбувається стрімкий ріст на світовому ринку на рівні 150 млрд доларів у 2019 році, і десятки нових препаратів вже пройшли етап розробки та активно проходять клінічні дослідження. У статті проведено аналітичний огляд базових технологій отримання терапевтичних моноклональних антитіл з оцінкою переваг та недоліків. Розглядаються технології починаючи з "традиційної" гібридомної технології з високою імуногенністю отримуваних препаратів, до повністю людських моноклональних антитіл. Також у статті проаналізовано критичні етапи виробництва, що включають отримання клону-продуцента, культивування, виділення та очистку антитіл.*
Ключові слова: *терапевтичні моноклональні антитіла, гуманізовані та химерні антитіла, рекомбінантні білки, гібридомна технологія, фаговий дисплей, виробництво.*

I. ВСТУП

Через свою виключну специфічність та високу спорідненість моноклональні антитіла (МАТ) вважаються особливо привабливими молекулами для терапії множинних захворювань, і в даний час препарати на основі антитіл представляють найбільш швидкозростаючий сегмент усіх терапевтичних білків у біотехнологічній галузі.

У людини існує п'ять різних класів антитіл, які визначаються природою С-областей важкої ланцюга (НС). Найбільш поширеним класом антитіл у крові та найпоширенішим молекулярним форматом, що використовується як терапевтичний є IgG [1].

Розрізняють 4 типи моноклональних антитіл за фактором співвідношення їх людської та тваринної (найчастіше мишачої) природи. Відношення використання різних типів моноклональних антитіл у клінічному застосуванні складає:

- Людські – 51%
- Гуманізовані – 34,7%
- химерні – 12,5%
- мишачі антитіла – 2,8%

Як видно, людські та гуманізовані МАТ є домінуючими у галузі терапевтичних антитіл [2].

II. МЕТА РОБОТИ

Огляд різноманітних технологій отримання терапевтичних моноклональних антитіл та процесу їх виробництва.

III. МИШАЧІ АНТИТІЛА

Класична гібридомна технологія полягає в наступному: антиген вводять мишам, і за рахунок природньої імунної відповіді виробляються антитіла потрібної специфічності. Клітини селезінки з В-лімфоцитами, що продукують антитіла, виділяють і зливають *in vitro* з "безсмертними" клітинами мієломи. Злиті клітини гібридоми відбираються спеціальними середовищами відбору, які вбивають незлиті клітини. Клітини гібридоми містять інформацію від обох батьківських клітин – для виробництва антитіл та необмеженого росту клітин. Ретельним скринінговим процесом ідентифікуються ті клітини гібридоми, які продукують бажане моноклональне антитіло. Клітини можна масово культивувати для отримання великої

кількості антитіл та / або зберігати замороженими в рідкому азоті [3].

Недоліки:

- неможливість контролювати афінність та селективність антитіла.
- мишине антитіло є чужорідним до людини через наявність інших амінокислотних залишків в певних частинах константної частини.

Саме тому перше комерційне антитіло — Muromonab-CD3 — викликало антитільну відповідь у багатьох пацієнтів. Такі антитіла мають назву HAMA — *human anti-mouse antibodies*, тобто "людські антимишачі антитіла". Антитільна відповідь сильно знижує ефективність препарату, тому що приводить до виведення його з організму і робить недоцільним повторне введення, що спричинить ще сильнішу імунну відповідь [1].

IV. ХИМЕРНІ АНТИТІЛА

Першим типом антитіл, наближеним до людських, стали химерні антитіла. Це моноклональні антитіла отримані від нелюдського виду (наприклад, миші, щури), "олюднені" в різному ступені за допомогою інженерних амінокислотних замін, які роблять їх більш схожими на послідовності отримані від людини. Це робиться за допомогою технологій рекомбінантної ДНК [4].

У 1997 році був схвалений Ритуксимаб – антитіло проти білка CD20 на поверхні В-лімфоцитів, призначене для лікування В-клітинних лімфом. Для його створення отримані гібридомним методом варіабельні фрагменти об'єднали з людськими константними доменами і таким чином досягли вмісту людських ділянок понад 70%. Включення Ритуксимабу в схеми лікування лімфом зробило революцію, дозволивши не тільки збільшити час до прогресування захворювання, але і підвищити загальну виживаність [1].

Генна інженерія антитіл

Зазвичай створення генно-інженерної конструкції для експресії антитіла починається з вибору системи експресії, вектора та оптимізації нуклеотидної послідовності, що кодує антитіло. Необхідно відкоригувати склад кодонів таким чином, щоб експресія антитіла була максимальною. Амінокислотний склад білка оптимізують з метою зниження ймовірності випадання в осад, агрегації, а також імуногенності. Крім того, важливо забезпечити правильне згортання (фолдування) ланцюгів і їх з'єднання між собою. На сьогодні існують програми, що дозволяють оптимізувати нуклеотидну послідовність генно-інженерних конструкцій для продукції антитіл *in silico* (за допомогою комп'ютера *або* комп'ютерної симуляції), хоча, останнє слово залишається за експериментальними даними.

В якості вектора використовують плазміди – кільцеві ДНК, що кодують як сам ген білка, так і допоміжні елементи. Так, для експресії в клітині використовують промотор цитомегаловірусу, що забезпечує високу ефективність транскрипції.

Оскільки антитіло складається з двох поліпептидних ланцюгів – легкого та важкого, – використовують або двохплазмідну систему експресії, або один вектор, що містить обидва гена. Останній варіант являється оптимальнішим, оскільки дозволяє точніше контролювати співвідношення продукції легких (LC) і важких (HC) ланцюгів. Було показано, що в природних умовах в В-клітинах легкі ланцюги синтезуються в більшій кількості, ніж важкі, і таке співвідношення швидкостей синтезу найбільш сприятливо для продукції антитіл [5].

Вектор повинен також містити ген стійкості до антибіотика, в присутності якого вирощують клітини. Це потрібно, для відбору клітин що містять вектор – при додаванні антибіотика клітини, що не несуть вектор, загинуть. Хоча антитіло синтезується в клітинах ссавців, попередні маніпуляції з вектором (наприклад, вставка туди гена і клонування, тобто отримання однакових копій вектора) проводять в бактеріях [6].

Процес отримання химерного антитіла на прикладі інфліксімабу – препарату проти фактору некрозу пухлин (Tumor necrosis factor – TNF), який, застосовується для лікування ревматоїдного артриту та хвороби Крона. Для його отримання миші імунізують людським TNF (hTNF) в поєднанні з ад'ювантом – речовиною, що підсилює імунну відповідь, далі виділяють спленоцити і зливають їх з клітинами мієломи. Для відбору клонів клітин, що експресують потрібні антитіла використовують радіоімунний метод з іммобілізованим hTNF. Після побудови геномних бібліотек з використанням фагових векторів і скринінгу шляхом Саузерн-блоту виділяють гени, що кодують легкі і важкі

ланцюги антитіла. Після цього отримують плазміду, що містить гени мишачих варіабельних ділянок, об'єднують з генами людських константних областей (отриманих раніше секвенуванням генів В-клітин людини) і вводять її в клітини мишачої мієломи для продукції химерного антитіла [7,8].

V. ГУМАНІЗОВАНІ АНТИТІЛА

Хоча химерні антитіла виявилися більш ефективними і менш імуногенними, ніж повністю мишачі, вони все ж викликають HACA-відповідь – утворення human anti-chimeric antibody – людські антитіла проти химерних антитіл. Тому з 1980-х років почали розробку гуманізованих антитіл, у яких чужорідні людині тільки CDR і окремі позиції FR-регіонів варіабельних доменів, а решта частин, включаючи каркас, майже повністю людські. CDR - частина імуноглобулінів якими вони зв'язуються зі своїм специфічним антигеном. Як найбільш мінливі частини молекул, CDR мають вирішальне значення для різноманітності антигенної специфічності, що генерується лімфоцитами .

Першим таким антитілом в розробці став алемтузумаб проти антигену лімфоцитів CD52. Ці ліки застосовуються у лікуванні від розсіяного склерозу. Воно було отримано на основі щурячого антитіла, CDR якого перенесли в людські домени VH і VL вже існуючого людського антитіла [1].

Інший підхід застосували при розробці антитіла Даклізумаб проти рецептора CD25 на Т-лімфоцитах, яке стало першим гуманізованим антитілом на ринку. Даклізумаб також був отриманий включенням мишачих CDR в людський каркас, але в цьому випадку людські ділянки антитіла були підібрані комп'ютерними методами так, щоб максимізувати схожість з мишачим антитілом, звідки взяті CDR. Крім того, побудували комп'ютерну модель мишачого антитіла, і ті амінокислотні залишки каркаса, які контактували з CDR, перенесли в каркас людського антитіла, що дозволило поліпшити афінність [1].

Хоча гуманізовані антитіла включають підвищену кількість людських послідовностей в порівнянні з химерними, ймовірність вироблення антитіл проти них залишається – вони називаються HAHA (human anti-human antibody, людські анти-людські антитіла). HAMA-відповідь може бути направлений на все антитіло, HACA – проти варіабельних областей, а HAHA-відповідь ще більше фокусний – тільки проти CDR [9].

Слід зазначити, що не всі амінокислотні залишки або групи залишків подібні за своєю імуногенністю. Крім того, стає все більш складним уточнити, що являє собою химерне антитіло, порівняно з тим, що являє собою гуманізоване антитіло (наприклад, скільки амінокислотних залишків потрібно змінити, щоб антитіло могло кваліфікуватися як гуманізоване) [4]. Винахід безлічі методів розробки та гуманізації антитіл привів до того, що межа між химерними, гуманізованими і людськими антитілами у багатьох випадках розмита. У зв'язку з цим в 2017 році ВООЗ вирішила скасувати існуючу раніше номенклатуру, згідно якої мишачі антитіла мали суфікс -momab, химерні – ximab, гуманізовані - zumab, а повністю людські – mumab [10].

V. ПОВНІСТЮ ЛЮДСЬКІ АНТИТІЛА

Як було зазначено вище, повністю людські моноклональні антитіла займають більше половини ринку терапевтичних препаратів, і для їх отримання використовують 3 основні методи. Розроблених методом одиничних В клітин, ще не затверджено жодного терапевтичного препарату, тому розглянемо інші два методи – технологію фагового дисплею та метод трансгенних мишей [2].

1. Технології фагового дисплея

Дисплейні методи використовують в якості вихідного матеріалу широкий репертуар генів, що кодують антитіла. Найпоширенішим методом є фаговий дисплей. Метод представлення пептиду на поверхні бактеріофага M13 був винайдений в 1985 році.

Першим антитілом, створеним за допомогою технології фагового дисплея у 2002 році, став препарат "Хуміра" (адалімумаб, компанії Abbott) проти мішені TNF для лікування ревматоїдного артриту і хвороби Крона [11].

Якість отриманої бібліотеки фрагментів залежить від здатності отримати широкий репертуар різноманітних і при цьому якісних антитіл. Існує 2 принципово різних підходи до отримання бібліотек: природний і синтетичний [12].

Природні бібліотеки варіабельних доменів антитіл отримують методом полімеразної ланцюгової реакції природних генів зі зворотною транскрипцією (RT-PCR) з лімфоїдних тканин або периферичної крові людей, а також інших тварин. Перевага цього методу в тому, що отримані антитіла будуть в правильній конформації, так як їх гени кодують функціональні антитіла. Однак недолік в тому, що різноманітність послідовностей обмежена охопленням природної імунної системи, в якій існує певна нерівномірність використання тих чи інших послідовностей. Також фрагменти з природних бібліотек сильно відрізняються за якістю і непередбачувані за складом; багато з них можуть виявитися недостатньо стабільними або невідповідними з інших причин. Склад природних бібліотек складає 10^7-10^{11} фрагментів [13].

Синтетичні бібліотеки створюють шляхом вбудовування штучно синтезованої ДНК в послідовності, що кодують варіабельні домени. ДНК синтезується таким чином, щоб вносити абсолютно випадкові мутації в отримувані фрагменти антитіл і тим самим розширювати різноманітність ділянки, що визначає компліментарність – CDR. Синтетичні бібліотеки дозволяють використовувати певну корову (germline) структуру варіабельного домену, про яку відомо, що вона найбільш представлена в кожному індивідуумі, неімуногенна і стабільна. Однак введення повністю синтетичних ділянок CDR може привести до неправильного формування структури і агрегації білка. Для відпрацювання підходів до визначення того, які CDR краще використовувати, знадобився тривалий час. Склад синтетичних бібліотек, як правило, доходить до 10^9-10^{11} фрагментів [14].

Відбір клонів з потрібними властивостями

Ген фрагмента антитіла зображений на рисунку 1 рожевим кольором вставляється в фагогу ДНК – всередину гена, що кодує білок оболонки фага. Це призводить до експресії на поверхні фага білка – фрагмента антитіла. Потім гени переносять за допомогою трансдукції в бактерійні клітини *Escherichia coli* і заражають допоміжним фагом, який викликає збірку бактеріофага, що містить на поверхні фрагмент антитіла. В результаті виходить бібліотека бактеріофагів, у кожного з яких на поверхні експресується фрагмент антитіла, відповідний гену, який потрапив в даний бактеріофаг.

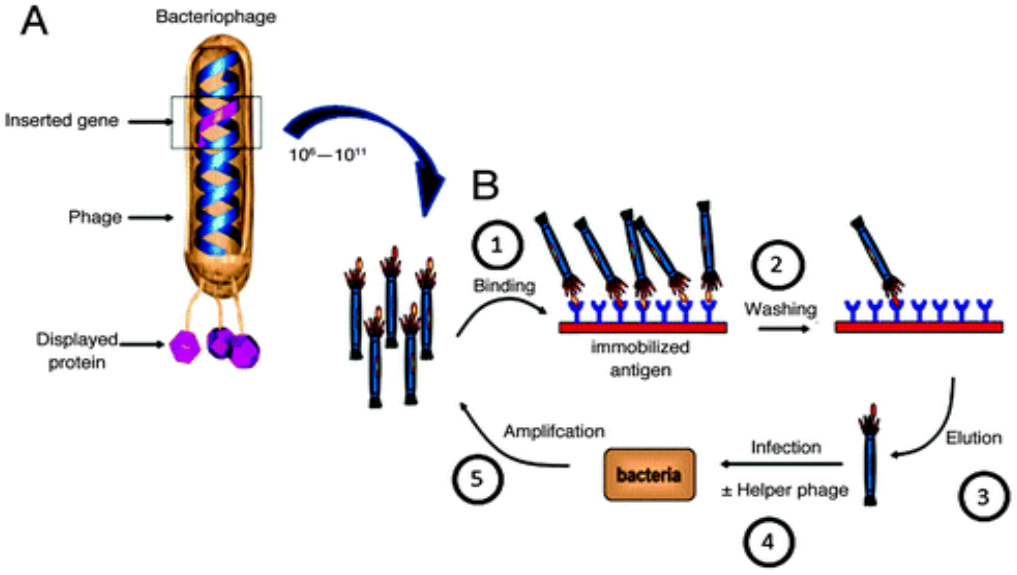

Рис. 1. Процес селекції потрібних генотипів відповідно до афінності к антигену [15]. А – Бактеріофаг, що забезпечує зв'язок генотип-фенотип. Б - Схема фагового дисплея.

Фагову бібліотеку (рис.1.), що складається з 10^6-10^{11} клонів, інкубують з іммобілізованим антигеном (1). Фаги, що не зв'язалися видаляють промиванням (2). На поверхні залишаються тільки бактеріофаги, що містять вставку гена фрагмента антитіла з високою спорідненістю до антигену (3). Щоб відібрати самі високоафінні клони, що зв'язалися з антигеном, фаги знімають з поверхні і знову заражають ними *E. Coli* (4). Процес повторюють

2-3 рази для збагачення популяції антитільними фрагментами, специфічними до антигену. Після кількох етапів відбору ДНК отриманих фагів секвенують і дізнаються послідовність, що кодує найбільш афінні фрагменти. Клітини висівають на середовище з антибіотиком і ампліфікують (5) [15].

Важлива перевага використання дисплейних методів в порівнянні з гібридомними – можливість відбирати тільки ті антитіла, які не зв'язуються з непотрібними білками, наприклад, з близькими до мішені, але які не потрібно блокувати, щоб не викликати токсичність. Для цього достатньо іммобілізувати небажаний білок і відбирати ті фаги, що не зв'язалися з ним.

Також буває корисно створити антитіло, яке б добре пов'язувалося і з мишачим, і з мавпячим, і з людським варіантами мішені – це забезпечує швидке успішне проходження доклінічних досліджень і контроль безпеки до виведення потенційного лікарського кандидата в клінічні випробування.

Існують і інші типи дисплеїв, крім фагового, наприклад, рибосомний або дріжджовий. Принцип у них той же: вони забезпечують зв'язок гена, що кодує фрагмент антитіла, з його афінністю до мішені, тобто з фенотипом, і дозволяють проводити відбір по заданих властивостях з величезної кількості варіантів в бібліотеці [16].

2. Технологія використання трансгенних тварин

- тварин які експресують людські варіанти антитіл.

У методу трансгенних тварин є дві важливі переваги перед дисплейними:

1) Більш швидкий процес утворення антитіл

2) оскільки відбір йде *in vivo*, а не *in vitro*, виключено утворення антитіл з поганою розчинністю і іншими проблемами в подальшій розробці [17].

За допомогою цього методу було отримано одне з найвідоміших зараз антитіл ніволумаб проти мішені PD-1 на активованих Т-лімфоцитах, яке зробило революцію в лікуванні метастатичних злоякісних захворювань: меланоми, раку легень, раку сечового міхура.

Ніволумаб був розроблений за технологією компанії Medarex, яка в 1993 році отримала лінію мишей, що експресують людські IgM, IgG і Igκ і не експресують мишачі IgM і Igκ. Миші виявилися здатними до виробництва повноцінних В-клітин, в яких відбувається V(D)J-рекомбінація людських трансгенних ділянок (механізм соматичної рекомбінації ДНК, що відбувається на ранніх етапах диференціювання лімфоцитів і призводить до формування антиген-розпізнаючих ділянок антитіл і Т-клітинного рецептора), а після введення антигенів – перемикання класу важкого ланцюга і соматичний мутагенез. Далі з цих мишей за звичайною гібридомної технології отримують людські антитіла.

Так, для отримання ніволумаба трансгенних мишей імунізували рекомбінантним людським білком PD-1-Fc, що складається з позаклітинного домену PD-1 і Fc-фрагмента IgG. Одночасно мишам ввели клітини яєчників китайського хом'ячка CHO, що експресують на поверхні PD-1. Спленоцити мишей злили з клітинами мієломи SP2/0 і відібрали гібридоми, що виробляють антитіла, реактивні проти PD-1-Fc, за допомогою імуноферментного аналізу. Зв'язування ніволумаба з CD4+ лімфоцитами визначали методом проточної цитофлуориметрії, а кінетику зв'язування з мішенню – методом плазмонного резонансу [18, 19].

Незважаючи на те, що у мишей технологія Medarex породжує досить обмежений репертуар генів, що кодують людські VH і VL, навіть його вистачає для генерації антитіл з високою афінністю, хоч і не у всіх випадках. Якщо антиген, до якого треба отримати антитіла, є високогомологічним з мишачим аналогом, зробити це не вдасться. В такому разі можна використати трансгенних щурів, курей або дисплейні технології. Також дисплейні технології є єдиним виходом, коли мішень токсична в концентраціях, необхідних для імунізації тварин [1].

VII. ВИРОБНИЦТВО АНТИТІЛ

Отримання клону-продуцента

Для отримання стабільного клону-продуцента антитіл потрібно домогтися правильного вбудовування вектора в геном клітини, модифікувати, якщо необхідно, апарат трансляції та посттрансляційних модифікацій, домогтися високої життєздатності продуцента. У клітинах CHO (клітини яєчників китайського

хом'ячка) з цією метою знижували експресію про- апоптичних факторів і підвищували експресію анти-апоптичних (наприклад Bcl-2). Трансляцію білка збільшували, надекспресуючи шаперони, щоб захистити клітину від апоптозу під впливом стресу і забезпечити більш правильне згортання антитіл. Крім того, в геном клітини-продуцента вносять модифікації, що забезпечують бажаний профіль глікозилювання [20].

Після створення клітинної лінії починається підбір та оптимізація процесу культивування, спочатку в 96-лункових планшетах, потім в колбах і настільних біореакторах об'ємом 1-5 л. В результаті скринінгу сотень і тисяч клонів вибирають клон-продуцент з найкращими характеристиками і переходять до пілотного культивування в реакторах об'ємом 10-25 л, а потім масштабують процес до більших розмірів [21].

Культивування

Зазвичай клітини, що виробляють антитіла, культивують в біореакторах-ферментерах. Традиційним методами культивування є процеси batch і fed-batch. У першому випадку всі компоненти середовища і клон-продуцент завантажують в реактор на кілька днів, після чого збирають культуральне середовище для виділення білка. У другому випадку в середовище періодично додають поживні речовини.

Найважливішим фактором забезпечення високих виходів білка є культуральне середовище. Причому прогрес в цій області триває, і якщо в 1990-х роках виходи становили 0,1 г/л, в 2007 – до 5 г/л, то зараз вдається досягати виходів цільового білка, що становлять 10 і більше г/л. Такі успіхи стали можливими завдяки переходу від середовищ, що містять сироватку тварин до безсироваткових середовищ: спочатку використовувалися гідролізати білків, а зараз – повністю хімічні середовища з чітко визначеним складом. Справа в тому, що варіабельність складу погіршує параметри культивування. Також виявилася продуктивною зміна складу середовища в залежності від стадії культивування: застосовуються різні середовища в фазі зростання і в фазі накопичення продукту.

Для підвищення продуктивності застосовують також тонке налаштування параметрів середовища зі зворотним зв'язком: температури, pH, сольового складу, рівнів кисню та вуглекислого газу, що дозволяє домогтися зниження концентрації токсичних побічних продуктів (молочної кислоти, аміаку) і більш плавної витрати поживних речовин.

В даний час спостерігається тенденція до переходу на безперервні процеси: на так зване перфузійне культивування, при якому свіже середовище безперервно додається до клітинної культури, а продукт видаляється з неї. Такий підхід краще автоматизується, дає продукт більш високої якості і з збільшеними виходами. Також розробники переходять від сталевих біореакторів до одноразових, так як в останніх є ряд переваг:

- вони постачаються на виробництво чистими і стерильними, їх не потрібно готувати до роботи;
- з цієї ж причини простіше валідувати процес виробництва;
- вони мають більшу гнучкість у разі потреби зміни параметрів процесу;
- їх не потрібно довго вводити в експлуатацію і очищати в разі контамінації [21].

Виділення та очистка антитіл

Основними стадіями тут є різні види хроматографії, діафільтрація і інактивація вірусів. Одна з особливостей очищення антитіл в порівнянні з іншими білками – використання хроматографії з білком А. Це білок клітинної стінки золотистого стафілокока, який сильно і селективно зв'язується з антитілами при нормальному pH і слабо – при зниженому. Завдяки високим виходам і чистоті продукту це кращий метод на першому етапі очищення антитіл.

Найважливішою вимогою і на стадії виробництва, і на стадії очищення антитіл є сталість складу продукту. Оскільки антитіло – складний об'єкт і проводиться в біологічній системі (в клітинах), молекули виходять не однакові, а з варіаціями. Мета розробки процесу виробництва і очищення – домогтися того, щоб ці варіації не впливали на фармакологічні характеристики продукту, його стабільність, і не дуже змінювалися від однієї партії товару до іншої. Для цього проводиться валідація процесу виробництва – експериментальне підтвердження те, що процес забезпечує отримання продукту з належними характеристиками.

На деяких проміжних і на фінальному етапі склад продукту контролюють аналітичними методами. Обов'язковими для контролю є:

• бактеріальні ендотоксини;

• білок А;

• наявність вірусів;

• білки і ДНК продуцента, залишками культурального середовища (антибіотики, сироватки та інші), залишки процесу (ферменти, реагентами, неорганічними солями, розчинниками, та ін.).

• фізико-хімічні властивості (вуглеводний склад, дисульфідні зв'язки, варіабельність N- і С-кінцевих залишків, четвертинна структура);

• наявність ізоформ, коефіцієнт екстинкції, електрофоретичний, хроматографічний, спектроскопічний профілі, мультимери і агрегати, гетерогенність заряду молекули [20].

VIII. ВИСНОВОК

Методи виробництва антитіл весь час удосконалюються: за понад 40 років, що минули з моменту виведення першого антитіла на ринок, сталося багато змін – антитіла навчилися гуманізувати, розробили способи їх штучного отримання, вдосконалили методи вивчення афінності і інших властивостей, досягли величезного прогресу у виробництві та очищенні, який дозволив знизити собівартість антитіл.

Незважаючи на всі ці успіхи, існує потреба в більш швидкій і точній розробці антитіл проти заданої мішені. В ідеалі було б якомога більше операцій проводити *in silico*, щоб не витрачати час і гроші на експерименти, але поки у нас недостатньо знань і потужностей для моделювання, наприклад, фармакокінетики та фармакодинаміки антитіл.

В результаті, моноклональні антитіла виявилися серед основного класу терапевтичних засобів для лікування багатьох захворювань людини, в першу чергу онкологічних, імунологічних, інфекційних, нервових та метаболічних захворювань. З розвитком гуманізованих, а потім повністю людських МАТ, швидкість затвердження нових продуктів та продаж швидко зростали, загальний дохід від продажу всіх продуктів МАТ становив 115,2 млрд доларів у 2018 році. Очікується, що подальше зростання продуктів МАТ у найближчі роки стане головним фактором загального продажу біофармацевтичних продуктів [2].

Дисплей фагів та технологія трансгенних мишей проявили себе надійними методами генерування людських антитіл. Як величезні сховища генів, що кодують антитіла з невідомими властивостями високоякісні бібліотеки фагових антитіл є критично важливими для успішної ідентифікації терапевтичних МАТ. Крім того, оптимальний вибір з бібліотек фагових дисплеїв залежить від якості цільового антигену, іммобілізації антигену та жорсткого контролю умов зв'язування та промивання. В даний час існує дев'ять повністю людських антитіл, які були виявлені з бібліотек фагів, схвалених для терапії, і ще десятки препаратів антитіл, отриманих з фагів, перебувають у клінічних випробуваннях і чекають виходу на ринок [22].

З метою покращення якості препаратів антитіл дослідники розробили кілька трансгенних тварин, включаючи мишей, повністю людських, та химерних мишей другого покоління. Постійне вдосконалення та розвиток трансгенних тварин надає більше можливостей для розробки ліків антитіл на світових фармацевтичних фабриках. Залежно від протоколу імунізації, високоафінні антитіла людини можна отримати шляхом відбору клонів, що генеруються у тварин. Цей вибір в основному здійснюється за технологією гібридоми. В даний час існує 19 затверджених МАТ людини, які були виявлені у трансгенних тварин [2].

Повністю людські моноклональні антитіла вже складають більше половини ринку терапевтичних препаратів, плюс значна частина проходить в цей момент клінічні дослідження та очікує затвердження. Отже, зрозуміло, що майбутнє саме за цим типом МАТ, які вже не викликають значних проблем з імуногенністю та є значно ефективнішими.

Робота виконана в рамках гранту Національного фонду досліджень України 2020.01/0464 «Розробка концепції підготовки фахівців та підвищення кваліфікації з біобезпеки та біозахисту»

IX. ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. *Almagro J.C., Daniels-Wells T.R., Perez-Tapia S.M. and Penichet M.L.* Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Front. Immunol.* 2018, 8:1751. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01751.

2. *Lu R.M., Hwang, Y.C., Liu, I.J. et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. J *Biomed Sci* 27, 1 (2020). *https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z*

3. *Micheel B.* Monoclonal Antibodies. In: Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. *Springer*, 2006. *https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_0830*

4. John P Manis, Overview of therapeutic monoclonal antibodies, *Up to date* 2020. Available at *https://www.uptodate.com/contents/overview-of-therapeutic-monoclonal-antibodies#H3477242052* (accessed, November, 2020)

5. *Kiyoshi M., Caaveiro J., Miura E., Nagatoishi S, Nakakido M., Soga S, et al.* Affinity Improvement of a Therapeutic Antibody by Structure-Based Computational Design: Generation of Electrostatic Interactions in the Transition State Stabilizes the Antibody-Antigen Complex. *PLoS ONE.* 2014, 9(1): 87-99. *https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087099*

6. *Rahimpour A, Bayat H, Omidi M, Peyrovan M, Mohammadian O, Naderi F.* Stable Expression of Anti-CD52 Monoclonal Antibody Using a Bicistronic Vector System. *Biol Med (Aligarh)* 2016 8: 341. doi:10.4172/0974-8369.1000341.

7. *David Knight, HanTrinh,* Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody, *Molecular Immunology*, 1993, *Vol. 30, Issue 16*, Pages 1443-1453, *https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90106-L*

8. *Jones, P., Dear, P., Foote, J. et al.* Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522–525 (1986). *https://doi.org/10.1038/321522a0*

9. *Harding F.A., Stickler M.M., Razo J., Du Bridge R.B.* The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs.* 2010;2(3):256-265. doi:10.4161/mabs.2.3.11641

10. *Paul W. H. I. Parren*, Changes to International Nonproprietary Names for antibody therapeutics 2017 and beyond: of mice, men and more, *mAbs* 2017, Issue 6 Pages 898-906 , *https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1341029*

11. William J. J. Finlay[1] and Juan C. Almagro, Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery, Front. Immunol., 2012 | *https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00342*

12. *Sidhu, S., Fellouse, F.* Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol* 2, 682–688 (2006). *https://doi.org/10.1038/nchembio843*

13. *Patrick J. Kennedy, Carla Oliveira, Pedro L. Granja &Bruno Sarmento*, Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering, *Critical Reviews in Biotechnology* 2017, P. 394-408, *https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1357002*

14. *Sachdev S.Sidhu*, Engineering M13 for phage display, *Biomolecular Engineering*, *Vol. 18, Issue 2*, 2001, Pages 57-63, *https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00087-9*

15. *Andrew E Nixon, Daniel J Sexton, Robert C Ladner*, Drugs derived from phage display, *mAbs* 2014, p. 73-85, *https://doi.org/10.4161/mabs.27240*

16. *Hoogenboom, H.* Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23, 1105–1116 (2005). *https://doi.org/10.1038/nbt1126*

17. *Lonberg, N., Taylor, L., Harding, F. et al.* Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856–859 (1994). *https://doi.org/10.1038/368856a0*

18. *Larry L Green*, Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies, *Journal of Immunological Methods*, *Vol. 231*, 1999, Pages 11-23. *https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00137-4*

19. *Christiane Querfeld, Samantha Leung, Patricia L. Myskowski, Shane A. Curran*, Primary T Cells from Cutaneous T-cell Lymphoma Skin Explants Display an Exhausted Immune Checkpoint Profile, *Cancer immunology research* 2018, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0270

20. *Kunert, R., Reinhart, D.* Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 3451–3461 (2016). *https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9*

21. *Paul Bird, Nick Hutchinson*, Automation of a Single-Use Final Bulk Filtration Step: Enhancing Operational Flexibility and Facilitating Compliant, Right–First-Time Manufacturing, *bioprocess international* 2015. Available at https://bioprocessintl.com/manufacturing/fill-finish/automation-single-use-final-bulk-filtration-step-enhancing-operational-flexibility-facilitating-compliant-right-first-time-manufacturing/ (accessed, November, 2020).

22. *Frenzel, A., Schirrmann, T., & Hust, M.* (2016). Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *mAbs*, *8*(7), 1177–1194. *https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149*

УДК: 602.68

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Черный С.И.
serchornyi@gmail.com
Луценко Т.М., к.т.н.,
tanywalytsenko@gmail.com
Национальный технический университет Украины
“Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского”
г. Киев, Украина

Реферат *– Развитие разработки и производства терапевтических моноклональных антител стремительно набирает обороты благодаря высоким показателям безопасности и эффективности. В данной сфере происходит взрывной рост с мировым рынком на уровне 150 млрд долларов в 2019 году, и десятки новых препаратов уже не просто разрабатываются, а активно проходят клинические исследования. В статье проведен аналитический обзор базовых технологий получения терапевтических моноклональных антител с оценкой преимуществ и недостатков. Рассматриваются технологии начиная с "традиционной" гибридомной технологии с высокой иммуногенностью получаемых препаратов до полностью человеческих моноклональных антител. Также в статье проанализированы критические этапы производства, включающих получение клона-продуцента, культивирование, выделение и очистку антител.*
Ключевые слова: *терапевтические моноклональные антитела, гуманизированные и химерные антитела, рекомбинантные белки, гибридомная технология, фагов дисплей, производство.*

UDC: 602.68

CELL TECHNOLOGIES FOR PRODUCING THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES

Chornyi Serhii
serchornyi@gmail.com
Lutsenko T.M., к.т.н
tanywalytsenko@gmail.com
National Technical University of Ukraine
“Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”
Kiev, Ukraine

Abstract *– The development of engineering and production therapeutic monoclonal antibodies is rapidly gaining momentum due to high safety and efficacy. This area is experiencing explosive growth with a global market of $ 150 billion in 2019, and dozens of new drugs are no longer just being developed, but are actively undergoing clinical trials. The article provides an analytical review of the basic technologies for producing therapeutic monoclonal antibodies with an assessment of the advantages and disadvantages. Technologies are considered starting from the "traditional" hybridoma technology with high immunogenicity of the resulting drugs to fully human monoclonal antibodies. Also, the article analyzes the critical stages of production, including obtaining a clone-producer, cultivation, isolation and purification of antibodies.*
Key words: *therapeutic monoclonal antibodies, humanized and chimeric antibodies, recombinant proteins, hybridoma technology, phage display, production.*